

JOHANNES GUTENBERG-UNIVERSITÄT MAINZ  
AM FACHBEREICH BIOLOGIE

# Die Rolle der Oligodendrozyten- Vorläuferzellen im Zentralen Nervensystem

---

Dissertation  
Zur Erlangung des Grades Doktor der  
Naturwissenschaften

**Sakry, Dominik**  
Geb. am 11.10.1982 in Bonn

Mainz, den 30.07.2013

## 1 Inhaltsverzeichnis

2	Einleitung.....	5
2.1	Zelltypen im ZNS .....	5
2.2	Besonderheiten der OPC .....	6
2.2.1	Neuron-Glia Synapse .....	7
2.2.2	Zellteilung / Differenzierung.....	8
2.2.3	Migration.....	9
2.2.4	Läsionen .....	10
2.2.5	Tumorbildung.....	10
2.3	Das NG2 Protein.....	11
2.3.1	Funktion des intrazellulären Teils von NG2 .....	12
2.3.2	Funktion des extrazellulären Teils von NG2.....	13
2.4	Die proteolytische Prozessierung von Typ-1 Membranproteinen.....	15
2.4.1	Die Prozessierung.....	16
2.4.2	Die beteiligten Proteasen.....	17
2.5	Ziel der Studie .....	19
3	Material und Methode.....	20
3.1	Geräte und Software .....	20
3.1.1	Mikroskope.....	20
3.1.2	Zentrifugen .....	20
3.1.3	Sonstige Geräte .....	20
3.1.4	Software .....	20
3.2	Chemikalien und Reagenzien .....	21
3.2.1	Proteaseinhibitoren.....	21
3.2.2	Kits & Marker .....	21
3.2.3	Restriktionsenzyme .....	22
3.2.4	Antikörper .....	22
3.2.5	Plasmide und Oligonukleotide .....	23
3.3	Lösungen und Nährmedien.....	27
3.3.1	Zellkultur.....	27
3.3.2	Molekularbiologie .....	28
3.3.3	Proteinbiochemie.....	28

3.3.4	Immunofluoreszenzfärbungen.....	29
3.4	Protein biochemische Methoden .....	29
3.4.1	Zellysate .....	29
3.4.2	Subzelluläre Fraktionierung .....	29
3.4.3	Salin und Triton Extraktion von Hirngewebe .....	29
3.4.4	100.000g Extraktion von Hirngewebe .....	30
3.4.5	Protease Assay mit isolierten Zellmembranen .....	30
3.4.6	Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen.....	31
3.4.7	SDS-PAGE und Westernblot .....	31
3.5	Molekularbiologische Methoden.....	32
3.5.1	Vervielfältigung von DNA mittels Polymerase-Ketten-Reaktion .....	32
3.5.2	Präparative und analytische Agarose-Gelelektrophorese.....	32
3.5.3	Ligation von DNA.....	32
3.5.4	Transformation von kompetenten Bakterien.....	32
3.5.5	Isolierung von Plasmid-DNA.....	33
3.5.6	Restriktionsverdau.....	33
3.5.7	Isolierung von RNA .....	33
3.5.8	Synthese von cDNA .....	34
3.5.9	Quantitative Real-Time-PCR .....	34
3.5.10	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäure haltigen Lösungen.....	34
3.6	Transcriptom Analyse mittels gene chip .....	34
3.7	Luciferase Assays .....	34
3.8	Immunocyto und Immunohistochemie .....	35
3.8.1	Immunocytochemie (ICC).....	35
3.8.2	Immunohistochemie (IHC) .....	35
3.9	Zellkultur .....	36
3.9.1	Kultivierung von Zelllinien.....	36
3.9.2	Kultivierung von primären Maus Oligodendrozyten aus E14/E15 Hirnen.....	36
3.9.3	Kultivierung primärer kortikaler Maus Neurone aus E14/15 Hirnen .....	36
3.9.4	Magnetisch basierte Sortierung primärer Maus OPC aus P9 Hirnen.....	37
3.9.5	Fluoreszenz basierte Sortierung primärer Maus OPC aus P9 Hirnen .....	37
3.10	Experimente in der Maus (Ratte).....	38
3.10.1	Die NG2-EYFP <i>knock-in</i> Mauslinie .....	38

3.10.2	BrdU Versuche in P80, P135 und P228 Mäusen .....	38
3.10.3	Stab wound Versuche in P135 Mäusen.....	38
3.10.4	Elektrophysiologische Experimente in der NG2-KO Maus.....	39
3.10.5	Verhaltenstest der NG2 -/- Maus .....	39
3.10.6	Aktivitätsabhängige Proteolyse in akuten Schnittkulturen .....	40
3.11	Experimente in der Fruchtfliege .....	40
3.12	Statistik .....	40
4	Ergebnisse .....	42
4.1	Sequentielle Spaltung von NG2 durch $\alpha$ - und $\gamma$ - Sekretase.....	42
4.1.1	Überexpression der $\alpha$ -Sekretasen ADAM10 und 17 .....	42
4.1.2	Pharmakologische Hemmung der $\alpha$ -Sekretase ADAM10 .....	44
4.1.3	Pharmakologische Hemmung $\gamma$ -Sekretase .....	45
4.1.4	Hemmung von $\alpha$ - und $\gamma$ -Sekretase in einem zellfreien Assay .....	47
4.2	Lokalisierung der NG2 Spaltprodukte.....	49
4.2.1	Zelluläre Lokalisierung von NG2 Spaltprodukten <i>in vitro</i> .....	49
4.2.2	Zelluläre Lokalisierung von NG2 Spaltprodukten <i>in vivo</i> .....	52
4.3	Signalfunktionen des intrazellulären Teils von NG2 .....	55
4.3.1	Der Einfluss von NG2 Spaltprodukten auf die zelluläre Expression .....	55
4.3.2	Expression relevanter Ziele in FACS sortierten OPC von NG2 -/- Mäusen.....	57
4.3.3	Expression relevanter Ziele in kultivierten MACS sortierten primären OPC ..	63
4.3.4	Verhaltensversuche der NG2 -/- Maus .....	66
4.4	Funktionen der NG2 Ektodomäne .....	67
4.4.1	Einfluss von neuronaler Aktivität auf die NG2 Spaltung/Expression.....	67
4.4.2	Neuronale Aktivität im Cortex von NG2 -/- Mäusen.....	70
4.5	Transkriptom Analyse der NG2 -/- Maus .....	75
4.5.1	Analyse des Transkriptoms im lädierten Kortex der NG2 -/- Maus .....	75
4.6	Darstellung synaptischer Interaktionen von OPC .....	77
4.7	Zellteilungsanalyse von OPC in NG2 -/- Mäusen .....	84
4.7.1	Analyse der mitotischen Zellen im lädierten Kortex .....	84
4.7.2	Analyse der mitotischen Zellen im unlädierten Cortex.....	89
5	Diskussion.....	94
5.1	Morphologie von OPC / Synapsen .....	94
5.2	Verhalten von OPC unter Läsionsbedingungen .....	95

5.3	Konstitutive Spaltung von NG2 durch $\alpha$ - und $\gamma$ -Sekretase .....	96
5.4	Funktion des intrazellulären Teils von NG2.....	97
5.4.1	Die Lokalisierung von intrazellulären NG2 Fragmenten.....	97
5.4.2	Einfluss von NG2 (Fragmenten) auf die Expression von PTGDS.....	98
5.5	Funktion der NG2 Ektodomäne.....	100
5.5.1	Lokalisierung und Funktion der NG2 Ektodomäne innerhalb der ECM .....	100
5.5.2	Aktivitätsabhängige Spaltung der NG2 Ektodomäne .....	101
5.5.3	Einfluss der NG2 Ektodomäne auf das Neuronale Netzwerk .....	102
6	Zusammenfassung.....	104
7	Ausblick .....	105
8	Anhang.....	106
8.1	Veröffentlichungen und Kongressbeiträge.....	106
8.2	Tabellenverzeichnis .....	108
8.3	Abbildungsverzeichnis .....	108
8.4	Literaturverzeichnis .....	110
8.5	Lebenslauf .....	118
8.6	Danksagungen .....	120
8.7	Eidesstattliche Erklärung.....	121

## 2 Einleitung

### 2.1 Zelltypen im ZNS

Das zentrale Nervensystem (ZNS) der Säugetiere besteht aus vier Zelltypen. Bis heute legten dabei fast die gesamten neurowissenschaftlichen Studien ihren Focus auf einen Zelltyp, das Neuron. Diese starke Konzentration auf einen Zelltyp lässt sich unter anderem historisch begründen. So prägte Santiago Ramón y Cajal Anfang des letzten Jahrhunderts grundlegend das anatomische Verständnis des ZNS, dabei beruhte ein Großteil seiner anatomischen Zeichnungen auf einer von Camillo Golgi entwickelten Silbernitratfärbung, welche allerdings nur eine Subpopulation von Neuronen anfärbte. Zwar war es schon seit Mitte des 19. Jahrhunderts bekannt, dass es noch andere Zelltypen im ZNS gibt, diesen wurde aber zunächst keine große Bedeutung zugeschrieben. Es war unter anderem Rudolf Virchow, welcher diesen Zellen lediglich eine Stützfunktion für die von ihnen umgebenen Nervenzellen zuschrieb, wovon sich auch der Name Glia (gr. für Leim) ableitet. Mittlerweile umfasst die Gruppe dieser Gliazellen drei Zelltypen, die in vielerlei Hinsicht sehr heterogen sind und im Menschen mindestens genauso häufig sind wie Neurone (Allen and Barres, 2009). Die Haupttypen der Gliazellen werden wie folgt aufgeteilt:

*Astrozyten*, bilden das Bindeglied zwischen Blutgefäßen und dem ZNS. Sie sind untereinander durch *gap junctions* verbunden und ermöglichen so den grundlegenden Stoffaustausch zwischen diesen beiden Systemen. Desweiteren stellen sie eine Vielzahl an Substanzen für die anderen Zelltypen im ZNS bereit. So umschließen ihre Fortsätze neuronale Synapsen, welches man unter der Struktur einer *tripartite synapse* zusammenfasst. In dieser Struktur werden unter anderem bestimmte Neurotransmitter von den Astrozyten aufgenommen so wie Metaboliten von den Astrozyten zu den Axonendigungen transportiert.

*Microglia* sind die einzigen Zellen des ZNS die mesodermalen Ursprungs sind. Sie werden auch als Makrophagen des ZNS bezeichnet, da sie nach Schädigung des ZNS aktiviert werden und daraufhin vergleichbare Aufgaben wahrnehmen wie die Fresszellen des Blutes. Die Funktionen der ruhenden Microglia im unbeschädigten ZNS sind noch weitgehend ungeklärt. Eine der wichtigsten Funktionen, die in jüngster Zeit für diese Population beschrieben wurde ist das sog. *synaptic pruning*. Dabei handelt es sich um ein Umschließen und Beseitigen von nicht mehr benötigten Synapsen während der Entwicklung oder generell während plastischer Veränderungen des ZNS (Kettenmann et al., 2013; Schafer et al., 2013).

*Oligodendrozyten* bilden mit ihren Fortsätzen hochspezialisierte Strukturen um die Axone der meisten Neurone, die sogenannte Myelinscheide, wobei ein einzelner Oligodendrozyt gleich mehrere Axone myelinisieren kann. Die Myelinisierung ändert neben ihrer Stütz- und Schutzfunktion, die Leitungseigenschaften der zugrundeliegenden Axone in dem sie die saltatorische Erregungsweiterleitung ermöglicht und so die Leitungsgeschwindigkeit erhöht. Neueste Forschungen zeigen auch zahlreiche trophische Unterstützung von Neuronen durch

Oligodendrozyten (Funfschilling et al., 2012), zum Teil auch durch sog. Exosomen (Fruhbeis et al., 2012). Erkrankungen wie Multiple Sklerose (MS) und die Leukodystrophien haben einen Rückgang der Myelinisierung (Demyelinisierung) und letztendlich ein Absterben der Oligodendrozyten sowie der assoziierten Neurone zur Folge. Oligodendrozyten können in jedem Alter aus Oligodendrozyten Vorläuferzellen (OPC) differenzieren. Die OPC an sich bilden darüber hinaus eine stabile Zellpopulation. Auf die genaue Funktion der OPC wird im Folgenden eingegangen, da diese im Focus dieser Arbeit stehen.

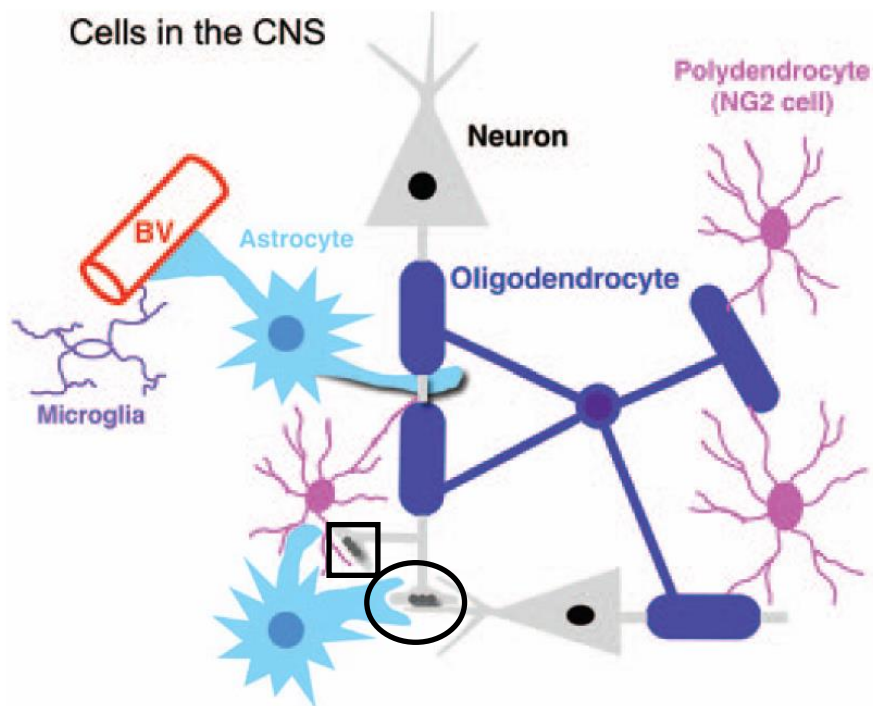


Abbildung 2.1-1: Zelltypen im ZNS.

Die Übersicht zeigt alle Zelltypen des ZNS und deutet deren anatomischen und physiologischen Interaktionen an. So sind neben Neuronen, die untereinander über Synapsen verschaltet sind, alle Haupttypen von Gliazellen dargestellt. Astrozyten bilden das Hauptbindeglied zwischen hämatopoetischem System und dem ZNS (BV = Blutgefäß (Blood vessel)). Desweiteren umschließen ihre Fortsätze Neuron-Neuron Synapsen (Tripartite synapse (schwarzer Kreis)). Über die Rolle der nicht aktivierten sog. ruhenden Microglia ist sehr wenig bekannt. Oligodendrozyten sind in der Lage mehrere Axone mehrfach mit ihrer Zellmembran zu umwickeln, was als Myelinschicht bezeichnet wird. Die OPCs (NG2+ Zellen/Polydendrozyten) bilden eine eigene Zellpopulation im adulten ZNS, sie können zu Oligodendrozyten differenzieren und sind von Neuronen synaptisch innerviert (schwarzes Quadrat). (Modifiziert nach (Nishiyama, 2007)).

## 2.2 Besonderheiten der OPC

Eine besondere Rolle innerhalb der Gruppe von Gliazellen nehmen die Oligodendrozyten-Vorläuferzellen (OPC) ein. Dieser Zelltyp gehört im engeren Sinne zur Gruppe der

Oligodendrozyten, unterscheidet sich aber von einem reifen Myelin bildenden Oligodendrozyten in wesentlichen Punkten. So exprimieren diese keine typischen Myelinproteine wie MBP, PLP, MOG oder MAG, Oberflächenproteine wie NG2 oder PDGFR $\alpha$  hingegen sind innerhalb des ZNS nur auf OPC vorhanden (Abbildung 2.1-1)(Dawson et al., 2000; Dimou et al., 2008; Nishiyama, 2007; Nishiyama et al., 1996). Deshalb werden letztere auch häufig verwendet um OPC zu identifizieren, in der Literatur und dieser Arbeit werden OPC desweiteren auch als NG2+ Zellen/Glia bezeichnet (Trotter et al., 2010). Dabei ist zu beachten, dass mit NG2+ Zellen, strenggenommen alle NG2 exprimierenden Zellen gemeint sind, welches Vorläuferzellen anderer Gewebe, wie beispielsweise Fibro- oder Myoblasten (Levine and Nishiyama, 1996), sowie bestimmte Tumorzellen (2.2.5), mit einschließt. Desweiteren sind Perizyten als Bestandteil des Blutgefäßsystems durch eine Expression von NG2 und PDGFR $\beta$  charakterisiert (Ozderdem et al., 2002). Durch die hohe Anzahl an Blutgefäßen im Nervengewebe, stellen diese neben den OPC eine NG2+ Zellpopulation da zwischen deren Einflüssen es zu unterscheiden gilt.

OPC machen etwa 5 % der Gesamtzellzahl im ZNS aus (Gallo et al., 2008) und bildet nach abgeschlossener Myelinisierung eine konstante Zellpopulation in jedem Alter. Die bedeutendsten physiologischen Eigenschaften dieser Zellen sind in den folgenden Unterkapiteln aufgeführt.

### 2.2.1 Neuron-Glia Synapse

Im Jahr 2000 erfolgte die erste Beschreibung einer glutamatergen synaptischen Verbindung zwischen Neuronen aus der CA3 Region des Hippocampus zu OPC in der CA1 Region (Bergles et al., 2000). Dies wurde unabhängig von anderen Gruppen bestätigt (Jabs et al., 2005). In den folgenden Jahren wurden auch GABAerge Synapsen beschrieben (Lin and Bergles, 2004), wobei sich diese synaptischen Verbindungen neben dem Hippocampus auch im Cortex, *Corpus callosum* und Cerebellum nachweisen ließen (Kukley et al., 2007; Kukley et al., 2008; Lin et al., 2005; Ziskin et al., 2007). Die weiteren elektrophysischen Eigenschaften der synaptisch innervierten OPC, sind zum Teil unterschiedlich beschrieben, so gibt es Studien, die Aktionspotentiale (AP) in NG2+ messen (Ge et al., 2009; Karadottir et al., 2008). Dies konnte aber von den Arbeitsgruppen welche ursprünglich von diesem Synapsen-Typ berichtet haben, bis heute nicht bestätigt werden. Auch die Beschreibung von Veränderungen in der synaptischen Signalübertragung, wie es durch die Langzeitpotenzierung (LTP) aus Neuronen bekannt ist, konnte in OPC bis dato nur von einer Gruppe gezeigt werden (Ge et al., 2006).



Weitestgehend ungeklärt ist bis heute die genaue Funktion bzw. physiologische Relevanz, die diesen synaptischen Innervierungen und den daraus resultierenden elektrischen Vorgängen zu Grunde liegt. Zwar weiß man, dass die synaptischen Verbindungen verschwinden, wenn die Zellen anfangen zu differenzieren (Etxeberria et al., 2010) und es gibt eine erste Studie, die axonale Glutamatfreisetzung mit dem Myelinbildungsprozess in Zusammenhang bringt (Wake et al., 2011). Zudem scheint die Innervierung während der Entwicklung etwa des Barrel Cortex eine wesentliche Rolle bei der Positionierung der OPC zu spielen (Mangin et al., 2012). Darüber hinaus gibt es allerdings nur Spekulationen über mögliche physiologische Funktionen. So werden in Sakry et al. (Sakry et al., 2011) verschiedene Möglichkeiten einer NG2<sup>+</sup> Zellantwort diskutiert. Erste Studien konnten bereits zeigen, dass lokale axonale Glutamatfreisetzung zu einer Änderung in intrazellulären Ca<sup>2+</sup> Leveln in den Fortsetzen von OPC führt (Haberlandt et al., 2011; Hamilton et al., 2010), was ein mögliches Signal für Änderungen in der Genexpression darstellen könnte. Desweiteren könnte die synaptische Innervierung der OPC zu einer Freisetzung von neuromodulatorischen Substanzen führen, was ebenfalls Ca<sup>2+</sup> abhängig erfolgen könnte. Auch die Reaktion von OPC auf verschiedenste Läsionen (Kap. 2.2.4) könnte zum Teil durch diese spezielle Art von Synapse reguliert werden, da diese eine Möglichkeit bietet um Beschädigungen im Neuronalen Netzwerk wahrzunehmen.

### 2.2.2 Zellteilung / Differenzierung

Eine besondere Rolle nehmen OPC in Bezug auf ihre Zellteilungsaktivität ein. So sind im adulten ZNS von Säugern alle anderen Zelltypen postmitotisch, bis auf einige Stammzellen die lokal aber sehr auf die subventrikuläre Zone (SVZ) und die subgranular Zone (SGZ) im Hippocampus beschränkt sind. Somit sind OPC im unbeschädigten ZNS der einzige Zelltyp, der in jeder Region eine Zellteilung aufweist. OPC besitzen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung, wie es für eine Vorläuferzelle üblich ist. Die Plastizität der Zellen betreffend, ist die Differenzierung zu myelinisierenden Oligodendrozyten der am besten charakterisierte Differenzierungsschritt (Aguirre and Gallo, 2004; Dimou et al., 2008). Auch für die Reifung in Astrozyten zumindest in der grauen Substanz gibt es Studien (Nishiyama et al., 2009; Zhu et al., 2008). Ob OPC auch zu Neuronen differenzieren können ist zumindest *in vivo* im Feld nicht geklärt (Richardson et al., 2011). Diese Frage ist nicht ganz unerheblich, weil NG2<sup>+</sup> Zellen dadurch zur adulten Stammzellen würden, die per Definition neben der Fähigkeit zur Selbsterneuerung zu allen Zelltypen des entsprechenden Gewebes differenzieren können. Nicht geklärt ist ob die Differenzierung in Oligodendrozyten bereits mit der Zellteilung initiiert wird. Hierfür gibt es Berichte für eine symmetrisch als auch asymmetrische Teilung von OPC. Demnach entstehen bei der symmetrischen Teilung zwei NG2<sup>+</sup> Tochterzellen, bei der asymmetrischen Teilung hingegen nur eine NG2<sup>+</sup> Tochterzelle wobei die andere direkt zum Oligodendrozyten heranreift (Sugiarto et al., 2011).

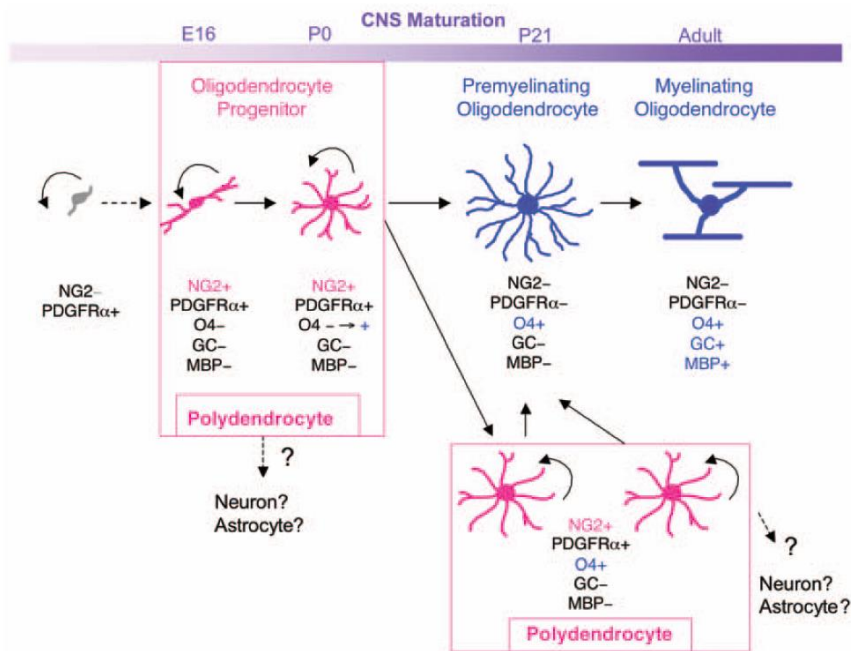


Abbildung 2.2-1: Differenzierung von OPCs während der Entwicklung und im Erwachsenenalter.

Das Schema zeigt die unterschiedlichen Differenzierungsstufen innerhalb der Oligodendrozyten-Linie anhand der Expression verschiedener entwicklungspezifischer Marker. OPC (NG2+ Zellen/Polydendrozyten) spielen während der Entwicklung im speziellen der Myelinisierung eine zentrale Rolle. Im adulten Entwicklungsstadium, stellen sie eine stabile Zellpopulation dar, die nur zum Teil zu Oligodendrozyten reift. Die mögliche Differenzierung zu Astrozyten und Neurone konnte noch nicht abschließend geklärt werden. (nach (Nishiyama, 2007))

### 2.2.3 Migration

OPC migrieren während der frühen Entwicklung und im adulten Organismus zu den Axonen, an denen sie zu reifen Oligodendrozyten ausdifferenzieren, was mit der Myelinisierung dieser Axone einhergeht (Aguirre et al., 2007; Sugimoto et al., 2001). Eine jüngste Studie zeigt weiterhin, dass das NG2 Protein die Zellpolarität beeinflussen kann indem es FGF abhängig den Signalweg von kleinen GTPasen beeinflusst, die maßgeblich am Polarisierungs- / Migrationsprozess beteiligt sind. Interessanterweise findet sich eine geänderte Polarisierungsfähigkeit von OPC in der NG2-EGFP -/- Maus nur unter Läsionsbedingungen, nicht jedoch während der OPC Migration im RMS während der Entwicklung. Dies korreliert mit einem FGF-Gradienten, der von der Läsionsseite ausgeht (Biname et al., 2013). Mittels modernster Mikroskopie-Methoden konnte mit sog. *live imaging* von OPC die gerichtete Migration zu einer Läsion gezeigt werden (Hughes et al., 2013).

## 2.2.4 Läsionen

Im Fall einer Beschädigung des ZNS, so wie sie durch unterschiedliche Läsionsmodelle in der Maus dargestellt werden kann, reagieren OPC unmittelbar, indem sie ihre Teilungsrate erhöhen und zum Teil zum lädierten Areal migrieren. So sind beispielsweise 2-3 Tage nach einer *stab wound* (SW) im somatosensorischen Cortex Microglia und OPC die einzigen sich teilenden Zellen. Erst nach etwa 7 Tagen sind teilungsaktive Astrozyten nachweisbar, nach einigen Wochen ist zudem eine Differenzierung der OPC zu Oligodendrozyten feststellbar (Dimou et al., 2008; Simon et al., 2011). In demyelinisierten fokalen Läsionen im Mausmodell (ein Mausmodell u.a. für Multiple Sklerose) migrieren OPC zu demyelinisierten Axonen um diese wieder zu remyelinisieren (Aguirre et al., 2007). Neben einer erhöhten Proliferation und Differenzierung zu Oligodendrozyten ist wenig bekannt über die physiologische Rolle der OPC in beschädigtem Nervengewebe, aus den zuvor genannten Gründen werden diese aber bereits zur Glianarbe (*glial scar*) gezählt. Eine besondere Rolle wird in diesem Zusammenhang dem proteolytisch abgespaltenen extrazellulären Teil des NG2 Proteins zugeschrieben (siehe 2.3.2)(Asher et al., 2005; Hunanyan et al., 2010; Jones et al., 2002; Tan et al., 2005).

## 2.2.5 Tumorbildung

Die Zellteilungsaktivität der OPC macht diese besonders anfällig für Mutationen im Vergleich zu den restlichen postmitotischen Zellen im ZNS. Allerdings war die genaue Rolle der OPC bei der Tumorentstehung von Gliomen (von Gliazellen abgeleiteten Tumoren) lange Zeit unklar. Schon länger bekannt war hingegen, dass einige Zellen von besonders aggressiven Gliomen/Melanomen das NG2 Protein exprimieren (Campoli et al., 2010; Iida et al., 1995). Eine neue Studie konnte mit Hilfe eines genetischen Mausmodells und chemisch induzierten Tumoren zeigen, dass Gliome auf eine Mutation in OPC zurückzuführen sind (Liu et al., 2011), dies macht OPC zum Ursprungszelltyp von Gliomen. Nach bisheriger Sicht waren Astrozyten Ursprung für die meisten Gliome (O'Brien et al., 2013). In einer weiteren Studie konnte der Einfluss von NG2 auf den Teilungsmodus von OPC gezeigt werden, wobei OPC mit ausgeschaltetem NG2 Protein sich vermehrt symmetrisch teilen und eine höhere Mutationsrate aufweisen (Sugiarto et al., 2011). Durch diese jüngsten Entdeckungen, rücken OPC in den Fokus der Tumorforschung, wobei auch das NG2 Protein eine zentrale Rolle spielt, besonders in Bezug auf die Zellteilung.

## 2.3 Das NG2 Protein

Das NG2 Protein wurde erstmals 1977 von Stallcup in der Ratte beschrieben (Stallcup, 1977). Dabei beschreibt der Name Nerv-Glia Antigen 2 (NG2), die zunächst unklare Zuordnung zu den Hauptzelltypen des ZNS. Wie sich herausstellte, gibt es entsprechende Homologe in der Maus (AN2, (Niehaus et al., 1999)) und im Menschen (MCSG, (Eisenmann et al., 1999)). Auch in Invertebraten sind Homologe (Kon-tiki/Perdido) nachgewiesen worden, wie in *D. melanogaster* (Estrada et al., 2007; Schnorrer et al., 2007). Neben OPC des ZNS (2.2) und bestimmter Tumore (2.2.5) wird NG2 auf Vorläuferzellen verschiedener Gewebe (2.2) exprimiert. Der Kon-tiki (NG2) *knock-out* in *D. melanogaster* ist im larvalen Stadium letal (Schnorrer et al., 2007), die NG2 *knock-out* Maus zeigt hingegen keine Letalität (Karram et al., 2008).

Das zur *chondroitin sulfate proteoglycan* (CSPG) Familie gehörende NG2 (Genname: CSPG4) stellt mit seiner Eigenschaft als Typ-1 Membranprotein eine Ausnahme in der CSPG Familie da, die hauptsächlich aus sezernierten Proteinen ohne Transmembrandomäne besteht (Kwok et al., 2008). Die sezernierten CSPGs sind funktioneller Bestandteil der Extrazellulären Matrix (ECM) (Bartus et al., 2012). Durch die Abspaltbarkeit und Präsenz des extrazellulären Teils von NG2 innerhalb der ECM, kann dieser Teil von NG2 ebenfalls als Bestandteil der ECM gesehen werden (Kap.2.3.2). Dadurch ergibt sich für NG2 eine Doppelfunktion innerhalb der CSPGs, da es sowohl außerhalb wie auch innerhalb der Zelle eine funktionelle Rolle einnimmt.

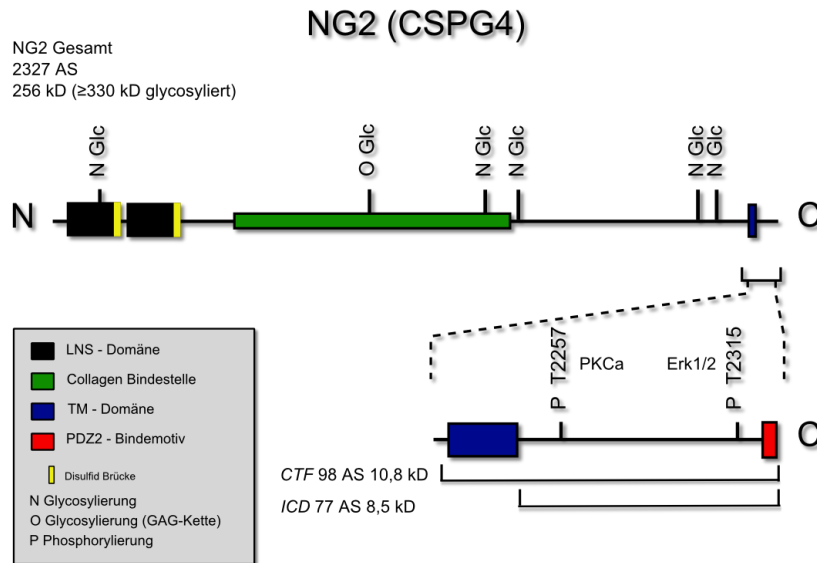


Abbildung 2.3-1 Struktur des NG2 Proteins.

Das murine NG2 Protein besteht aus 2327 AS, wobei sich lediglich die ~98 C-terminalen AS (CTF) innerhalb des Zytoplasmas bzw. der Zellmembran befinden. Der sich im Zytoplasma befindende Teil (ICD) umfasst 77 AS. Somit sind die verbleibenden 2229 AS extrazellulär lokalisiert. Neben zwei konservierten LNS Domänen umfasst der extrazelluläre Teil zahlreiche Glykosylierungsstellen, wobei lediglich eine davon eine O-glykosidische Bindung zulässt (GAG-Kette). Der intrazelluläre Teil besitzt zwei physiologisch relevante Phosphorylierungsstellen (T2257 und T2315). Zudem finden alle bisher bekannten Protein-Protein Bindungen über das C-terminale PDZ2 Bindemotiv statt (siehe 2.3.1).

### 2.3.1 Funktion des intrazellulären Teils von NG2

Für die Interaktion mit Protein Bindepartnern innerhalb des 77 AS (160 AS Drosophila) umfassenden zytoplasmatischen Teils von NG2 ist bisher nur das C-terminale PDZ Bindemotiv (QYZ) bestätigt worden. Folgende Bindepartner konnten für dieses Motiv identifiziert werden. MUPP1 ein 13 PDZ Domänen enthaltendes Protein mit zahlreichen Signalfunktionen (Barritt et al., 2000), Syntenin steht mit dem Einfluss von NG2 auf die Migration in Zusammenhang (Chatterjee et al., 2008), GRIP1 bindet gleichzeitig NG2 und die zweite Untereinheit des Glutamaterezeptors (GluR2) (Stegmuller et al., 2003) und OMI steht mit der anti-apoptotischen Wirkung von NG2 in Zusammenhang (Maus et al., in prep). Das identische PDZ Bindemotiv sowie die Interaktion mit GRIP (Dgrip) konnten bereits in Drosophila bestätigt werden (Estrada et al., 2007; Schnorrer et al., 2007). Weiterhin beinhaltet diese Region zwei bestätigte Phosphorylierungsstellen Thy 2257 und 2315. Erstere ist Ziel der Pyruvat Kinase C (PKC), letztere von RhoA. Ein Einfluss auf die entsprechenden Signalwege konnte dementsprechend gezeigt werden (Makagiansar et al., 2004; Makagiansar et al., 2007). Darüber hinaus gibt es bis heute keinen Nachweis über weitere Interaktionen oder einen Abspaltbarkeit des intrazellulären Teils von NG2 in der Literatur.

### 2.3.2 Funktion des extrazellulären Teils von NG2

Wie in Abbildung 2.3-1 illustriert, sind über 95% des NG2 Proteins extrazellulär lokalisiert. Die einzigen konservierten Proteindomänen in diesem Teil sind zwei *laminin neurexin like domains* (LNS), die jeweils eine Disulfidbrückenbindung innerhalb derselben Domäne aufweisen. Direkte Bindepartner für diese Domänen sind bis heute nicht bekannt (Trotter, 2005). Allerdings entsprechen diese in ihrer Struktur genau den Laminin G-Domänen, die zum ersten Mal auf Lamininen nachgewiesen wurden (Tisi et al., 2000). Die isolierten G-Domänen haben strukturelle und funktionelle Ähnlichkeiten mit Proteinen der Neurexin Familie (Beckmann et al., 1998; Rudenko et al., 2001), von denen viele neuromodulatorische Effekte aufweisen und mit der Stimulation des Neuriten Auswuchs in Verbindung gebracht werden (Ichikawa et al., 2005). Dies legt die Vermutung nahe, dass auch die LNS Domänen des extrazellulären Teils von NG2 bereits im isolierten Zustand einen entsprechenden Einfluss auf Neurone haben könnten. NG2 weist außerdem einen hohen Glykosylierungsgrad auf, weshalb das exakte Molekulargewicht schwer zu bestimmen ist. Das Molekulargewicht des Gesamtproteins ohne Zuckerketten beträgt 252 kD, wobei die biologisch isolierbare Form meist mit 300 kD angegeben wird. Die meisten N-Glykosylierungsstellen sind nicht bestätigt, allerdings gibt es eine O-Glykosylierungsstelle, welche die Bindung von Glykosaminoglykan Ketten (GAG-Ketten) ermöglicht, welche typisch für die Mitglieder der CSPG Familie sind. Diese sulfathaltigen GAG-Ketten, verfügen wiederum über zahlreiche Verzweigungen und Modifikationsmöglichkeiten (Mikami and Kitagawa, 2013).

Für die bekannten Funktionen der NG2 Ektodomäne, gibt es unterschiedliche Berichte. Generell scheinen die isolierten LNS Domänen einen stimulierenden Einfluss auf das Neuritenwachstum zu haben (Ichikawa et al., 2005), wohingegen die NG2 Ektodomäne samt Glycosylierung als inhibitorisch für entsprechendes Wachstum beschrieben wird und sogar die neuronale Signalübertragung von gesunden Axonen stören kann (Busch et al., 2010; Davies et al., 2004; Hunanyan et al., 2010). Dies ist besonders bei Rückenmarksverletzungen relevant, da dort die *glial scar* ein Zusammenwachsen der durchtrennten Axone verhindert. Interessanterweise lässt sich das Zusammenwachsen der Axone durch den Verdau der Zuckerketten (ChondroitinaseABC) der CSPGs verbessern (Novotna et al., 2011).

Die bisher bekannten Bindepartner des extrazellulären Teils von NG2 sind zum Teil Bestandteile der ECM, Kollagen V&VI (Tillet et al., 1997),  $\beta 1$  Integrin (Makagiansar et al., 2004) sowie Galektin-3 (Fukushi et al., 2004). Darüber hinaus sind Wachstumsfaktoren wie PDGF oder FGF-2 bzw. genauer deren Rezeptoren (PDGFR $\alpha$  und FGFR) beschrieben, für die es Untersuchungen gibt, die eine Interaktion von NG2 als Co-Rezeptor für eine vereinfachte Bindung des entsprechenden Liganden beschreiben (Goretzki et al., 1999; Nishiyama et al., 1996). Wie eine aktuelle Veröffentlichung zeigt, kann diese Funktion auch vom extrazellulären Teil von NG2 ohne Transmembran Domäne herbeigeführt werden (Cattaruzza et al., 2012).

Der Nachweis des abgespaltenen, extrazellulären Teils von NG2 findet sich schon seit 1995 in der Literatur (Nishiyama et al., 1995), wobei zwei Spaltprodukte dominieren, eine 290 kDa und eine 275 kDa große Form. Beide Spaltprodukte lassen sich sowohl aus nicht pathologischem ZNS Gewebe, als auch aus lädiertem ZNS Gewebe isolieren, wobei das größere Produkt dominiert. Mehrere Publikationen berichten außerdem von einer Zunahme dieses Spaltprodukts innerhalb von lädiertem Gewebe ((Asher et al., 2005), mögliche Funktionen siehe oben). Bisher ist für das 290 kD große Spaltprodukt noch kein Nachweis über eine physiologische Funktion vorhanden die spezifisch für genau diese Form des Proteins ist. Da diese Form von entscheidender Rolle innerhalb dieser Studie ist, wird sie künftig als Ektodomäne bezeichnet. Über die an der Erzeugung der Ektodomäne beteiligten Proteasen gibt es im Falle des 290 kDa Spaltprodukts ebenfalls keine Erkenntnisse, wohingegen das 275 kDa große Spaltprodukt von MMP-9 erzeugt werden kann (Larsen et al., 2003), wobei eine Sezernierung von MMP-9 unter *in vivo* Bedingungen in hohem Maße läsionsspezifisch erfolgt (Gveric et al., 2001).

## 2.4 Die proteolytische Prozessierung von Typ-1 Membranproteinen

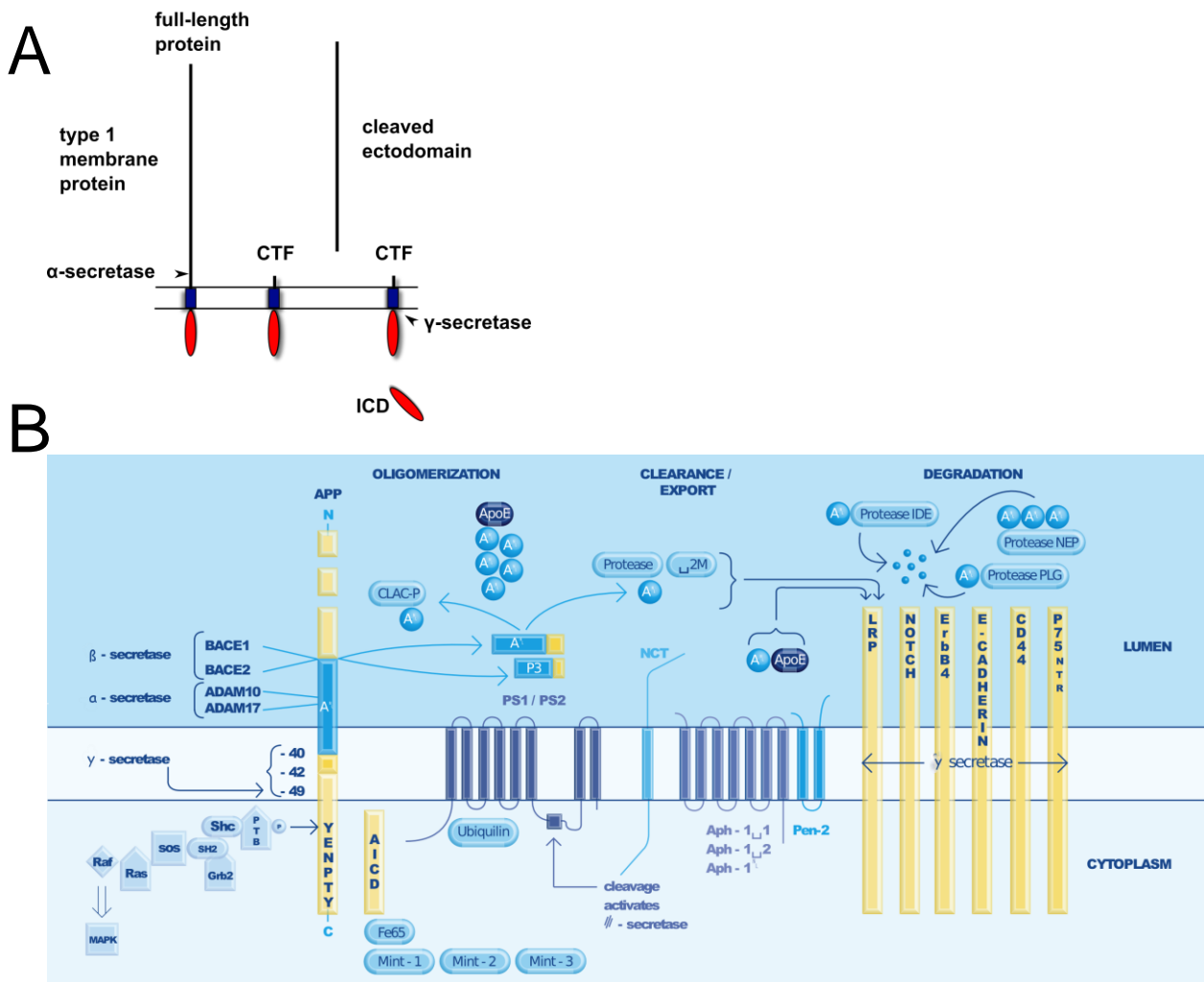


Abbildung 2.4-1 Prozessierung von Typ-1 Membranproteinen.

**A** Schematische Darstellung der Prozessierung eines Typ-1 Membranproteins durch α- und γ-Sekretase. **B** APP Prozessierung und bekannte Interaktionspartner (Quelle: Abcam).



### 2.4.1 Die Prozessierung

Für das mit der Alzheimerschen Krankheit (AD) in Verbindung stehende *amyloid precursor protein* (APP) konnte eine sequenzielle Spaltung gezeigt werden. Diese wird zunächst durch eine  $\alpha$ - oder  $\beta$ -Sekretase und anschließend durch den  $\gamma$ -Sekretase Komplex ausgeführt (Chow et al., 2010)(Abbildung 2.4-1 B). Dabei findet die erste Spaltung in einer Region unmittelbar an der Zelloberfläche statt und setzt den extrazellulären Teil des Substratproteins frei, welcher auch als Ektodomäne bezeichnet wird. Der verbleibende membrangebundene C-terminale Rest wird allgemein als C-terminales Fragment (CTF) bezeichnet, welches hauptsächlich aus der Transmembrandomäne und dem intrazellulären Teil des Proteins besteht (Lahiri et al., 2002). Die an der Erzeugung der Ektodomäne beteiligten Proteasen bezeichnet man in diesem Zusammenhang auch als *Sheddases* bzw den entsprechenden Vorgang als *shedding* (engl. to shed = abwerfen)(Saftig and Reiss, 2011).

Der intrazelluläre Teil wiederum kann durch die anschließende  $\gamma$ -Sekretase Prozessierung innerhalb der Transmembran Domäne oder den ersten AS des intrazellulären Teils, freigesetzt werden und wird als intrazelluläre Domäne (ICD) bezeichnet (Abbildung 2.4-1 A). Dieser sequentielle Prozessierungsmechanismus hauptsächlich durch  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Sekretase konnte für zahlreiche andere Typ-1 Membranproteine gezeigt werden darunter Notch1, L1, N-Cadherin (De Strooper et al., 1999; Kohutek et al., 2009; Riedle et al., 2009). Das *Shedding* der Ektodomäne und die Prozessierung durch den  $\gamma$ -Sekretase Komplex scheint ein genereller Mechanismus zur Spaltung von Typ-1 Membranproteinen zu sein (Prox et al., 2012).

Die drei möglichen Spaltprodukte können nach deren Generierung unterschiedliche Funktionen übernehmen. So kann die Ektodomäne in ihrer löslichen Form theoretisch überall im entsprechenden Gewebe eine Funktion ausüben, sei es auf demselben oder anderen Zelltypen oder auch der Extrazellulären Matrix (ECM), die spezifische Rolle der Ektodomänen ist jedoch in den seltensten Fällen bekannt. So konnte für die Adhäsionsmoleküle N-Cadherin und Neuroligin-1 eine aktivitätsabhängige Spaltung gezeigt werden, die entsprechenden Ektodomänen beeinflussen dabei die synaptische Übertragung (Malinverno et al., 2010; Peixoto et al., 2012; Suzuki et al., 2012). Eine weitere Folge des Ektodomänen *Shedding* ist zudem eine geänderte Zelloberfläche an der Ursprungszelle, welches Folgen haben kann, wenn es sich bei dem Substrat um einen Rezeptor, ein Adhäsionsprotein oder Erkennungsmolekül handelt. Über die Rolle der CTFs gibt es bis heute ebenfalls wenige Erkenntnisse. So scheinen die CTFs mancher Substrate stabilisiert zu sein (Lahiri et al., 2002), der Nachweis über reine CTF spezifische Funktionen blieb bis heute jedoch weitestgehend aus. Ganz anders sieht es für die Funktionen der ICDs aus, wobei Notch hier ein gutes Beispiel ist. So besitzt die Notch-ICD (NICD) eine DNA-Bindedomäne und fungiert in Zusammenarbeit mit anderen nukleären Faktoren im Zellkern als Transkriptionsfaktor und leistet so einen grundlegenden Teil zum besonderes während der Entwicklung relevanten Notch Signalweg bei (De Strooper et al., 1999; Lieber et al., 2002; Wen et al., 1997; Zolkiewska, 2008). Entsprechend dem Vorbild der NICD gibt es zahlreiche Studien zu anderen Substraten der  $\gamma$ -Sekretase, die ähnliche nukleäre Signalwirkung für die

entsprechende ICD vorderen. Die ICD von APP (AICD) zum Beispiel scheint insbesondere nach Interaktion mit Fe65 starke nukleäre Lokalisation zu aufzuweisen (Cao and Sudhof, 2001; Minopoli et al., 2001). Auch für die ICD von L1 und Neuroligin-1 konnte eine Kernlokalisierung gezeigt werden (Riedle et al., 2009; Suzuki et al., 2012). Außer Notch besitzt jedoch keine ICD dieser im ZNS relevanten Moleküle eine DNA-Bindedomäne. Darüber hinaus konnten für diese bis heute noch keine Zielgene identifiziert werden, welches für eine Rolle in einem Transkriptionskomplex sprechen würde.

Ein weiterer Aspekt des aufgeführten Prozessierungsmechanismus von Typ-1 Membranproteinen, ist die genaue subzelluläre Lokalisierung. So geht man bei der klassischen Betrachtung dieses Vorgangs davon aus, dass dieser an der äußeren Zellmembran stattfindet, was zu einer extrazellulären Ektodomäne und einer zunächst zytoplasmatischen ICD führt. Einige Studien konnten jedoch zeigen, dass sowohl in intrazellulären Kompartimenten wie dem ER oder Golgi Sekretasen aktiv sein können (Blauwueller et al., 1997; Tomita et al., 1998), als auch in sezernierten Membranvesikeln (sog. Exosomen) die der Zell-Zell Interaktion dienen (Rajendran et al., 2006).

### 2.4.2 Die beteiligten Proteasen

Die beiden Mitglieder der *A disintegrin and metalloproteinase* (ADAMs) Familie, ADAM 10 und 17, konnten als  $\alpha$ -Sekretasen identifiziert werden (Asai et al., 2003; Lammich et al., 1999), dabei handelt es sich um Metalloproteasen ( $Zn^{2+}$  Proteasen), die selbst Typ 1 Membranproteine sind. Diese werden in einer proteolytische inaktiven Pro-Form exprimiert und später durch zum Teil autokatalytische Abspaltung der N-terminalen Prodomäne aktiviert (*mature form*). Die genauen Regulationsmechanismen der Aktivierung sind zur Zeit noch unzureichend erforscht, allerdings scheint ADAM 10 generell eine konstitutive proteolytische Aktivität zu haben, wohingegen ADAM 17 in höherem Maße aktivierungsabhängig agiert. Bei der  $\beta$ -Sekretase handelt es sich ebenfalls um ein Typ-1 Membranprotein, welches Aspartatprotease Funktion aufweist und im Falle von APP mit leicht geänderter Spaltstelle als alternative Prozessierung zur  $\alpha$ -Sekretase auftritt (Wang et al., 2013). In *Drosophila* gibt es ebenfalls eine vergleichbare Proteaseaktivität durch das Typ-1 Membranprotein Kuzbanian, dieses kommt von seiner Struktur der  $\alpha$ -Sekretase ADAM 10 am nächsten (Rooke et al., 1996). Der  $\gamma$ -Sekretase Komplex besteht aus mindestens vier essentiellen Membranproteinen, Presenilin, Nicastrin, APH-1 und PEN-2 (Tolia and De Strooper, 2009). Auch hier ist nur wenig über die Regulation der Proteaseaktivität des Komplexes bekannt. Allerdings scheint das *Shedding* der Ektodomäne obligatorisch für die darauffolgende  $\gamma$ -Sekretase Prozessierung zu sein, welche anschließend zum Großteil konstitutiv aktiv von statten geht. Wie bei den bekannten *Sheddases* ist die Spaltstelle regionsspezifisch und nicht sequenzspezifisch.

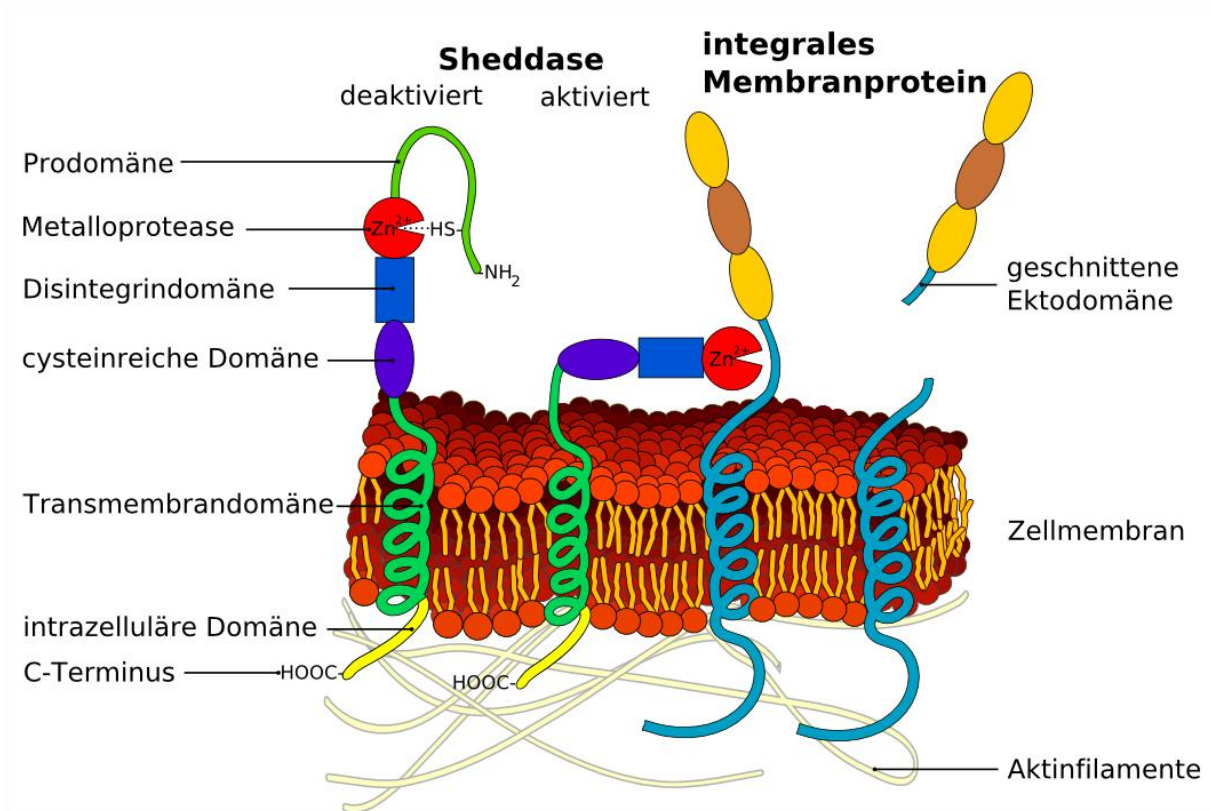


Abbildung 2.4-2 Shedding eines Typ-1 Membranproteins.

Sheddasen sind Typ-1 Membranproteine, die nach ihrer Aktivierung andere Typ-1 Membranproteine unmittelbar an der Zellmembran schneiden können. Dabei wird der extrazelluläre Teil des Substratproteins freigesetzt, welcher eine physiologische Funktion erfüllen kann (Ektodomäne), was als shedding bezeichnet wird. Sheddasen sind unter anderem Proteasen aus der ADAMs Familie wie ADAM 10 u 17. (Abb. von wikipedia.org)

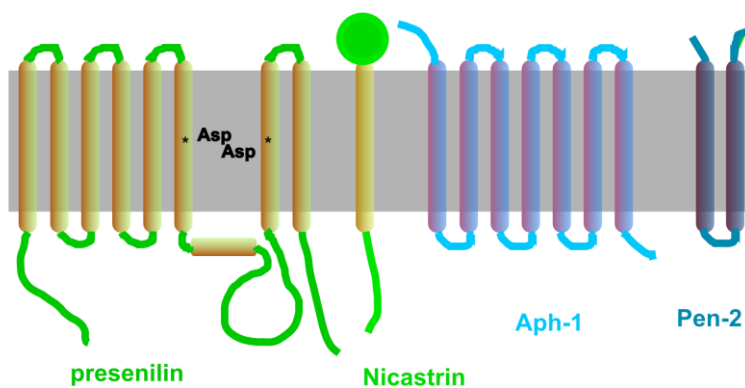


Abbildung 2.4-3 Struktur der  $\gamma$ -Sekretase.

Die vier Membranproteine Presenilin, Nicastrin, Aph-1 und Pen-2 sind essentieller Bestandteil des  $\gamma$ -Sekretase Komplexes. (Google Images)

## 2.5 Ziel der Studie

Im Fokus dieser Studie stehen die zu den Gliazellen zählenden OPC, sowie das von diesen exprimierte Typ-1 Membranprotein NG2. Dieses wird auf eine Prozessierung durch  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Sekretase, in Analogie zu Proteinen wie Notch oder APP, untersucht.

Eine solche Prozessierung ginge mit zusätzlichen intrazellulären Spaltprodukten neben der Ektodomäne einher. Da OPC mit dem Neuronalen Netzwerk durch synaptische Innervierungen in Verbindung stehen, stellt sich die Frage, ob diese mit der Spaltung von NG2 in Verbindung gebracht werden können. Dazu käme mechanistisch beispielsweise eine aktivitätsabhängige Regulierung der Proteolyse, wie sie jüngst für das neuronale synaptische *cell adhesion molecule* Neuroligin gezeigt werden konnte, in Frage. Zudem werden eine physiologische Rolle der NG2 Ektodomäne bzw. der möglichen intrazellulären Fragmente untersucht. Insbesondere potentielle neuromodulatorische Funktionen sind hier von Interesse, da diese die OPC tiefer in das Neuronale Netzwerk integrieren würden. Die Existenz eines NG2 Homologes in *D. melanogaster*, wirft weiterhin die Frage auf, in wie weit diese Mechanismen in diesem Modellsystem konserviert sind.

In Analogie zur Lokalisierung von Markerproteinen an Neuron-Neuron Synapsen *in vivo*, ergibt sich die Frage ob sich die synaptischen Verbindungen zwischen Neuronen und OPC in ähnlicher Weise darstellen lassen.

Ein Charakteristikum von OPC ist die Teilungsaktivität in sich entwickelnden und adulten Säugern. Zudem gibt es Evidenzen für direkte funktionelle Verknüpfungen zwischen dem NG2 Protein und dem Teilungsmodus der OPC. Deshalb war ein weiteres Ziel mögliche Änderungen in der Zellteilung der OPC, die mit dem NG2 Protein in Verbindung stehen könnten, in NG2  $-/-$  Mäusen zu untersuchen.

### 3 Material und Methode

#### 3.1 Geräte und Software

##### 3.1.1 Mikroskope

Modell	Hersteller
DMLB	Leica, Wetzlar
DM6000	Leica, Wetzlar
TCS SP5	Leica, Wetzlar (Institut Anatomie und Neurobiologie, Mainz) (IMB, Mainz)

Tabelle 3.1-1 Mikroskope

##### 3.1.2 Zentrifugen

Modell	Hersteller
3K20	Sigma-Aldrich, München
Biofuge 17RE	Heraeus, Hanau
Biofuge fresco	Heraeus, Hanau
Megafuge 1.0 R	Heraeus, Hanau
Optima TM MAX-E u 100	Beckman, München
Rotoren: TLA-55, SW40-Ti	

Tabelle 3.1-2 Zentrifugen

##### 3.1.3 Sonstige Geräte

Gerät	
Elektrophoresekammer	Biorad, München
Gel-Elektrophoresekammer, NuPAGE	Invitrogen, Karlsruhe
Geldokumentor	Raytest
StepOne qRT-PCR	Applied biosystems
PCR-Cycler	Biometra, Thermocycler
Nucleofector II	AMAXA, Köln
Photometer	Ultrospec 2100 Pro
Spezielles Photometer	Nanodrop
Gewebshomogenisator	PotterS
Plattenlesegerät	Tecan Infenite200
GentleMACS	Miltenyi
TubeRotator	Miltenyi

Tabelle 3.1-3 Sonstige Geräte

##### 3.1.4 Software

Software	Funktion	Hersteller/Lizenz
Image J	Bildbearbeitung	NIH, Bethesda, Maryland
LAS AF	Mikroskopsteuerung &	Leica, Wetzlar

	Bildbearbeitung	
GIMP 2.6	Bildbearbeitung	GPL
Inkscape	Bildbearbeitung	GPL
OpenOffice 3.0	Office	LGPL, Apache Software Foundation
MicrosoftOffice 2010	Office	Microsoft, Redmond
Bibus, EndNote X4	Literaturverwaltung	GPL, Thompson Reuter
CloneManager	Plasmid Karten	Scientific and educational Software

Tabelle 3.1-4 Software

## 3.2 Chemikalien und Reagenzien

### 3.2.1 Proteaseinhibitoren

Bezeichnung	Zielprotease	Quelle
Roche complete (PI)	Inhibitor Mix	Roche, Mannheim
GI254023X	ADAM 10	Prof. Ludwig, Aachen
GW280264X	ADAM 17	Prof. Ludwig, Aachen
DAPT	$\gamma$ -Sekretase	Sigma-Aldrich, München
GM6001	Metalloproteasen	Merck, Darmstadt

### 3.2.2 Kits & Marker

Kit	Hersteller
PureLink HiPure Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
PureLink Quick Plasmid Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
Gelextraction	Invitrogen, Karlsruhe
PCR-Purification	Invitrogen, Karlsruhe
RNeasy Plus Mini Kit	Qiagen, Hilden
QuantiTect Reverse Transcription Kit for cDNA	Qiagen, Hilden
Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit	Roche, Mannheim
SilverQuest-Kit	Invitrogen, Karlsruhe
BCA-kit	Merck, Darmstadt
DNA	
SeeBlue2 Pre-stained	Invitrogen, Karlsruhe
NuPage 4-11% Gels	Invitrogen, Karlsruhe
NuPage MOPS running buffer	Invitrogen, Karlsruhe
NuPage MES running buffer	Invitrogen, Karlsruhe

Tabelle 3.2-1 Kits & Marker

### 3.2.3 Restriktionsenzyme

Restriktionsenzyme und Puffer wurden ausschließlich von New England Biolabs (Ipswich, USA) nach den Angaben des Herstellers verwendet.

### 3.2.4 Antikörper

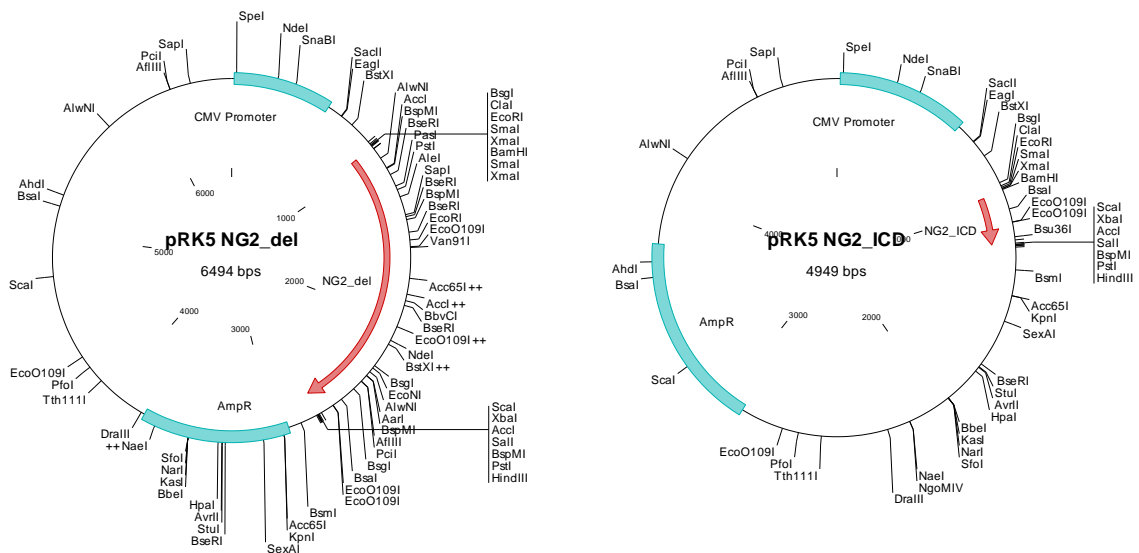
Antigen	Größe (kD)	Spezies	Typ	WB	IHC	Quelle
Bassoon	419	Kaninchen	pc		1:2000	AG Gundelfinger
F3	113	Maus	mc	1:100		AG Trotter
GAPDH	36	Kaninchen	pc	1:2500		Abcam
GFAP	50	Kaninchen	pc		1:2000	Dako
GFP	(26)	Kaninchen	pc		1:2000	Abcam
GFP	(26)	Hühnchen	pc		1:5000	
HA	tag					Covance
HA	tag					Millipore
MBP		Ratte	mc		1:500	Sertec
NeuN		Maus	mc		1:500	Chemicon
NG2_mc	300	Ratte	mc		1:50	AG Trotter
NG2_pc	300	Kaninchen	pc		1:500	Millipore
NG2_cyto	7-300	Kaninchen	pc	1:200		AG Trotter
pcNG2	300	Kaninchen	pc	1:750		AG Trotter
PDGFR-a	185	Ratte	mc			BD
Piccolo		Meerschwein			1:1000	AG Gundelfinger
PLP	20, 24	Ratte	mc	1:10		AG Trotter
PSD-95	95	Maus		1:1000	1:10000	NeuroMab
SMI31		Maus			1:1000	
a-Tubulin	55	Maus	mc	1:5000		
Iba1						
S100β						
BrdU						
GSTp						
PTGDS	26	Kaninchen	pc	1:500		Abcam
Nptx2	47	Kaninchen	pc	1:1000		Abcam
Repo						
Kon-tiki_cyto						AG Schnorrer
NG2	300	Kaninchen	pc		1:500	Millipore
HRP						
Myc	tag	Maus	mc			CellSignaling
Myc	tag	Kaninchen	pc			Millipore
Flag	tag	Maus	Mc			Sigma

Tabelle 3.2-2 Primäre Antikörper

Kopplung	Wirt Spezies	Ziel Spezies	Verdünnung	Quelle
HRP	Ziege	Maus	1:10000	Dianova
HRP	Ziege	Ratte	1:10000	Dianova
HRP	Ziege	Kanninchen	1:10000	Dianova
Cy2	Ziege	Maus, Ratte, Kanninchen	1:200	Dianova
Cy3	Ziege	Maus, Ratte, Kanninchen	1:800	Dianova
Cy5	Ziege	Maus, Ratte, Kanninchen	1:400	Dianova
Alexa488	Ziege	Maus, Ratte, Kanninchen	1:400	Invitrogen
Alexa546	Ziege	Maus, Ratte, Kanninchen	1:400	Invitrogen
Alexa647	Ziege	Maus, Ratte, Kanninchen	1:400	Invitrogen
DAPI		dsDNA	1:1000	

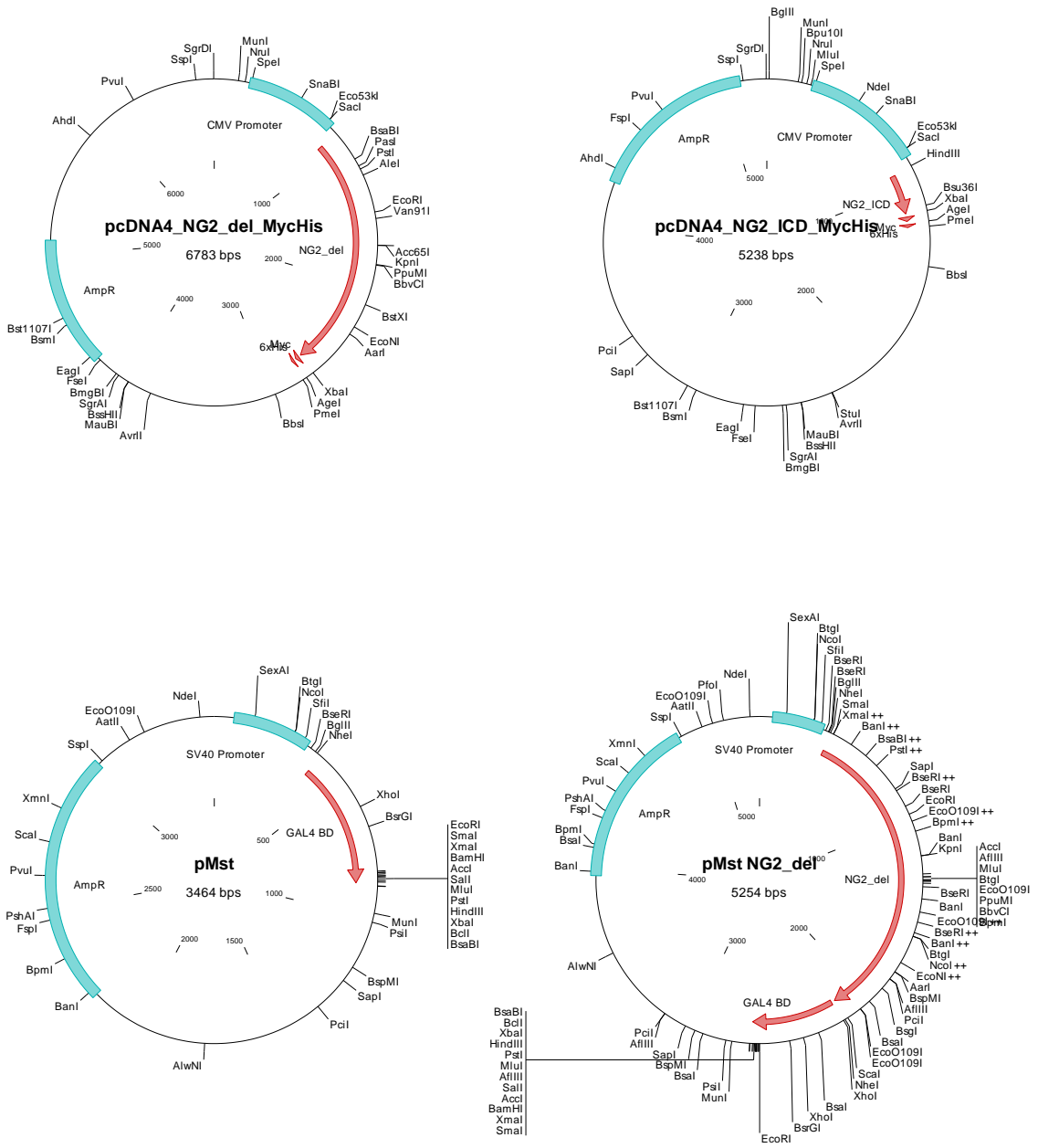
Tabelle 3.2-3 Sekundäre Antikörper

### 3.2.5 Plasmide und Oligonukleotide





# Material und Methode





Gal4	pMst			Gal4	3,5 (0,5)	AG Pietzek
APP_Gal4	pMst			Gal4		AG Pietzek
Renilla	pcDNA3	Invitrogen	Renilla	Luciferase		AG Trotter, R. White
ADAM 10				-		AG Postina
ADAM 17				HA		AG Postina
UAS (Gal4)Reporter	pGL4.35	Promega	Firefly	Luciferase	6,2	AG Endres
Promoter Assay	pGL4.76	Promega	Renilla	Luciferase	5,1	AG Endres
hADAM10-Pro	pGL4.76		Renilla	Luciferase		AG Endres
hAPP-Pro	pGL4.76		Renilla	Luciferase		AG Endres
hBACE1-Pro	pGL4.76		Renilla	Luciferase		AG Endres

Tabelle 3.2-4 Plasmide und Oligonukleotide

Für Konstrukt, Vektor	Vektor	Restriktions- schnittstelle	Start Codon	Stop Codon	Typ	Sequenz 5'-3'
NG2_del	pRK5	BamHI	X		Fwd	ata gga tcc atg ctt ctc ggc ccg gga ca
NG2_del	pRK5	XbaI		X	Rev	tat tct aga gat tca cac cca gta ctg gcc
NG2_ICD	pRK5	BamHI	X		Fwd	ata gga tcc atg ctc cgc aaa cgc aac aag ac
NG2_ICD	pRK5	XbaI		X	Rev	tat tct aga gat tca cac cca gta ctg gcc
NG2_del_myc_his	pcDNA4	HindIII	X		Fwd	ata aag ctt atg ctt ctc ggc ccg gga ca
NG2_del_myc_his	pcDNA4	XbaI			Rev	tct aga tcc cac cca gta ctg gcc att cct g
NG2_ICD_myc_his	pcDNA4	HindIII	X		Fwd	ata aag ctt atg ctc cgc aaa cgc aac aag ac
NG2_ICD_myc_his	pcDNA4	XbaI			Rev	tct aga tcc cac cca gta ctg gcc att cct g
NG2_del_Gal4	pMst	NheI	X		Fwd	ata gct agc atg ctt ctc ggc ccg gga ca
NG2_del_Gal4	pMst	NheI			Rev	ata gct agc cgt ccc acc cag tac tgg cca ttc ctg
NG2_ICD_Gal4	pMst	NheI	X		Fwd	ata gct agc atg ctc cgc aaa cgc aac aag ac
NG2_ICD_Gal4	pMst	NheI			Rev	ata gct agc cgt ccc acc cag tac tgg cca ttc ctg

Tabelle 3.2-5 PCR Primer

Ziel mRNA	Hersteller	Identifizierungsnummer
PGK1	Applied Biosystems	Mm00435617_m1
GAPDH	Applied Biosystems	Mm99999915_g1
NPTX2	Applied Biosystems	Mm00479438_m1
PTGDS	Applied Biosystems	Mm01330613_m1
ADAM10	Applied Biosystems	Mm00545742_m1
APP	Applied Biosystems	Mm01344172_m1
MBP	Applied Biosystems	Mm01266402_m1
PLP	Applied Biosystems	Mm00456892_m1
HMBS	Applied Biosystems	Mm01143545_m1
CDK2	Applied Biosystems	Mm00443947_m1

Tabelle 3.2-6 qRT-PCR Primer

Alle Primer stammen aus dem Taq-man system der Firma Applied Biosystems, die Sequenzen sind nicht bekannt. (<http://bioinfo.appliedbiosystems.com/genomic-products/gene-expression.html>)

Name	Plasmid
SP6_primer	pRK5, pMst
EBV_rev-primer	pRK5, pMst
CMV_fwd_primer	pcDNA4
BGH_rev_primer	pcDNA4

Tabelle 3.2-7 Sequenzier Primer

Die Sequenzierungen mit den in der Tabelle genannten Primern wurden bei der Firma Genterprise (Mainz) durchgeführt.

siRNA Ziel	Sequenz 5'-3'
NG2	AAGTCAGCTCACTGCAGAAAA
Muppl	CGAAAGGCTACACATGAT
Kontrolle	

Tabelle 3.2-8 siRNA

### 3.3 Lösungen und Nährmedien

#### 3.3.1 Zellkultur

Lösung / Nährmedium	Zusammensetzung
Einfriermedium	70% RPMI 1640; 20% FCS; 10% DMSO
HBSS	4 g/l KCl; 0,6 g/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 80 g/l NaCl; 1,13 g/l Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x2H <sub>2</sub> O; 10 g/l □-D-Glucose; 100 mg/l Phenolrot
Poly-L-Lysin	200 mM Poly-L-Lysin; 0,1 M Borsäure
Sato/B27 (primäre Oligodendrozyten)	13,4 g/l DMEM; 2 g/l NaHCO <sub>3</sub> ; 20 ml/l B27; 0,011% Pyruvat; 500 nM Triiodo-L-Thyronin; 500 mM L-Thyroxin; 1% hitzeinaktiviertes Pferdeserum (HS)

Sato-Medium (Oli-neu)	13,4 g/l DMEM; 2 g/l NaHCO <sub>3</sub> ; 0,01 mg/ml Transferrin; 100µg/l Insulin; 200 nM Progesteron; 100 µM Putrescin; 220 nM Natriumselenit; 500 nM Triiodo-L-Thyronin; 500 mM L-Thyroxin; 25 µg/ml Gentamycin; 1% hitzeinaktiviertes Pferdeserum (HS)
Hek, MEF und Melanoma Medium	DMEM (Sigma), 1% Pyruvat, 10% FCS
TE-Low = Trypsin/EDTA	0,01% Trypsin; 0,02% EDTA in HBSS

Tabelle 3.3-1 Lösungen und Medien für die Zellkultur

### 3.3.2 Molekularbiologie

Lösung / Nährmedium	Zusammensetzung
LB-Agar	2,25 g Agar; 150 ml LB-Medium
LB-Medium	10 g/l NaCl; 10 g/l Trypton; 5 g/l Hefeextrakt
Probenpuffer (Agarose-Gele)	1% Bromphenolblau; 2% Xylencyanol; 1 mM EDTA; 0,5% Saccharose
TAE(Tris/Acetic Acid/EDTA)-Puffer	40 mM Tris; 1 mM EDTA; mit Essigsäure auf pH 8,0

Tabelle 3.3-2 Lösungen und Medien für die Molekularbiologie

### 3.3.3 Proteinbiochemie

Lösung	Zusammensetzung
4x Probenpuffer (SDS-PAGE)	200 mM Tris/HCl (pH 6,8); 40% Glycerin; 10% SDS; 0,4% Bromphenolblau; 400 mM DTT
5x Elektrophoresepuffer (Tris-Glycin)	125 mM Tris; 1,25 M Glycin; 0,5% SDS (pH 8,3)
20x Elektrophoresepuffer (Bis-Glycin NuPAGE MES)	50 mM MES; 50 mM Tris; 0,1% SDS; 1 mM EDTA (pH 7,3)
ECL-Lösung	Lösung A: 200 ml 0,1 M Tris-HCl (pH 8,6); 50 mg Luminol Lösung B: 11mg para-hydroxy Cumarsäure Nutzung: 1 ml Lösung A + 0,3 µl H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + 100 µl Lösung B
PBS	150 mM NaCl; 8 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 1,7 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
PBST	PBS; 0,1% Tween20
Triton-Lysis-Puffer	1% Triton-X100; 50 mM Tris; 150 mM NaCl; Proteaseinhibitoren
Sammelgelpuffer	1 M Tris (pH 6,8)
Transferpuffer (Westerblot)	24 mM Tris; 192 mM Glycin; 20% Methanol (pH 10,4)
Trenngelpuffer	1 M Tris (pH 8,8)
Blockierlösung (Westerblot)	PBST; 4% Milchpulver
Homogenisierungspuffer (Protease Assay)	10 mM Mops; 10mM Kcl; pH 7
Reaktionspuffer (Protease Assay)	150 mM Natriumzitat; pH 6,4

Tabelle 3.3-3 Lösungen für die Proteinbiochemie

### 3.3.4 Immunofluoreszenzfärbungen

Lösung	Zusammensetzung
Fixierlösung (ICC&IHC)	4% Paraformaldehyd (PFA) in PBS
Permeabilisierungslösung (ICC)	0,1% TritonX-100 in PBS
Blockierlösung (ICC)	PBS; 10% Pferdeserum
Blockierlösung & Fixierlösung (IHC)	PBS; 10% NGS; 0,5 % Triton X-100
Citrat-Puffer (10x)	

Tabelle 3.3-4 Lösungen für Immunofluoreszenzfärbungen

## 3.4 Protein biochemische Methoden

### 3.4.1 Zelllysate

Zur Lyse von adhärenen Zellen wurden diese zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit Triton-Lysis Puffer vom Zellkulturgefäß gekratzt. Nach einer 30 minütigen Inkubationszeit bei 4°C (Rotor) wurden die Zellkerne bei 1000 g für 10 min. (4°C) abzentrifugiert.

### 3.4.2 Subzelluläre Fraktionierung

Die Zellen wurden in den Kulturschalen zunächst bei RT zweimal mit PBS gewaschen und anschließend in PBS von der Schale geschabt. Nach der Pelletierung (10 min, 133g), wurde das Pellet in 1 ml kalten Homogenisierungspuffer aufgenommen und für 10 min auf Eis inkubiert. Die Homogenisierung erfolgte mit einem PotterS (900 U/min, 20 Stöße). Die bei 1000g 15 min 4 °C pelletierten Zellkerne wurden aufgehoben und der Überstand ein weiteres Mal zentrifugiert (16000g, 40 min, 4°C), was zu einer groben Membranfraktion (CM) in Form des Pellets und einer cytoplasmatischen Fraktion (CP) in Form des Überstandes führte. Die einen Schritt zuvor pelletierten Kerne wurden durch 10-faches auf und absaugen mit einer 24G Kanüle in Homogenisierungspuffer 2-mal resuspendiert und abzentrifugiert und anschließend nur das Pellet in 4xSDS Probenpuffer aufgenommen und wie alle anderen Proben für die SDS-PAGE vorbereitet. Dabei wurden alle Fraktionen im gleichen Endvolumen gelöst.

### 3.4.3 Salin und Triton Extraktion von Hirngewebe

Das gesamte Gehirn einer erwachsenen Maus wurde entnommen und in 1 ml / 500 mg TBS mit PI aufgenommen und direkt auf Eis gelagert. Mit Hilfe des Potter S (Kap.) wurde das Hirngewebe im gesamten Puffer homogenisiert (900 U/min, 10 Stöße). Anschließend erfolgte eine 10 min Inkubation auf Eis und Zentrifugation (15.000g, 10min, 4°C). Der gesammelte Überstand repräsentiert die erste Saline Fraktion S1, das Pellet wurde in 1 ml TBS mit PI aufgenommen und einer erneuten Homogenisierung und Zentrifugation unterzogen, dieser Schritt wurde daraufhin nochmals wiederholt, wobei S2 und S3 gesammelt wurde. Nach der Entnahme von S3 wurde das Pellet in 1 ml TBS PI + 1% TritonX 100 aufgenommen und erneut homogenisiert und zentrifugiert, was zur Triton Fraktion T1 (Überstand) führte. Das Pellet, welches weder Wasser noch Triton lösliche Elemente enthielt (u.a. Zellkerne), wurde verworfen oder gesondert analysiert.

### **3.4.4 100.000g Extraktion von Hirngewebe**

Der somatosensorische Cortex (Zielgewebe) einer P21 Maus wurde entnommen und in 1 ml / 300 mg TBS mit PI aufgenommen und direkt auf Eis gelagert. Mit Hilfe des Potter S wurde das Hirngewebe im gesamten Puffer homogenisiert (900 U/min, 10 Stöße). Und anschließend die Kerne bei 1000g, 10min, 4°C abzentrifugiert und verworfen. Der Überstand wurde für 1h bei 100.000g, 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand entnommen und mit 1:1 mit 4xSDS Samplebuffer versetzt, das Pellet wurde im gleichen finalen Volumen wie der Überstand in 2xSDS Samplebuffer aufgenommen. Beide Samples wurden 5 min bei 95°C gekocht und gleiche Volumen auf ein SDS-Gel aufgetragen.

### **3.4.5 Protease Assay mit isolierten Zellmembranen**

Oli-neu Zellen wurden bis zur maximalen Zelldichte auf 15 cm Schalen kultiviert (1 Schale für 2 Reaktionen). Die Schalen wurden zunächst bei RT zweimal mit PBS gewaschen und anschließend in 15 ml PBS von der Schale geschabt. Nach der Pelletierung (10 min, 133g), wurde das Pellet in 1 ml kalten Homogenisierungspuffer aufgenommen (Kap. 3.3.3) und für 10 min auf Eis inkubiert. Die Homogenisierung erfolgte mit einem PotterS (900 U/min, 20 Stöße). Die bei 1000g 15 min 4 °C pelletierten Zellkerne wurden verworfen und der Überstand ein weiteres Mal zentrifugiert (16000g, 40 min, 4°C). Das dabei entstandene Pellet beinhaltet die groben Zellmembranen und wurde in 100 µl Reaktionspuffer aufgenommen (pro 15 cm Schale). 50 µl dieser Suspension wurden daraufhin in einem Reaktionsgefäß mit unterschiedlichen Protease Inhibitoren (1xPI, 5 µM GI, 5 µM, 10 µM DAPT) inkubiert (37° C, 2h). Nach den 2 Stunden erfolgte zunächst eine erneute Inkubation für 10 min auf Eis und eine Dissoziation möglicher Aggregate mit der 200 µl Pippenspitze (10x pippetiert) durchgeführt. Bei der darauffolgenden Ultrazentrifugation (100.000g, 1h, 4°C) wurden Membranen (P100) von Löslichen Fragmenten (S100) getrennt. Diese wurden mit SDS-

Probenpuffer versetzt, für 5 min bei 60 °C inkubiert und komplett auf ein Gradientengel geladen.

### 3.4.6 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde ein BCA Assay mit einem entsprechenden Kit durchgeführt. (Kap. 3.2.2)

### 3.4.7 SDS-PAGE und Westernblot

Eine Natrium Dodecylsulfat Polyacrylamide Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) bezeichnet eine analytische Methode zur Auftrennung von Proteingemischen im elektrischen Feld anhand der Proteingröße. Die Ladung der Proteine stammt in diesem Fall vom SDS, welches in einem Verhältnis von 1,4 : 1 (SDS Molekül / AS) bindet. Als stationäre Phase dient dabei ein Polyacrylamidgel, das entweder einen Konzentrationsgradienten 4-12% aufwies (NuPAGE System, Kap. 3.1.3) oder eine konstante Konzentration von 6, 10 oder 12%. Letztere Gel wurden nach dem Lämmli-System gegossen (Kap. 3.3.3).

Zur Probenvorbereitung wurden 0,5 µg – 20 µg Gesamtprotein mit 4x Probenpuffer versetzt und standartmäßig 5 min. bei 60°C gekocht. Zusätzlich spaltet das im Probenpuffer enthaltene DTT evtl. vorhandene Disulfidbrücken, was man auch als reduzierende Bedingungen bezeichnet.

Nach der SDS-PAGE wurde das Muster der elektrophoretischen Auftrennung mittels Western-Blot Verfahrens auf eine PVDF-Membran übertragen. Dabei wird abermals ein elektrisches Feld angelegt welches dieses Mal senkrecht zum Polyacrylamid-Gel gerichtet ist. Beim sogenannten Wet-Blot werden PVDF-Membran, Gel und Whatman-Papiere übereinanderliegend in einer Blot Kammer eingebracht, die komplett mit Transferpuffer gefüllt ist (Kap. 3.1.3 und 3.3.3). Der Transfer der Proteine erfolgte für 250 min. bei einer Stromstärke von 300 mA oder 16h bei 50 mA.

Zur Detektion einer bestimmten Proteinbande auf der PVDF-Membran wurde eine Immundetektion durchgeführt. Dazu wurden zunächst unspezifische Bindestellen auf der Membran durch Inkubation für 30 min. in 4% Milchpulver in PBST abgesättigt. Anschließend wurde der erste Antikörper verdünnt (Kap. 3.2.4) in 4% Milchpulver in PBST für eine Stunde bei RT (oder über Nacht bei 4°C) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBST, folgte eine einstündige Inkubation des an die Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelten Zweitantikörpers. Nach erneutem dreimaligem Waschen in PBST wurden die markierten Proteine mittels ECL-Reagenz und Röntgenfilm detektiert.



## **3.5 Molekularbiologische Methoden**

### **3.5.1 Vervielfältigung von DNA mittels Polymerase-Ketten-Reaktion**

Die Polymerase Ketten-Reaktion (PCR) wurde benutzt um bestimmte Abschnitte von Plasmid DNA zu vervielfachen. Dabei kam die Pfu Turbo Polymerase (Stratagene) mit folgendem Standardprogramm zum Einsatz. Abweichende Protokolle wurden je nach Bedarf und Herstellerangabe verwendet. Als Reaktionsansatz kamen 50ng Matrizen DNA, 20µM Primer, sowie 10 dNTPs in entsprechendem Puffer zum Einsatz.

Nach erster 95°C Denaturierung für 2 min, erfolgten 40 Zyklen mit folgender Temperaturabfolge, 95°C für 45sek, 55-65°C für 45 sek (primerspezifisch), 72°C (1 min pro kb des Amplifikat). Anschließend 10 min bei 72°C.

### **3.5.2 Präparative und analytische Agarose-Gelelektrophorese**

Mittels Agarose-Gelelektrophorese wird eine Auftrennung von linearisierten Nukleinsäuren nach ihrer Größe erreicht. Es wurden Gele mit einer Agarosekonzentration von 1% in TAE-Puffer verwendet. Zusätzlich wurde die flüssige Agarose mit 0,5 µg / ml Ethidiumbromid versetzt. Nach dem Ausgießen, Erhärten und Beladen der Gele wurden die Nukleinsäuren bei max. 90V aufgetrennt.

Für analytische Zwecke wurde das Gel mit einem Kamerasystem unter UV-Licht dokumentiert.

Für die weitere Verwendung eines bestimmten Nukleinsäurefragments wurde dieses unter schwachem UV Licht mit einem Skalpel herauspräpariert. Für die Aufreinigung des Fragments wurde ein entsprechendes Qiagen Kit verwendet.

### **3.5.3 Ligation von DNA**

Das linearisierte Plasmid und Insert wurden in gleichem Massenverhältnis zusammengegeben und entsprechend den Herstellerangaben mit einer T4 DNA Ligase in entsprechendem Puffer inkubiert.

### **3.5.4 Transformation von kompetenten Bakterien**

Für die Transformation von zirkulärer Plasmid-DNA wurden hitzekompetente *E.coli* TOP10F verwendet. 50 µl der Bakterien wurden dazu mit 50-100 ng Plasmid-DNA vermischt und für 30 min. auf Eis inkubiert. Ein Hitzeschock erfolgte für 2 min. bei 42°C. Anschließend wurde die Bakteriensuspension mit 1 ml LB-Medium versetzt und für 30 min. bei 37°C inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde zur Selektion transformierter Bakterien auf LB-Platten mit Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Das Antibiotikum wurde der auf dem Plasmid kodierten Resistenz entsprechend gewählt.

### 3.5.5 Isolierung von Plasmid-DNA

Zur Isolierung von Plasmid-DNA in niedrigen Konzentrationen wurden 5 ml antibiotikum-haltiges LB-Medium mit einer Einzelkolonie (Kap. 3.5.4) angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Für höhere Plasmid Konzentrationen wurden 200 ml antibiotikum-haltiges LB-Medium mit transformierten Bakterien versetzt und ebenfalls über Nacht inkubiert.

Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe eines entsprechenden *Kit* von Qiagen (Mini oder Maxi-Präp).

Für die langfristige Lagerung von einzelnen Bakterienkolonien wurde ein Teil der über Nacht gewachsenen LB-Kultur zu einer Lösung von 20% (v/v) Glycerol gemischt und bei -80 °C gelagert.

### 3.5.6 Restriktionsverdau

Für einen analytischen Restriktionsverdau wurde 0,1 – 1 µg, für einen präparativen 1-2 µg Plasmid-DNA, mit den entsprechenden Restriktionsenzymen nach Herstellerangaben behandelt. Anschließend wurden die Proben mit Probenpuffer versetzt und mittels einer entsprechenden Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt.

### 3.5.7 Isolierung von RNA

Zur Isolierung der gesamt RNA aus kultivierten Zellen oder Gewebe, wurde das RNeasy Plus Kit von Qiagen (Kap. 3.2.2) verwendet. Dazu wurden kultivierte Zellen (max. 3 cm Kulturschale) in 700 µl Qiazol aufgenommen. Hirngewebe wurde ebenfalls in einer dem Gewicht entsprechende Menge Qiazol aufgenommen und durch Vortexen und Pipetieren homogenisiert. Die weitere Isolierung der RNA erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

### **3.5.8 Synthese von cDNA**

Die in Kap. 3.5.7 isolierte gesamt RNA kann mit Hilfe des Enzyms Reverse Transcriptase 1:1 in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Die Verwendung unterschiedlicher Primer erlaubt es bei dieser Synthese spezifische RNAs (z.B. mRNA) oder gesamt RNA umzuschreiben. Es wurden zwei Kits von Qiagen und Roche verwendet, wobei bei ersterem nur eine Primer Art (gesamt RNA) zur Verfügung stand, beim Roche Kit wurden stets die random hexamer Primer (gesamt RNA) verwendet.

### **3.5.9 Quantitative Real-Time-PCR**

Die auf dem Prinzip der PCR beruhende qRT-PCR bietet die Möglichkeit, das während den Zyklen entstehende Produkt quantitativ zu erfassen und erlaubt so Rückschlüsse auf die Konzentration der entsprechenden cDNA bzw RNA. Das verwendete StepOne System von AB (Kap. 3.1.3) wurde mit dem entsprechenden TaqMan Primer System von AB verwendet.

### **3.5.10 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäure haltigen Lösungen**

Die Konzentration einer DNA- oder RNA-Lösung wurde photometrisch mit einem NanoDrop bestimmt, wobei das analysierte Volumen 1-1,5 µl betrug.

## **3.6 Transcriptom Analyse mittels gene chip**

Zum quantitativen Vergleich der gesamten mRNA (Transcriptom) von mindestens zwei Proben, wurden Genechips von Affimetrix verwendet. Die aufgereinigte mRNA der entsprechenden Proben wurde dafür im Rahmen einer Zusammenarbeit am DKFZ in Heidelberg analysiert.

## **3.7 Luciferase Assays**

Für die Luciferase Assay transfizierten Zellen (siehe Plasmide) würden entsprechend entweder mit dem Dual-Glo Assay von Promega, bei Expression von Renilla und Firefly-Luciferase (Gal4 Assays) oder nur mit Renilla-Glo Assay (Promoter Assays) behandelt. Die

Emission der entsprechenden Lumineszenz wurde anschließend mit einem Tecan reader in einer weißwandigen 96-well Platte gemessen.

### **3.8 Immunocyto und Immunohistochemie**

#### **3.8.1 Immunocytochemie (ICC)**

Für die ICC wurden Zellen auf PLL beschichteten Deckgläsern kultiviert und zum benötigten Zeitpunkt zweimal mit PBS gewaschen, anschließend erfolgte eine Fixierung mit 4%PFA für 15 min. Nach erneutem zweimaligem Waschen erfolgte ein Permeabilisierungsschritt mit 0,1% TX-100 für 2 min, woraufhin erneut zweimal gewaschen wurde und anschließend 15min mit 10% Pferdeserum (HS) blockiert wurde. Primärer und sekundärer AK wurden ebenfalls in 10% HS für 45 bzw 30min inkubiert auf jede AK Inkubation erfolgten zwei Waschschritte. DAPI wurde mit dem sekundären AK appliziert. Zum Mounten der Deckgläser wurden diese kurz in dH<sub>2</sub>O getaucht und anschließend mit der Zellschicht bedeckten Seite auf einen Moviol Tropfen auf einem Objektträger aufgebracht.

#### **3.8.2 Immunohistochemie (IHC)**

Für die IHC benötigten Mäuse wurden intrakardial mit 4% PFA fixiert. Dies wurde in Zusammenarbeit mit der AG Götz (München) oder AG Lutz (Mainz) durchgeführt. Das fixierte Hirn wurde entnommen und mit dem Cryostat in 30 % Sucrose geschnitten. Alternativ wurden Vibratom Schnitte angefertigt, wozu das Hin in Agarose eingebettet wurde. Es wurden coronale Schnitte von 30 µm in Serie geschnitten.

Die angelegten Hirnschnitte wurden frei schwimmend (free floating) in mind 500µl Flüssigkeit in 24-well Schalen gefärbt. Dabei wurde die Blockierung sowie alle AK Inkubationen mit dem gleichen Puffer durchgeführt (PBS; 10% NGS; 0,5 % Triton X-100). Gewaschen wurde zweimal für mind 10 min mit PBS nach jedem Schritt. Zum blockieren/permeabilisieren wurden die Schnitte zunächst ohne AK für 30 min bei RT unter leichtem schütteln inkubiert. Die primäreren AK wurden für 4-6h bei RT oder 12-48h bei 4°C mit den Schnitten inkubiert. Die sekundären AK wurden zusammen mit DAPI für 2h bei RT inkubiert. Die Schnitte wurden in 1:10 verdünnted PBS überführt und mit einem Pinsel auf Objektträger aufgezogen. Nach dem antrocknen der Schnitte im Dunkeln bei RT wurden diese mit Moviol bedeckt und Deckgläser aufgelegt.

Zusätzliche Schritte für Epitope, die unter o.g. Bedingungen nicht zugänglich sind. Um BrdU markierte Zellen oder KI-67 zu färben wurden zunächst alle anderen Färbungen wie oben beschrieben durchgeführt, bis auf das Aufziehen. Nach jedem der folgenden Schritte wurde wiederum zweimal mind 10 min mit PBS gewaschen. Nach einer Nachfixierung von 10 min

mit 4% PFA wurden die Schnitte für 20 min in 96°C heißem Zitratpuffer gekocht, anschließend wurde die Färbung von BrdU/KI-67 nach oben genannten Protokoll inklusive des Aufziehens durchgeführt.

## **3.9 Zellkultur**

### **3.9.1 Kultivierung von Zelllinien**

Folgende Zelllinien wurden verwendet; Oli-neu eine murine Oligodendrozytenvorläuferzelllinie (Jung et al., 1995), Hek 293 entstammen humanen embryonale Nierenzellen, bei den verwendeten MEF handelt es sich um embryonale Fibroblasten aus der Maus mit genetischen Deletierten Genen für presenilin 1 und 2 ( $\gamma$ -sekretase) zur Verfügung gestellt durch die AG Pietrzik.

Für Oli-neu Zellen sind mit PLL beschichtete Plastikkulturgefäße erforderlich. Alle Linien wachsen adhärent und bis auf Oli-neu Zellen bis zur vollständigen Konfluenz, Oli-neu bis etwa 60-70% Konfluenz. Die genaue Zusammensetzung der spezifischen Nährmedien und anderen Lösungen sind in Tabelle 3.3-1 aufgeführt. Die Zellen wurden beim Erreichen ihrer maximalen Konfluenz oder kurz davor von den Kulturschalen abgelöst und in verdünnter Lösung auf neue Kulturgefäße aufgebracht, den gesamten Vorgang bezeichnet man auch als das Passagieren von Zellen. Dazu wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen mit 37 °C warmem TE-Low bedeckt, nach dem Ablösen des Zellrasens, je nach Zelllinie nach 2-4 min, wurden die suspendierten Zellen in PBS mit 10% HS verdünnt und bei 300g abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde im entsprechenden Kulturmedium aufgenommen und auf Kulturgefäße verteilt. Nach 2 Tagen wurde ein halber bis ganzer Mediumwechsel durchgeführt, sofern die Kultur noch nicht konfluent gewachsen war.

### **3.9.2 Kultivierung von primären Maus Oligodendrozyten aus E14/E15 Hirnen**

Alle primären Oligodendrozyten bzw. deren Vorläuferzellen wurden in B27 mit 1% HS sowie den Wachstumsfaktoren FGF und PDGF auf PLL beschichteten Kulturgefäßen nach (Kramer et al., 1997) angelegt und kultiviert.

### **3.9.3 Kultivierung primärer kortikaler Maus Neurone aus E14/15 Hirnen**

Primäre Zellkulturen von embryonalen kortikalen Maus Neuronen wurden nach (Hoogenraad et al., 2010) angelegt.

### 3.9.4 Magnetisch basierte Sortierung primärer Maus OPC aus P9 Hirnen

Zur Isolation und Kultivierung von primären Oligodendrozytenvorläufer Zellen (pOPC) wurde das sogenannte MACS Verfahren der Firma Miltenyi verwendet. Das Prozedere bis zu den kultivierten pOPC lässt sich in zwei Schritte unterteilen, die Herstellung einer Einzelzellsuspension aus Gesamthirn und das auf Magnetismus basierende Sortieren der Zellen. Dabei erhält man eine Zellkultur primäre OPC unmittelbar nach der Gewebsentnahme, welche man direkt zur experimentellen Verwendung zur Verfügung hat. Dies bietet einen klaren Vorteil gegenüber der in Kap. 3.9.2 angesprochenen Methode, da bei dieser eine Vorkultivierung von 2 Wochen nötig ist, was zu einer Erhöhung von ungewollten *in vitro* Anpassungen der isolierten Zellen führen kann.

Um die Zellen von gesamten Maushirnen zu vereinzeln wurde das NTDK(P) Kit der o.g. Firma nach Herstellerangaben benutzt sowie der sog. GentleMACS Zellhomogenisator und der dazu gehörende Zellrotator für die Zwischeninkubationen. Es wurden embryonale bzw postnatale Mäusehirne des Stammes C57/Bl6-N bis zu einem Alter von 9 Tagen (P9) verwendet. Bei noch älteren Hirnen, ergab sich ein zu großes Verhältnis von totem Material (Debris) zu lebenden Zellen. Die Hauptfunktionsweise des Kits basiert in diesem Fall auf einer Teilverdauung des Gewebes durch die Protease Papain.

Testversuche ergaben eine Sortierbarkeit von pOPC von E14/15 bis P9, für die abgebildeten Versuche wurden aber nur P9 Hirne verwendet. Der eigentliche Sort erfolgt über einen an magnetische Beads gekoppelten AK der gegen das OPC spezifische Oberflächenprotein NG2 gerichtet ist. Da NG2 sehr empfindlich gegen proteolytischen Verdau ist, musste die Einzelzellsuspension zunächst für 3h bei physiologischen Bedingungen inkubiert werden um eine reexpression des NG2 Proteins zur Zelloberfläche zu ermöglichen. Danach fand die Kopplung mit den erwähnten magnetischen Beads statt, die gesamte Suspension wurde im Folgenden über eine temporär magnetisierte Säule laufen gelassen. Anschließend wurde das magnetische Feld entfernt und die zurückgehaltenen Zellen gesondert eluiert (positiv Sort) und kultiviert. Der ebenfalls gesondert gesammelte Durchfluss, während das magnetische Feld noch angelegt war, enthält alle nicht markierten Zellen (negativ Sort) und wurde nach Bedarf ebenfalls kultiviert.

Beide Fraktionen wurden in B27 mit 1% HS sowie den Wachstumsfaktoren FGF und PDGF auf PLL beschichteten Kulturgefäßen nach Kap. 3.9.2 kultiviert.

### 3.9.5 Fluoreszenz basierte Sortierung primärer Maus OPC aus P9 Hirnen

Die fluoreszenz basierte Sortierung von OPC, kurz FACS, wurde in der Zytometrie Corefacility des IMB, Mainz unter Anleitung von Dr. M. Paulsen durchgeführt. Als Ausgangsmaterial diente hier ebenfalls die in Kap. 3.9.4 beschriebene Methode der

Herstellung einer Einzelzellsuspension (NTDK(P)). Diese wurde ebenfalls von P9 Maushirnen angelegt. Dabei kamen hier homozygote Tiere (-/-) der *knock-in* Mauslinie sowie der C57/BL6-N Hintergrundlinie als wild-typen (wt) zum Einsatz. Die Fluoreszenzmarkierung der Zellen erfolgte zum einen durch das endogen vorhandene EYFP in NG2-EYFP Tieren, sowie durch an einen fluoreszenten Farbstoff gekoppelte primär Antikörper gegen PDGFR- $\alpha$  (Tabelle 3.2-2 Primäre Antikörper). Die Kopplung diese AK erfolgte mit dem Sigma Kit click-an-stain. Es wurden in der Regel in einem Sort 1 Mio Zellen positiv und negativ sortiert, aus einer Zellsuspension von drei P9 Hirnen. Die sortierten Zellen wurden auf zwei Pellets verteilt, von denen eins für die mRNA Analyse mittels qRT-PCR (Kap. 3.5.9) sowie für die Proteinanalyse mittels WB (Kap. 3.4.7), herangezogen wurde.

### **3.10 Experimente in der Maus (Ratte)**

#### **3.10.1 Die NG2-EYFP *knock-in* Mauslinie**

Bei der NG2-EYFP Mauslinie auf dem C57/BL-6-N Hintergrund, handelt es sich um einen *knock-in* des EYFP Genes in das erste Exon des NG2 Genes. Durch den *knock-in* wird kein funktionelles NG2 Protein mehr exprimiert, stattdessen das fluoreszierende EYFP Protein unter der Kontrolle des endogenen NG2 Promotors. Im Falle einer homozygoten Zucht dieser Tiere in Bezug auf das NG2 Allel (-/-), erreicht man ein systemweites Unterdrückung der NG2 Protein Expression (*knock-out*). Die genaue genetische Modifikationen dieser Maus sind in (Karram et al., 2008) zu finden.

#### **3.10.2 BrdU Versuche in P80, P135 und P228 Mäusen**

Homozygote Mäuse wurden für 2 Wochen mit BrdU haltigem Trinkwasser versorgt. Anschließend wurden die Hirne der Tiere wie in Kap. 3.8.2 beschrieben direkt fixiert bzw für 8 Wochen mit normalem Trinkwasser in der Haltung gelassen. Es wurden drei Zeitpunkte mit mind. 6 Tieren pro Genotyp untersucht. Tiere im Alter von P80 und P135 mit 2 wöchiger BrdU Gabe, sowie P228 Tiere mit 2 wöchiger BrdU gabe sowie anschließender Haltung für weitere 8 Wochen ohne BrdU.

#### **3.10.3 Stab wound Versuche in P135 Mäusen**

Bei Stabwunden (*stab wounds*, SW) handelt es sich um mit einem Messer angelegte Schnittwunden. In diesem Fall wurden diese parallel entlang der sagittalen Körperachse im

somatosensorischen Kortex der Mäuse angelegt. Die Wunde hatte eine Dimension von 20x2x20 mm. Sämtliche operativen Eingriffe in Mäuse wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Magdalena Götz unter der Leitung von Dr. Leda Dimou (LMU, München) durchgeführt. Es wurden Mäuse der (-/-) NG2-EYFP sowie der BL6-N Hintergrundlinie im Alter von P135 verwendet. Die Mäuse wurden für drei Tage nach der SW Läsion mit BrdU haltigem Trinkwasser versorgt und anschließend wie in Tab.3.8.1 beschrieben fixiert oder ohne BrdU Gabe für die RNA Isolierung verwendet. Für letzteren Punkt wurde ein definiertes Volumen des lädierten Gewebes entnommen und in N<sub>2</sub> schockgefroren, die gesamte RNA wurde dann in Mainz isoliert und mittels Genechip (DKFZ, Heidelberg) und qRT-PCR analysiert.

### **3.10.4 Elektrophysiologische Experimente in der NG2-KO Maus**

Alle elektrophysiologischen Versuche wurden im Rahmen einer Kollaboration von Dr. A. Neitz (AG Mittmann, Mainz) durchgeführt. Bei allen Versuchen wurden Pyramidenzellen des Layer 2&3 im murinen somatosensorischen Cortex von P21 Mäusen mittels Ganz Zell Patch Clamp Technik abgeleitet. Dabei wurden zum einen spontane und induzierte exzitatorische post synaptische Ströme (sEPSC und eEPSC) gemessen. Sowie Strom-Spannungskurven (I/V curves) zur Bestimmung der Membraneigenschaften (Kamboj et al., 1995; Pellegrini-Giampietro, 2003). Für die eEPSC wurden Neurone des kortikalen Layers 4 künstlich erregt, diese innervieren die Pyramidalzellen des Layer 2&3 glutamaterg. Vergleichend wurden die gleichen Messungen in NG2-EYFP (-/-) Mäusen und WT (C57BL/6N) Mäusen durchgeführt.

### **3.10.5 Verhaltenstest der NG2 -/- Maus**

Alle Verhaltenstests wurden von Nadine Kaiser (AG Lutz, Unimedizin Mainz, Doktorarbeit) durchgeführt. Hier wurden zwei Experimente ausgewählt. Beim *Forced Swim Test* (FST), handelt sich um einen Test, der depressives Verhalten im Tiermodell aufzeigt (Cryan and Holmes, 2005). Er wird unter anderem dazu benutzt um den Effekt von Antidepressiva oder bestimmter Genotypen zu untersuchen. Dabei basiert dieser auf dem Fluchreflex von Mäusen, eine bestimmte Zeit in Wasser zu schwimmen um eine Fluchtroute zu finden (Crawley, 1999). Tiere die längere Pausen zwischen den Schwimmphasen machen, können als depressiver Phänotyp angesehen werden. Beim *Light-Dark Test* (LD), wird die Zeit die das Versuchstier damit verbringt in eine neue Umgebung zu erkunden, mit der Angst in neuen Situationen korreliert. Dabei wird die Zeit gemessen, die das Versuchstier in einem hellen offenen Kompartiment verbringt, im Gegensatz zu einer dunklen Box als Rückzugsmöglichkeit. Je länger es im hellen verbringt umso weniger ängstlich ist es, Medikamente/Genotypen, die dieses Verhalten begünstigen werden als angstlösend beschrieben (Bourin and Hascoet, 2003).



### 3.10.6 Aktivitätsabhängige Proteolyse in akuten Schnittkulturen

Die hier beschriebenen Versuche in der Ratte wurden in Kollaboration mit Dr. R. Frischknecht und Jeet Singh (IfN, Magdeburg) durchgeführt. Dabei wurden 350 µm dicke akute hippocampale Schnittkulturen von P70 (10 Wochen) alten Rattenhirnen angelegt (Levenson et al., 2004) und in aCSF (125 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 1,25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 25 mM Glukose) bei 32 °C einer chemischen LTP (cLTP) Induktion unterzogen. Die cLTP bestand aus einer 15 min Behandlung mit den Substanzen 50 µM PicROTOXIN, 50 µM Forskolin und 0,1 µM Rolipram (PFR). Dabei wurden folgende fünf Bedingungen untersucht, Kontrolle ohne PFR, PFR Induktion für 15 min mit folgenden Erholungszeiten 0 min, 45 min, 90 min und 180 min. Inhibitoren wurden 20 min vor der PFR Stimulation vor-inkubiert. Für jede Bedingung wurde eine Extraktion der extrazellulären Matrix (ECM) mittels Chondroitinase ABC Verdau in 0,1 M Tris-HCl, 0,03 M C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub>, pH 8,0 durchgeführt (Deepa et al., 2006) und die Proteinmengen im WB verglichen.

### 3.11 Experimente in der Fruchtfliege

Die Versuche in der Fruchtfliege (*Drosophila melanogaster*) wurden in Kooperation mit Alvaro Bustos und Dr. B. Altenhein (AG Technau, Mainz) durchgeführt. Dabei stammt der Kon-cyto Antikörper sowie die UAS-HA-Kon Linien von Dr. F. Schnorrer (Schnorrer et al., 2007). Die Reporterlinien Repo- und Kontiki-GAL4 vom Bloomington Stock Center. Es wurde ausschließlich mit Larven des L2 Stadiums gearbeitet.

Für die IHC wurden die präparierten Larven in 4% PFA, 10% Heptan für 30 min fixiert. Permeabilisiert mit PBS 0,5% Triton X-100 und blockiert mit 10% Kälberserum. Anschließend erfolgte die Inkubation der primären und sekundären Antikörper. Zur Bildaufnahme wurde ein Leica SP5 CLSM verwendet.

Zur Proteinextraktion wurden gesamte Larven verwendet und saline und triton lösliche Fraktionen nach Kap 3.4.3 angelegt. Der Proteingehalt der so gewonnenen Extrakte wurde mittels BCA (3.4.6) bestimmt und die Proben für SDS-PAGE und Western Blot (3.4.7) verwendet.

### 3.12 Statistik

Für die statistische Analyse wurde dem Datensatz entsprechend ein students t-Test mit MS-Excel bzw ein Wilcoxon-Mann-Whitney Test mittels SPSS durchgeführt. Dabei wurden signifikante Werte wie folgt eingeteilt:  $p > 0,05$ , n.s.;  $p \leq 0,05$ , \*;  $p \leq 0,01$ , \*\*;  $p \leq 0,001$ , \*\*\*; Werte mit sind stets Mittewerte und Fehlerbalken geben den *standard error of the mean* (SEM) an.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Sequentielle Spaltung von NG2 durch $\alpha$ - und $\gamma$ - Sekretase

#### 4.1.1 Überexpression der $\alpha$ -Sekretasen ADAM10 und 17

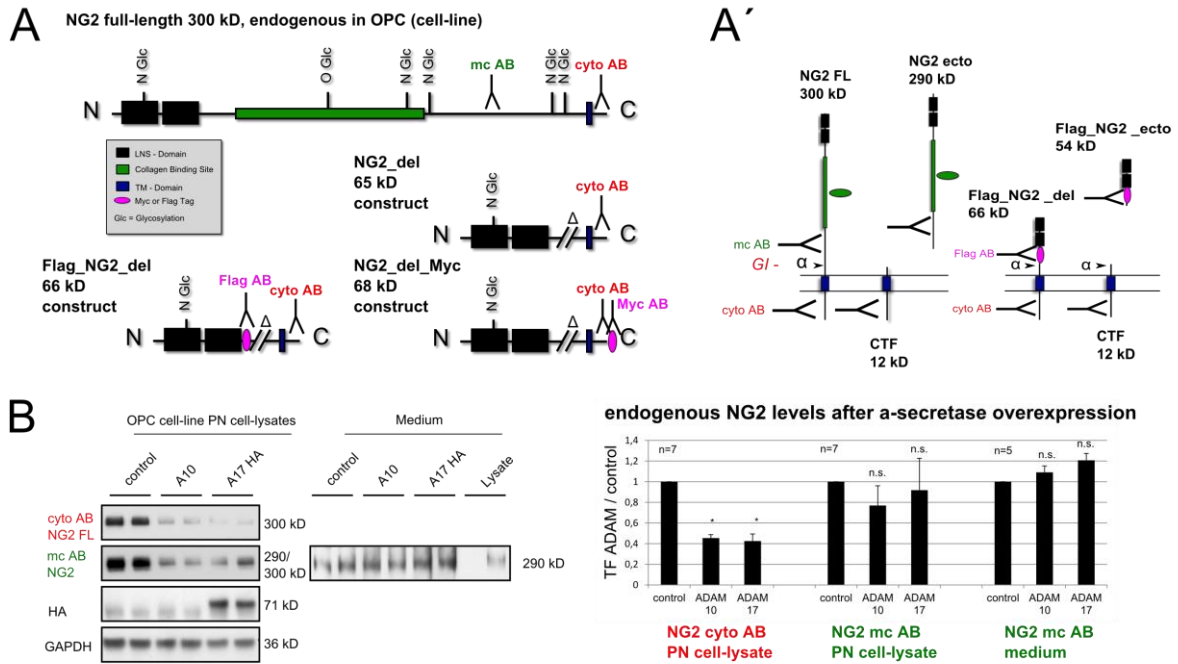


Abbildung 4.1-1 Überexpression von ADAM 10 und 17 reduzieren eine Form des NG2 Proteins.

A zeigt eine schematische Übersicht über das NG2 Voll-längen Protein (FL), sowie die NG2\_del Konstrukte, NG2\_del, Flag\_NG2\_del (Dr. Binamé) und NG2\_del\_Myc. Die möglichen tags sind in der Protein-Struktur eingezeichnet, sowie die Antikörper Epitope/Bereiche samt Namen des Antikörpers. A' verdeutlicht die Spaltung von NG2/NG2\_del durch eine  $\alpha$ -Sekretase und zeigt die Größen der entstehenden Fragmente auf. Darüber hinaus sind auch hier die Antikörperbindestellen eingezeichnet. In B sind WB und Quantifizierung für die Überexpression von ADAM 10&17 gezeigt. Die Auswertung fand mittels zwei unterschiedlicher NG2 Antikörper statt (NG2 cyto und NG2 mc), deren Zielsequenzen in A&A' ersichtlich sind. Bei der verwendeten OPC Zelllinie, handelt es sich um Oli-neu Zellen mit endogenem NG2 Protein. Diese wurden transient mit Expressionsplasmiden mit entsprechender cDNA für ADAM 10 und 17 transfiziert. Es konnte eine signifikante Reduzierung des FL-Proteins (cyto AB) für beide Sekretasen gegenüber der Kontrolle in post nukleären (PN) Zell-Lysaten gezeigt werden. (n = 7, 1 n = eine Transfektion)

Für die Detektion des NG2 Voll-längen-Proteins (FL), standen zwei unterschiedliche AK zur Verfügung (Abbildung 4.1-1 A). Der monoklonale AK (mc AB) erkennt ein Epitop im letzten Drittel des extrazellulären Bereichs von NG2 und eignet sich somit für die Erkennung des FL-Proteins sowie für den Nachweis von möglichen Ektodomänen, die je nach Größe mit dem FL-Protein im Gradienten-Gel überlagern können. Der polyklonale AK gegen den intrazellulären Teil von NG2 (cyto AB) erkennt demzufolge neben dem FL-Proteins, alle möglichen Fragmente, die noch den intrazellulären Teil beinhalten. Dies sind beispielsweise mögliche C-terminale Fragmente oder abgespaltene intrazelluläre Domänen (CTF bzw. ICD), die durch  $\alpha$ -Sekretase ( $\gamma$ -Sekretase) Aktivität erzeugt werden. Diese sind durch den erheblichen Größenunterschied jedoch deutlich vom FL-Protein unterscheidbar (A'). Als

Expressionskonstrukte kamen die in **A** abgebildeten zum Einsatz. Grundgerüst ist hierbei das NG2\_del Konstrukt, welches eine Deletion des Großteils der extrazellulären Region vor den LNS Domänen beinhaltet. NG2\_del kam sowohl ohne *tag* (*untagged*) als auch mit *tag* (*tagged*) in der extrazellulären Region (Flag\_NG2\_del, (Biname et al., 2013)) sowie der intrazellulären Region (NG2\_del\_Myc) zum Einsatz (**A**). Das murine NG2 FL-Proteins ist im WB bei einer Größe um die 300 kD (glycosyliert) detektierbar, daraus ergibt sich für die größtmögliche Ektodomäne ein Größe um die 290 kD und eine CTF Größe von 12 kD wenn man eine extrazelluläre Spaltung im Abstand von 10 AS von der Transmembrandomäne unterstellt. Für die NG2\_del Konstrukte ergibt sich entsprechend ein gleich großes CTF (bei einer *untagged* Sequenz in diesem Bereich), die Ektodomäne der Flag\_NG2\_del beträgt bei einer so platzierten Spaltung 54 kD gegenüber 66 kD des FL-Proteins (**A**).

Um die Auswirkung der  $\alpha$ -Sekretasen ADAM 10&17 auf unterschiedliche NG2 Fragmente zu untersuchen wurden diese in der murinen OPC Zelllinie Oli-neu überexprimiert, welche endogene NG2 Expression aufweist. Dabei kam ein HA *tagged* ADAM 17 zum Einsatz, welches sich über den HA *tag* nachweisen ließ (Abbildung 4.1-1 B). Für das *untagged* ADAM 10 Konstrukt kein passender AK zur Verfügung (humane cDNA), weshalb ein Nachweis auf Proteinebene für das überexprimierte humane ADAM10 nicht erbracht werden konnte. Es ließ sich jedoch unter der getrennten Überexpression beider Proteasen eine signifikante Abnahme um über das 2-fachen der NG2 FL-Proteinmenge im post nukleären (PN) Zellysat (cyto AB) feststellen. Im den selben PN Lysaten sowie dem Kulturmedium gab es keine signifikante Änderung des mit dem mc AK detektierbaren NG2 Signals. Der cyto AK zeigte für das Kulturmedium keine Reaktion (nicht gezeigt).

#### 4.1.2 Pharmakologische Hemmung der $\alpha$ -Sekretase ADAM10

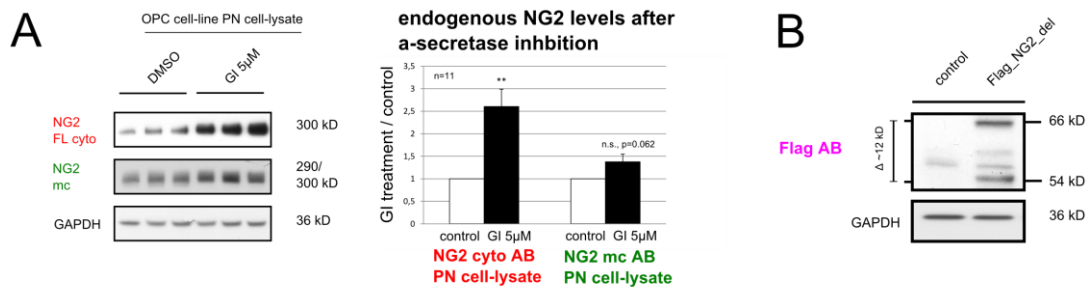


Abbildung 4.1-2 Pharmakologische Hemmung von ADAM 10 reduziert die NG2 Proteinmenge.

A zeigt postnukleäre (PN) Lysate von Oli-neu Zellen im WB samt zugehöriger Quantifizierung mittels NG2 cyto / mc AK. Hier zeigte sich eine signifikante Zunahme des FL NG2 Proteins (NG2 cyto AK) durch den spezifischen ADAM 10 Inhibitor GI. Dies zeigt einen umkehrten Effekt im Vergleich zur Überexpression von ADAM10 (Abbildung 4.1-1 B). Sowie eine endogene konstitutive ADAM 10 Prozessierung von NG2. In B ist ein WB eines Oli-neu Zelllysates gezeigt bei denen das Flag-NG2<sub>del</sub> Konstrukt transient transfiziert wurde. Die beiden Hauptbanden bei 66 und 54 kD entsprechen einer um 12 kD reduzierten Form (Ektodomäne) von NG2, ausgehend von der 66 kD Form als FL-Protein (Abbildung 4.1-1 A&A'). Auch hier findet eine endogene Spaltung des NG2<sub>del</sub> Konstrukts statt. (n=11, n= ein Replikat aus 4 unabhängigen Experimenten)

Um die Umkehrbarkeit des durch die Überexpression von ADAM10 (17) (4.1.1) festgestellten Effekts zu überprüfen, wurde die als konstitutiv aktiv beschriebene  $\alpha$ -Sekretase ADAM 10 spezifisch durch den pharmakologischen Inhibitor GI254023X (GI) gehemmt. Dieser wurde auf die untransfizierte Oli-neu Zelllinie über das Kulturmedium appliziert. Jeglicher Effekt sollte dementsprechend von der Hemmung der endogenen ADAM 10 Protease Aktivität herrühren. Durch die Hemmung von ADAM 10 konnte die Proteinmenge des NG2 FL-Proteins signifikant um das über 2,5-fache erhöht werden (Abbildung 4.1-2 A).

Um den Größenunterschied der abgespaltenen Ektodomäne genauer untersuchen zu können wurde das Flag-NG2<sub>del</sub> Konstrukt in Oli-neu Zellen exprimiert und mit einem Flag AK nachgewiesen. Es konnten Hauptbanden bei 66 kD und 54 kD festgestellt werden (Abbildung 4.1-2 B), die dem FL-Protein bzw. der postulierten NG2 Ektodomäne entsprechen (Abbildung 4.1-1 A').

### 4.1.3 Pharmakologische Hemmung $\gamma$ -Sekretase

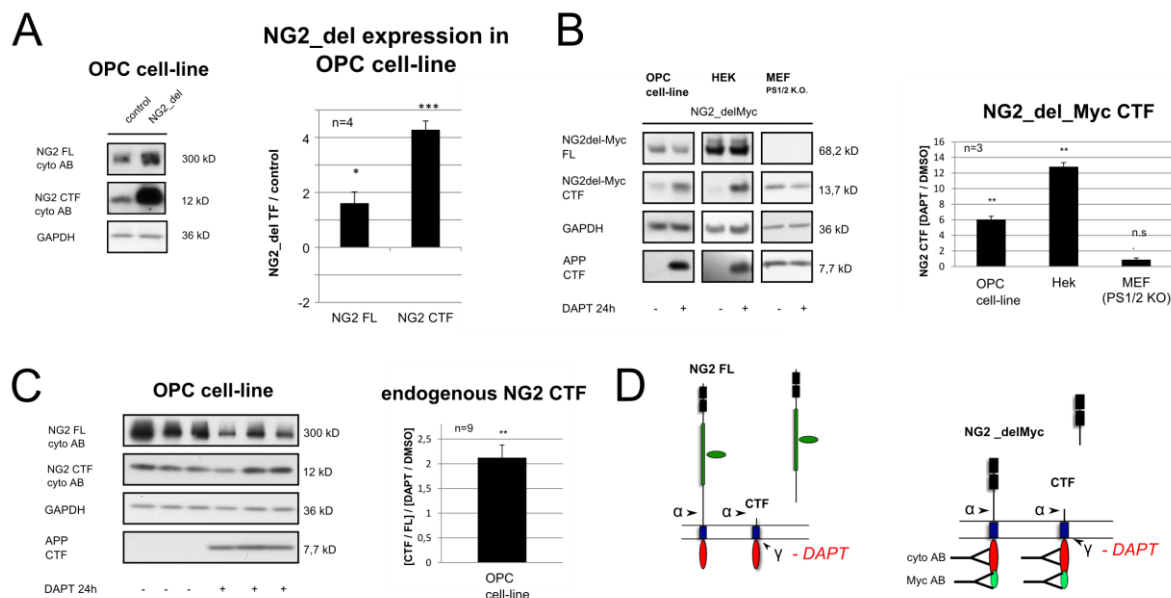


Abbildung 4.1-3 Pharmakologische Hemmung der  $\gamma$ -Sekretase erhöht NG2 CTF Menge.

Ein weiterer Nachweis der  $\alpha$ -Sekretase Spaltung von NG2(<sub>del</sub>) ist der Nachweis eines entsprechenden CTF von 12 kD (13,7 kD bei Myc tagged CTF). A bereits durch die Expression des NG2<sub>del</sub> Konstrukts konnte die Menge des NG2 CTF um das 4-fache gegenüber dem endogenen NG2 CTF in der Kontrolle (Leerplasmid) angehoben werden. Das endogene sowie das von NG2<sub>del</sub> abgeleitete CTF laufen dabei exakt auf der gleichen Höhe bei der SDS-PAGE. In B wurde das NG2<sub>del</sub>Myc (D) in verschiedenen Zelllinien transfiziert, zusätzlich wurde der  $\gamma$ -Sekretase Inhibitor DAPT teilweise appliziert. In Oli-neu und Hek Zellen ließ sich die CTF Menge durch DAPT Zugabe um das 6 bzw. 12-fache erhöhen. In MEF Zellen mit doppel *knock-out* für Presenilin 1 und 2 (PS 1/2 KO, keine  $\gamma$ -Sekretase Aktivität), war die CTF Menge nach DAPT Zugabe unverändert. C die endogene CTF Menge von NG2 in Oli-neu Zellen ließen sich ebenfalls durch DAPT Zugabe um das 2-fache erhöhen. Dabei wurde die CTF Menge zusätzlich gegen das FL NG2 Protein normalisiert. (A, n=4, n=eine unabhängige TF; B, n=3, n=eine unabhängige TF je Zelllinie; C, n=9, n=Replikat aus 3 unabhängigen Replikaten;)

Der für die Erzeugung eines CTF als obligatorisch beschriebene Spaltungsmechanismus durch eine  $\alpha$ -Sekretase sollte neben einer Ektodomäne von 290 kD zu einem NG2 CTF von 12 kD führen (bei Myc tagged CTF 13,7 kD, Abbildung 4.1-3 D). Sollte das NG2<sub>del</sub> Konstrukt in gleicher Weise prozessiert werden wie das endogene NG2 Protein, so müsste ein CTF von identischer Größe erzeugt werden. In Abbildung 4.1-3 A ist ein Anreicherung des 12 kD großen NG2 CTF gezeigt, Bedingung hierfür war eine Expression des NG2<sub>del</sub> Konstrukts. Somit kann von einer  $\alpha$ -Sekretase Spaltung des endogenen und des NG2<sub>del</sub> Konstrukts ausgegangen werden. Um eine weitere Prozessierung des NG2 CTFs durch die  $\gamma$ -Sekretase zu zeigen wurde zunächst das NG2<sub>del</sub>Myc Konstrukt in unterschiedlichen Zelllinien exprimiert um eine vom endogenen CTF unabhängigen Nachweis zu ermöglichen. Zusätzlich wurde die  $\gamma$ -Sekretase spezifisch durch den etablierten Inhibitor DAPT gehemmt,

welches bei einer konstitutiven Aktivität dieser Sekretase zu einer Anreicherung der CTF Menge unter inhibitorischen Bedingungen führen sollte.

Abbildung 4.1-3 B zeigt eine Anreicherung der *myc tagged* CTF Menge um das 6-fache in Oli-neu und 12-fache in Hek Zellen durch die Zugabe von DAPT. In MEF Zellen mit einem Presenilin 1 und 2 doppel *knock-out* (PS 1/2 KO, keine  $\gamma$ -Sekretase Aktivität) hingegen zeigt die DAPT Applikation keine Veränderung bei der CTF Menge, welches zusätzlich für eine spezifische  $\gamma$ -Sekretase Aktivität spricht. Das endogen gespaltene CTF konnte ebenfalls durch DAPT um das 2-fache angereichert werden (Abbildung 4.1-3 C). Allerdings hat die Inhibierung einen die OPC Differenzierung beschleunigenden Effekt, welcher schon in der Literatur beschrieben wurde (Watkins et al., 2008), dabei wird unter anderem die NG2 Expression herunterreguliert. Dies lässt sich auch in Oli-neu feststellen, hier ist eine deutliche Abnahme des FL-Proteins festzustellen, weshalb die CTF Menge zusätzlich gegen das Signal des FL-Proteins normalisiert wurde.

### 4.1.4 Hemmung von $\alpha$ - und $\gamma$ -Sekretase in einem zellfreien Assay

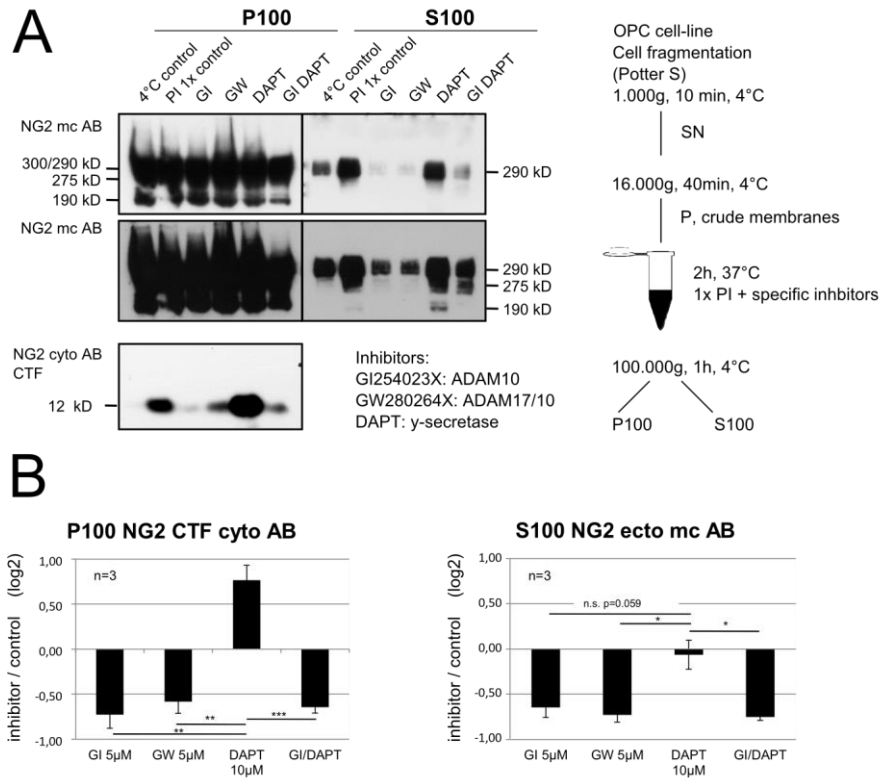


Abbildung 4.1-4 NG2 wird sequentiell durch  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Sekretase gespalten.

A zeigt den schematischen Ablauf des Protease Assay sowie eine WB Analyse der in diesem Rahmen erhaltenen Fraktionen, P100 und S100, nach Ultrazentrifugation. Diese wurden mittels unterschiedlicher NG2 AK analysiert. Die verwendeten Inhibitoren sind samt Zielprotease ebenfalls aufgeführt. In B sind die Quantifizierungen für das 12kD NG2 CTF der P100 Fraktion und das der 290kD Ektodomäne in der S100 Fraktion gezeigt. So ließ sich die CTF Menge durch die  $\alpha$ -Sekretase Hemmer GI und GW jeweils reduzieren durch die DAPT Applikation hingegen gegenüber der Kontrolle (PI 1x control) anreichern. GI und DAPT zusammen hatten den gleichen Effekt wie GI alleine. Somit wird mit reduzierter  $\alpha$ -Sekretase Aktivität weniger CTF gebildet ohne  $\gamma$ -Sekretase mehr, dies zeigt eine endogene Aktivität beider Protease Typen. Ist die  $\alpha$ -Sekretase gehemmt, spielt die  $\gamma$ -Sekretase keine Rolle (GI/DAPT), welches für eine obligatorisch sequentielle Spaltung durch erstere spricht. Im Überstand S100 konnte die 290 kD Ektodomäne durch gehemmte  $\alpha$ -Sekretase Aktivität (GI oder GW) reduziert werden, DAPT alleine hatte keinen Effekt auf die Ektodomän Prozessierung. Neben den quantifizierten Banden sind im Falle des 12 kD CTFs keine weiteren CTFs detektierbar, somit kommt nur die 290kD Ektodomäne als primäres Spaltprodukt in Frage. Als lösliche Fragmente (S100) lassen sich neben der 290 kD Form noch Banden bei 275 und 190 kD feststellen. All diese Fragmente sind allerdings in erheblich höherem Anteil auch in der P100 Fraktion nachweisbar, was für eine hohe Adhäsion zur Membranfraktion spricht. Keins dieser Fragmente in der S100 Fraktion zeigt eine Reaktivität mit dem NG2 cyto AK, die Bande auf Höhe der 300 kD Form in P100, jedoch schon (nicht gezeigt). (n=3, n=ein unabhängiges Experiment)



Ein alternativer Ansatz zum Nachweis der sequentiellen Spaltung von NG2 durch  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Sekretase stellt der in Abbildung 4.1-4 dargestellte zellfreie Protease Assay da. Dieser basiert auf der Inkubation von aufgereinigten Oli-neu Zellmembranen (*crude membranes*, CM) mit unterschiedlichen Protease Inhibitoren bei physiologischen Bedingungen, welches eine kontrollierte proteolytische Aktivität innerhalb der Membranfraktion ermöglicht. Die abgespaltenen löslichen Fragmente sind nach anschließender Ultrazentrifugation im Überstand nachweisbar (S100), alle membran-assoziierten Protein (fragmente) im Pellet. Alle Bedingungen sind zur Kontrolle (PI 1x control, 0 Linie) in Bezug gesetzt.

In der pelletierten Fraktion (P100) wurde die NG2 CTF Menge ausgewertet, welches sich durch die  $\alpha$ -Sekretase Inhibitoren GI und GW reduzieren ließ und durch die  $\gamma$ -Sekretase Inhibition mittels DAPT anreichern ließ (Abbildung 4.1-4 A&B). Eine Kombination aus  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Sekretase Inhibitor (GI/DAPT) führte zum selben Effekt wie die einzelne Hemmung der  $\alpha$ -Sekretase. Somit kann von einer endogenen Aktivität beider Proteasen ausgegangen werden, wobei die  $\gamma$ -Sekretase keine Aktivität zeigt, wenn die  $\alpha$ -Sekretase gehemmt ist (GI/DAPT). Dies entspricht der aus der Literatur bekannten obligatorischen sequentiellen Prozessierung der beteiligten Proteasen. Im Überstand (S100) ließ sich die NG2 Ektodomäne durch die  $\alpha$ -Sekretase Inhibition reduzieren, die Hemmung der  $\gamma$ -Sekretase hatte keinen Effekt, somit war die Ektodomänen Spaltung unabhängig von dieser. Durch die Spezifität der  $\alpha$ -Sekretase Inhibitoren lassen sich weiter Rückschlüsse auf die beteiligten Proteasen ziehen. GI hemmt ADAM 10 sehr spezifisch, wobei GW ADAM 10 und ADAM 17 hemmt (Ludwig et al., 2005), da jedoch beide Inhibitoren einen gleich starken Effekt auf die NG2 Ektodomän und CTF Menge aufweisen, ist davon auszugehen, dass ADAM 10 auch hier die Protease ist, welche den Großteil der  $\alpha$ -Sekretase Aktivität aufzeigt.

Neben der 290 kD großen Ektodomäne von NG2 in der S100 Fraktion, lassen sich Proteinbanden bei 275 und 190 kD nachweisen, allerdings ließ sich nur ein CTF von der Größe von 12 kD detektieren passend zur 290 kD Ektodomäne (Abbildung 4.1-4 A). Die kleineren Fragmente sind demnach sekundäre Spaltprodukte der 290 kD Ektodomäne. Zusätzlich lässt sich die große Mehrheit der 275 und 190 kD Fragmente in der P100 Fraktion nachweisen, welches eine hohe Bindeeigenschaft zur Membranfraktion zeigt und sich mit den Beobachtungen aus den Zellkulturversuchen deckt (Kap. 4.1.1).

## 4.2 Lokalisierung der NG2 Spaltprodukte

### 4.2.1 Zelluläre Lokalisierung von NG2 Spaltprodukten *in vitro*

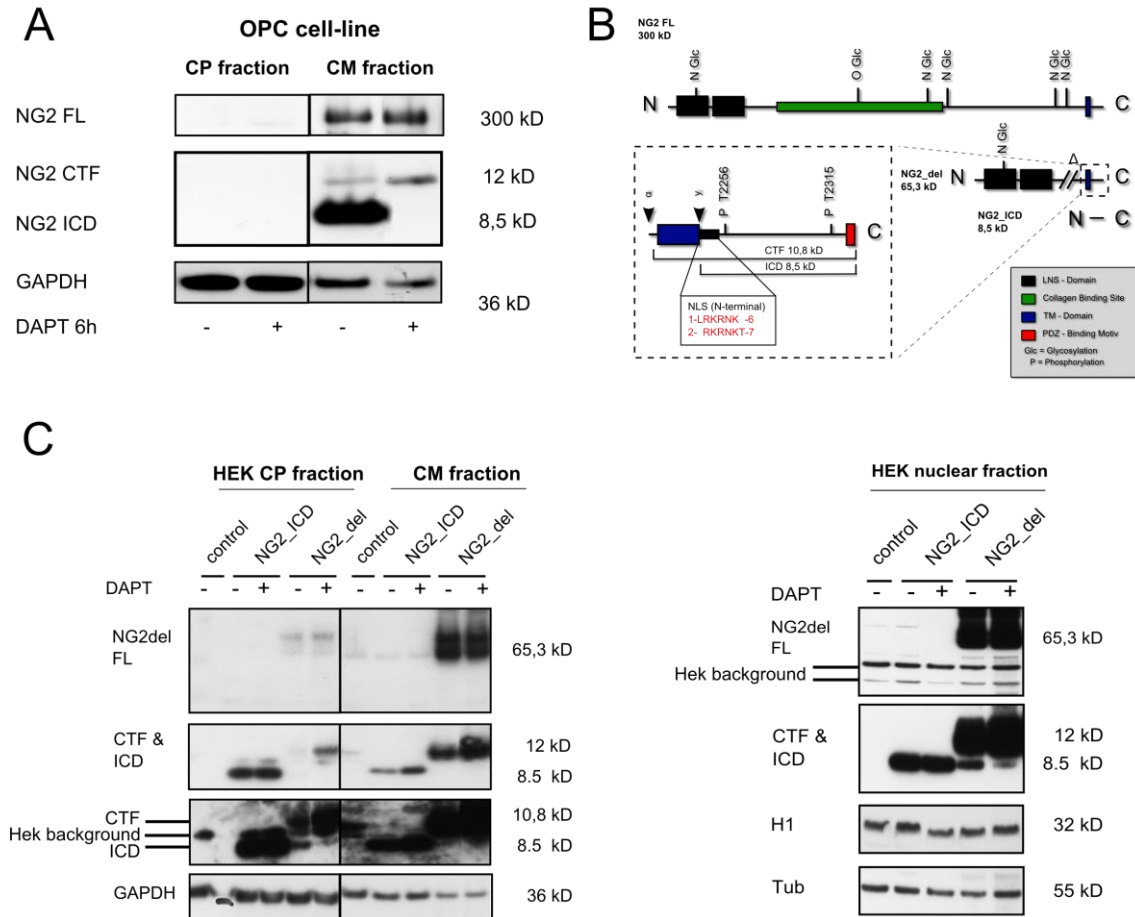


Abbildung 4.2-1 NG2 ICD zeigt unterschiedliche Lokalisierung.

A zeigt den WB einer subzellulären Fraktionierung von Oli-neu Zellen. So war es möglich die durch die  $\gamma$ -Sekretase vom NG2 CTF abgespaltenen NG2 ICD in der *crude membrane* Fraktion (CM) von Oli-neu Zellen nachzuweisen nicht aber in der *cytoplasmata* Fraktion (CP) oder Kernfraktion (nicht gezeigt). Dabei war die Präsenz der ICD abhängig von der Absenz des Inhibitors DAPT. Allerdings war die ICD in Oli-neu unter gleichen Bedingungen nicht immer reproduzierbar nachweisbar (A). Nach der Überexpression von NG2\_ICD bzw NG2\_del in Hek (C), war die ICD am besten in der nukleären Fraktion nachweisbar aber auch in der cytoplasmatischen. Im Falle der NG2\_del Transfektion muss jegliche detektierte NG2 ICD von diesem Konstrukt durch Prozessierung auf Proteinebene entstanden sein, da in Hek kein NG2 vorhanden ist und in der Kontrolle auch keine Bande auf der Höhe der rekombinanten ICD (NG2\_ICD) vorhanden ist. Die von NG2\_del abgeleitete ICD läuft allerdings auf gleicher Höhe wie die rekombinante ICD (NG2\_ICD). In der *crude membrane* (CM) Fraktion waren in Hek die geringsten ICD Mengen detektierbar. Lediglich die von NG2\_del abgeleiteten ICD zeigte eine Reduktion durch DAPT. Die NG2 CTF Mengen waren in der nukleären und CM Fraktion am stärksten ausgeprägt. In B ist außerdem die per *in silico* Sequenzanalyse (ELM Database) identifizierte NLS Sequenzen am N-terminus der NG2 ICD eingezeichnet.

Die Spaltung des NG2 CTFs durch die  $\gamma$ -Sekretase führt zur Abspaltung eines intrazellulären Fragments auch intrazelluläre Domäne (ICD) genannt. Die folgenden Experimente beschäftigen sich mit dem Nachweis und der zellulären Lokalisierung dieser NG2 ICD. Interessanter Weise enthält die NG2 ICD Sequenz unmittelbar nach der Transmembrandomäne zwei konservierte nukleäre Lokalisierungssequenzen (NLS, ELM *prediction*) wie in Abbildung 4.2-1 B gezeigt.

In Lysaten ganzer Oli-Zellen ließ sich die ICD nicht nachweisen, weshalb eine grobe zelluläre Fraktionierung in eine lösliche Zytoplasmafraktion (CP), eine grobe Membranfraktion (CM) und eine nukleäre Fraktion (*nuclear fraction*) durchgeführt wurde. Letztere enthält neben den Zellkernen auch noch einen erheblichen Anteil an intrazellulären Membranen, wie Membranen des Endoplasmatischen Retikulums und kann deshalb nicht als reine Kernfraktion interpretiert werden. Mittels dieser groben subzellulären Fraktionierung ließ sich die NG2 ICD in Oli-neu Zellen mittels WB nur in der CM Fraktion nachweisen, in welcher die Präsenz von DAPT zu einem Verschwinden des Signals führte. Allerdings war die NG2 ICD in Oli-neu unter gleichen Bedingungen nicht reproduzierbar nachweisbar.

Zudem wurde eine Überexpression von NG2<sub>del</sub>, dessen Spaltung ebenfalls zu einer NG2 ICD führen sollte, sowie der rekombinanten NG2 ICD durch das NG2\_ICD Konstrukt in Zellen ohne endogener NG2 Expression (HEK) durchgeführt. Die Expression des NG2\_ICD Konstrukts führte zu sehr hohen ICD Protein Menge, die sich in jeder der drei Fraktionen nachweisen ließ, wobei sich die stärksten Signale in der nukleären & CP Fraktion finden lassen, die Menge der rekombinanten ICD waren unabhängig von der DAPT Zugabe. NG2<sub>del</sub> als FL-Protein und das entsprechende CTF ließen sich hauptsächlich in der nukleären und der CM Fraktion nachweisen. Eine ICD vom NG2<sub>del</sub> Konstrukt entstammend, welche erheblich niedrigere Mengen zeigte als die der rekombinanten ICD, aber auf gleicher Höhe lief, ließ sich hauptsächlich in der nukleären Fraktion detektieren. In der CP war diese ICD ebenfalls detektierbar allerdings an der Nachweisgrenze, die CM Fraktion zeigte keine nachweisbare ICD.

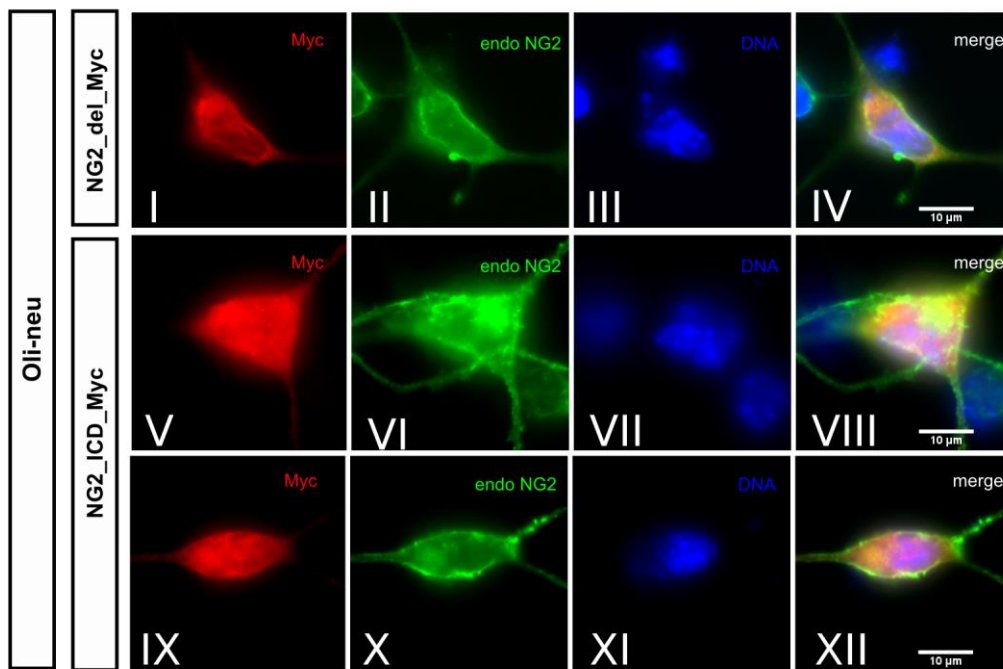


Abbildung 4.2-2 NG2 ICD weist nukleäre Färbung auf.

Die Abbildung zeigt (I-IV, c-terminaler Myc tag, rot) die Expression von NG2\_del\_Myc in Oli-neu Zellen mit einer Lokalisierung innerhalb von Membransystemen. NG2\_del\_Myc lokalisiert dabei sowohl an der Zellmembran (markiert mit endogenem NG2, II, grün), als auch an intrazellulären Membranen. Die Zellkerne sind dabei weit weniger stark gefärbt und im Vergleich mit der umliegenden Färbung als negativ gefärbte Struktur erkennbar. Bei der Expression von NG2\_ICD\_Myc, zeigt sich eine fast homogene Färbung des Zellinneren inklusive der Zellkerne, sowie der äußeren Zellmembran. Somit zeigt die Überexpression der NG2 ICD abermals eine nukleäre Lokalisierung. Die beiden NG2\_del und das ICD Konstrukt wurden dabei über einen für den tag spezifischen AK nachgewiesen (Myc AK). (Die beschriebenen Effekte zeigten sich bei 100% der NG2\_del\_Myc und über 70% der NG2\_del\_ICD transfizierten Zellen; je 3 TF, mind. 12 Zellen pro TF)

Wie im vorherigen Kapitel angesprochen liegt NG2\_del hauptsächlich in membrangebundener Form, als FL-Protein oder CTF vor, die ICD macht nur einen geringen Anteil aus. Das am c-terminus tagged NG2\_del\_Myc Konstrukt zeigt eine hauptsächlich Lokalisierung an Membransystemen in Oli-neu Zellen (Abbildung 4.2-2 I-IV), welche sowohl die Zellmembrane (durch endogenes NG2 gefärbt, II), als auch intrazelluläre Membranen umfasst, wobei der Zellkern keine bzw. eine wesentlich schwächere Färbung aufweist. Wie in Abbildung 4.2-1 gezeigt liegen die ICD Menge, die von NG2\_del Konstrukten erzeugt werden, um ein vielfaches unter denen des direkt exprimierten NG2\_ICD Konstrukts (V-XII). In der Färbung zeigt das NG2\_ICD\_Myc Konstrukt in den meisten Fällen eine fast homogene Färbung, in Bezug auf die Intensität, des gesamten Zellinneren inklusive der Zellkerne, sowie der äußeren Zellmembran. Somit lässt sich neben der biochemischen Herangehensweise (Abbildung 4.2-1) auch in der Färbung durch Überexpression der NG2 ICD eine Kernlokalisierung nachweisen.

## 4.2.2 Zelluläre Lokalisierung von NG2 Spaltprodukten *in vivo*

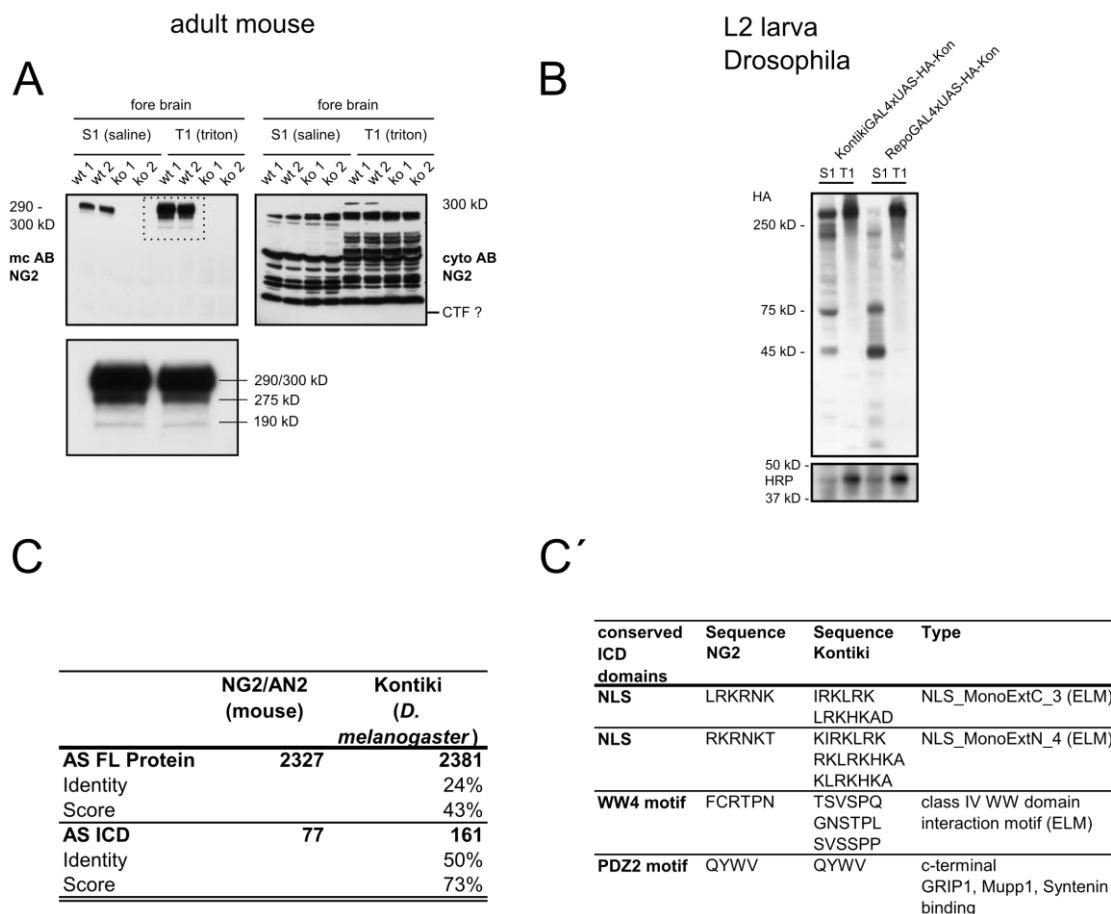


Abbildung 4.2-3 NG2 Ektodomäne lässt sich in Maus und Drosophila nachweisen.

Hier sind saline (S1) und Triton (T1) Extraktionen aus adultem Maus Gesamthirn und gesamt Drosophila L2 Larven gezeigt. In A sind die Extraktionen aus WT und NG2  $-/-$  Mäusen im WB abgebildet, in in der S1 Fraktion eine Hauptbande in der T1 Fraktion drei erkennbar. In der T1 Fraktion kommt für die intensivste und zugleich auch höchste Bande sowohl das NG2 FL-Protein als auch die 290 kD Ektodomäne in Betracht. Zusätzlich sind in der Vergrößerung Banden bei 275 und 190 kD erkennbar in Analogie zum Protease Assay (Abbildung 4.1-4). Der NG2 cyto AK gibt im Gesamtgewebe lediglich eine spezifische Bande für das NG2 FL aus, jedoch ist das NG2 CTF oder ICD nicht nachweisbar. B zeigt die Drosophila Proben, dabei wurde Kontiki (NG2) mit HA Tagte (UAS-HA-Kon) mit den Reporterstämmen KontikiGal4 und RepoGal4 gekreuzt. Testgewebe zeigte keine HA Reaktivität (nicht gezeigt). Es finden sich in der T1 Fraktion eine Hauptbande bei etwa 300 kD welche das FL-Protein und einer großen Ektodomäne entsprechen kann. In der S1 Fraktion waren Hauptbanden bei ~300, 190, 75, 45 kD erkennbar, welche frei wasserlösliche Fragmente repräsentieren, wobei die größte Bande die analoge Ektodomäne zur Maus darstellt. HRP wurde als Ladekontrolle verwendet (mit unbekanntem membrangebundenen neuronalen Antigen). In C sind Aminosäuresequenzvergleich zwischen Maus und Drosophila (NCBI, blastp) gezeigt. So weisen die ICD größere Ähnlichkeiten auf als das Gesamtprotein, bei dem die Anzahl aller AS fast identisch ist, die ICD in der Maus aber nur halb so viel AS aufweist. Identity meint identische AS, Score solche mit ähnlicher Funktion. In C' sind wichtige Sequenzmotive verglichen (ELM database).

Die Extrahierbarkeit des NG2 FL-Proteins sowie der 290 kD Ektodomäne aus murinem Hirngewebe ist schon vor einiger Zeit nachgewiesen worden (Nishiyama et al., 1995). Hier konnten aus adulten Gesamthirn sowohl in einer salinen (S1) als auch einer darauffolgenden Triton Extraktion (T1), spezifische NG2 Fragmente nachgewiesen werden (Abbildung 4.2-3 A). Die Spezifität der verwendeten AK wurde durch entsprechende Extraktionen aus NG2 -/- Mäusen bestätigt. Bei den so nachgewiesenen NG2 Fragmenten gab es in bestimmten Punkten Unterschiede. So kann bereits durch die verwendete Extraktionsmethode eine Aussage über die biochemischen Eigenschaften der nachgewiesenen Fragmente getätigt werden, da in der S1 Extraktion nur frei wasserlösliche Fragmente aus dem Gewebe herausgelöst werden können, welches u.a. membrangebundene Fragmente ausschließt. Somit kann es sich bei dem nachgewiesenen Hauptfragment in der murinen S1 Fraktion aufgrund der Größe und der biochemischen Eigenschaften nur um die 290 kD große Ektodomäne handeln, welches zusätzlich durch eine nicht Detektierbarkeit mittels NG2 cyto AK bestätigt wurde.

Im Folgenden wurden nach der salinen Extraktion alle TritonX-100 löslichen Proteine (T1) aus demselben Ausgangsgewebe gelöst, welches die meisten Membranproteine mit einschließt. Im Umkehrschluss, kann man deshalb davon ausgehen, dass die so enthaltenen Fragmente entweder selbst membrangebunden waren, etwa durch eine Transmembrandomäne oder zumindest membran-assoziiert sind, etwa durch die Bindung an ein Membranprotein. In Analogie zu den Ergebnissen des zellfreien Protease Assays (Abbildung 4.1-4), kann in der murinen T1 Fraktion das NG2 FL-Protein sowie die Ektodomäne/Fragmente bei 290, 275 und 190 kD nachgewiesen werden. Auch *in vivo* scheinen diese Fragmente hauptsächlich membran-assoziiert zu sein. Die Präsenz des FL-Proteins konnte durch den NG2 cyto AK bestätigt werden.

Um eine vergleichbare Analyse auch in *D. Melanogaster* durchführen zu können, wurden zelltyp-spezifische Reporterlinien mit solchen, die ein HA *tagged* Kon-tiki (NG2) exprimieren, gekreuzt (Kooperation Alvaro Bustos und Dr. B. Altenhein (AG Technau)). Der HA *tag* befindet sich bei diesem innerhalb der extrazellulären Region. Bei einer spezifischen Expression unter dem Kon-tiki Promoter (KontikiGAL4xUAS-HA-Kon, Glia Subpopulation und Muskelzellen), konnte ein deutliches Signal der größtmöglichen Ektodomäne in der S1 Fraktion auf der Höhe der höchsten Bande der T1 Fraktion nachgewiesen werden (Abbildung 4.2-3 B). Diese höchste Bande in der T1 Fraktion ist die einzige in dieser Fraktion und kann neben dem FL Kon-tiki auch die Ektodomäne enthalten. Die Größe der beiden höchsten Banden aus S1 und T1 sind vergleichbar mit denen aus der Maus. In der S1 Fraktion lassen darüber hinaus noch zwei größere Fragmente vergleichbar mit den 275 und 190 kD aus der Maus detektierbar, sowie Banden bei 75 und 45 kD. Bei einer Expression des HA-Kon unter der Kontrolle des Repo Promoters (RepoGAL4xUAS-HA-Kon), dies entspricht einer Expression in allen Glia Zellen. Hierbei ergab sich gegenüber der zuvor beschriebenen Expression ein Unterschied in der S1 Fraktion, hier war die Intensität der größten Bande reduziert wohingegen die der 75, 45 kD erhöhte Intensität aufwies.

Ein Sequenzvergleich zwischen Maus und Drosophila zeigt eine fast gleiche Anzahl an AS (Abbildung 4.2-3 C) für das FL-Protein zwischen den beiden Spezies, identische AS stellen 24% der Sequenz da, wobei 43% der AS mit ähnlicher Funktion aufweisen. Der intrazelluläre Teil besitzt in Drosophila mit 161 AS gegenüber 77 in der Maus mehr als doppelt so viele AS, allerdings scheint der intrazelluläre Teil stärker konserviert zu sein, da hier 50% der AS identisch sind bzw. 73% vergleichbare Funktion aufweisen. Die in Abbildung 4.2-3 C' dargestellten ausgewählten Sequenzen auf den jeweiligen ICDs, zeigen, dass das PDZ Bindemotiv zu 100% konserviert ist. Sequenzen der nuklären Lokalisierungssequenzen (NLS) oder des WW4 Bindemotivs unterscheiden sich zwar leicht in ihrer Sequenz, weisen nach Datenbank Analyse allerdings die gleiche Funktionalität auf.

### 4.3 Signalfunktionen des intrazellulären Teils von NG2

#### 4.3.1 Der Einfluss von NG2 Spaltprodukten auf die zelluläre Expression

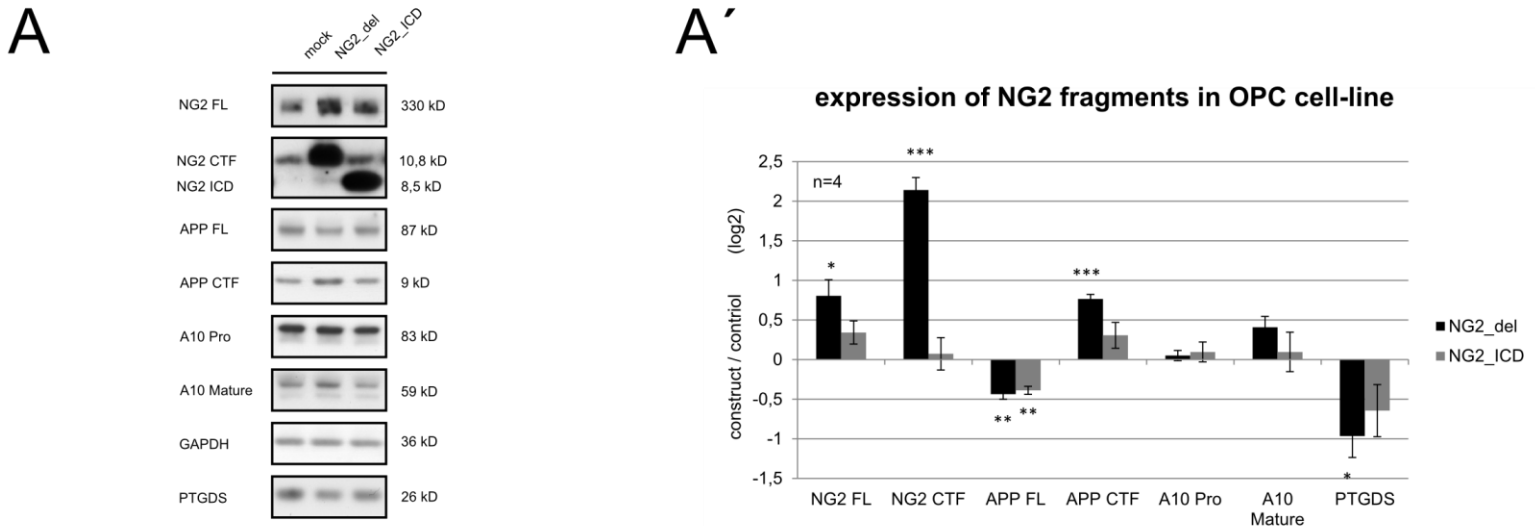


Abbildung 4.3-1 NG2 Konstrukte beeinflussen die Proteinexpression.

NG2\_del und NG2\_ICD wurden in Oli-neu Zellen exprimiert und der Einfluss auf die Proteinmengen der hier abgebildeten Zielproteine untersucht. A zeigt den entsprechenden WB und A' die quantitative Auswertung. Die NG2 CTF Mengen sind durch die direkte Prozessierung von NG2\_del unmittelbar erhöht (siehe auch Abbildung 4.1-3 A). Das endogene NG2 u APP FL-Protein weisen eine leichte Regulation in entgegengesetzte Richtung auf, zudem sind die APP CTF Mengen erhöht im Gegenteil zum APP FL-Protein, dies deutet auf eine erhöhte Spaltung von APP hin. So ist die proteolytische Form von ADAM 10 (A10 mature) zusätzlich leicht erhöht. Das Enzym PTGDS ist durch die beiden NG2 Konstrukte erniedrigt, die Relevanz für dieses Protein zeigt sich in diesem Kapitel. Da der Effekt durch NG2\_ICD stets die gleiche Richtung aufwies wie der von NG2\_del aber immer schwächer ausgeprägt war, kann davon ausgegangen werden, dass die ICD Sequenz für den Effekt ausreicht, dieser aber in membrangebundener Form oder in geringerer Dosis der ICD, wie im Falle der NG2\_del Expression stärker ausgeprägt ist.

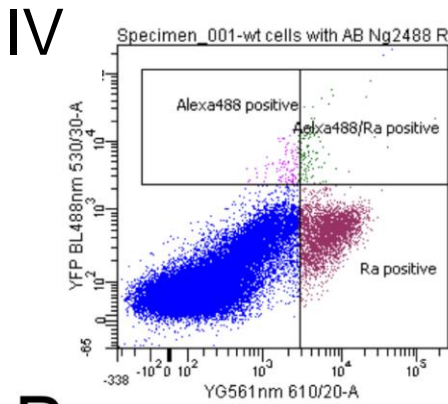
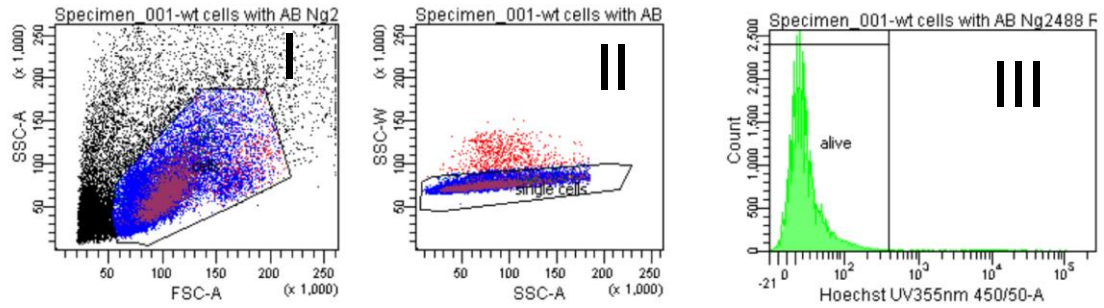
Die Expression von NG2\_del und NG2\_ICD in Oli-neu Zellen, brachte einige Änderungen der relativen Protein-Menge gegenüber der der Kontrolle (Leer Plasmid) hervor (Abbildung 4.3-1). Dabei zeigte sich für beide Konstrukte tendenziell die gleichen Änderungen. Bei der NG2\_del Expression waren diese aber stärker ausgeprägt als bei der NG2\_ICD Expression. Somit scheint die ICD Sequenz für die beobachteten Änderungen ausreichend zu sein. Die einzige Ausnahme stellten die NG2 CTF Mengen dar, diese wurden nur durch die Expression von NG2\_del erhöht. Hier liegt jedoch ein direkter Effekt auf Proteinebene nahe, da das NG2\_del FL-Protein wie bereits beschrieben (Abbildung 4.1-3) durch die  $\alpha$ -Sekretase gespalten wird und so mehr NG2 CTF entsteht.



Neben den endogenen NG2 FL-Protein Mengen, welche leicht erhöht waren, wiesen auch die APP Mengen eine Veränderung auf, wobei hier das FL APP Protein erniedrigt war und die APP CTF Menge erhöht war. Unter Berücksichtigung der proteolytisch aktiven maturen ADAM10 Form, welche ebenfalls leicht erhöht war, könnte auch von einer leicht erhöhten Aktivität von ADAM10 ausgegangen werden. Im Falle von APP kann dies eine Verschiebung der FL/CTF Mengen erklären. Schlussendlich war die Menge des Enzyms PTGDS, auf das im folgenden Kapitel noch detailliert eingegangen wird, durch die Überexpressionsbedingungen reduziert (siehe Transkriptom Analyse 4.5).

4.3.2 Expression relevanter Ziele in FACS sortierten OPC von NG2 -/- Mäusen

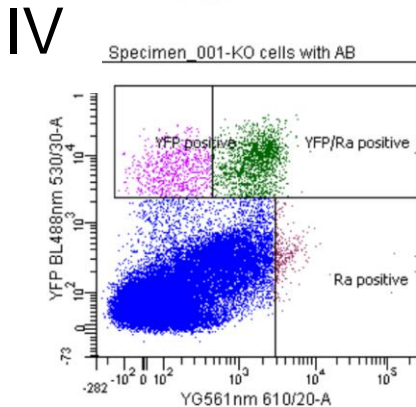
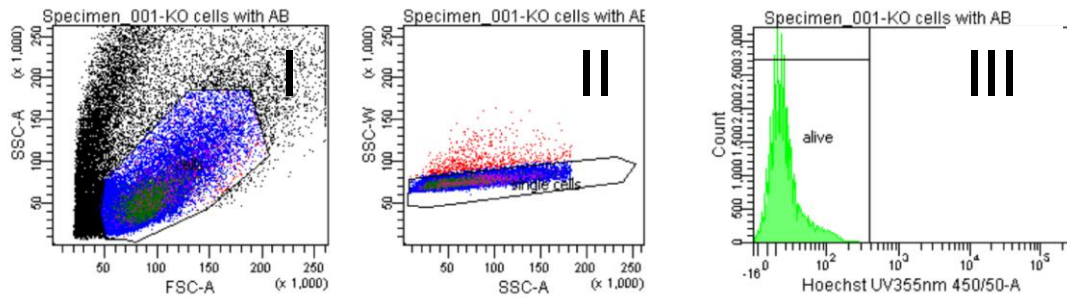
**A** WT - doublestaining



**V** Tube: wt cells with AB Ng2488 RaDF567\_DAPI

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	50,000	####	100.0
cells	40,239	80.5	80.5
single cells	39,577	98.4	79.2
alive	39,315	99.3	78.6
Alexa488 positive	106	0.3	0.2
Alexa488/Ra positive	115	0.3	0.2
Ra positive	3,075	7.8	6.2

**B** KO - doublestaining



**V** Tube: KO cells with AB

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	70,131	####	100.0
cells	48,708	69.5	69.5
single cells	48,043	98.6	68.5
alive	48,043	100.0	68.5
YFP positive	724	1.5	1.0
YFP/Ra positive	1,628	3.4	2.3
Ra positive	337	0.7	0.5

Abbildung 4.3-2 Unterschiede bei der OPC Gesamtpopulation von WT und NG2 -/-

FACS Analyse Plots von OPC Doppelfärbungen von WT und NG2 -/- Einzelzelllösungen von P9 Mäusen. Im Falle der WT Mäuse wurden OPC mit dem mc NG2 AK/Alexa488 und PDGFR $\alpha$  AK (R $\alpha$ ) mit kovalentem Fluorophor gefärbt (A). Bei den NG2 -/- wurden die OPC mit demselben R $\alpha$  AK sowie endogenem YFP markiert (B). Die toten Zellen wurden mit Hoechst markiert. Aus dem Scatterplot der Gesamtpopulation wurde zunächst ein Fenster um alle lebenden Einzelzellen gesetzt (I-III), welches in beiden Genotypen in gleicher Weise erfolgte. Die so ausgewählten Zellen wurden auf 100% gesetzt und der Anteil der gefärbten OPC bestimmt (IV). In V kann dieses Verhältnis abgelesen werden % Parent.

### FACS Analysis doublestaining

Total OPC identified with	% of living cells (100%)			
	WT1	WT2	KO1	KO2
NG2(wt) oder EYFP (KO)	0,3	0,3	1,5	2
NG2(wt) oder EYFP(KO) und R $\alpha$	0,3	0,3	3,4	4,5
R $\alpha$ alone	7,8	7,8	0,7	0,3
Total OPC	8,4	8,4	5,6	6,8
Sorted OPC	8,1	8,1	4,9	6,5
sorted in % of total OPC	96,43	96,43	87,50	95,59
not sorted OPC	0,3	0,3	0,7	0,3
not sorted in % of total OPC	3,57	3,57	12,50	4,41

Tabelle 4.3-1 OPC lassen sich mit hoher Effizienz aus beiden Genotypen isolieren.

Ausgehend von der Abbildung 4.3-2 in gezeigten Analyse sind hier die Prozentwerte der sortierbaren OPC abhängig von der verwendeten Färbung dargestellt. Die NG2 Färbung war methodisch nicht verwertbar, da sie so gut wie keine OPC markierte. Trotzdem waren im WT wesentlich mehr OPC markierbar als im NG2 -/-. Für die eigentlichen Sorts wurde deshalb versucht, so viele OPC wie möglich zu sortieren, weshalb auf die hellrot markierten Färbungen zurückgegriffen wurde. Dies führte zu einer Sortierbarkeit von ~95 % der OPC innerhalb beider Genotypen (dunkelrote/grüne Markierung).

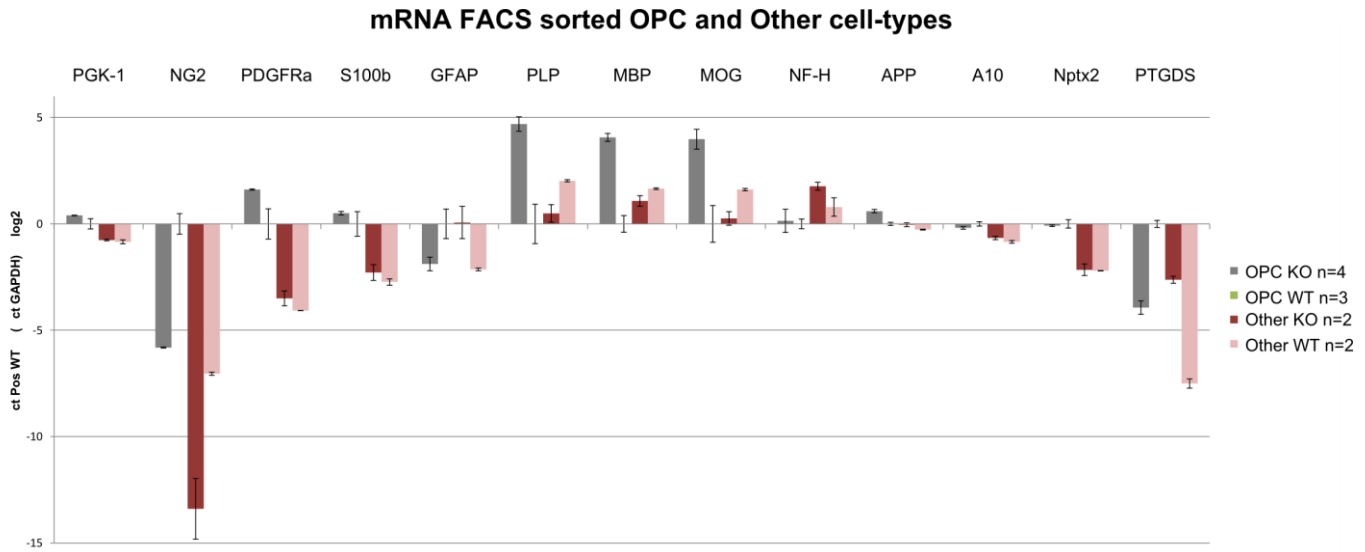


Abbildung 4.3-3 OPC von NG2 <sup>-/-</sup> Mäusen weisen Unterschiede bei der Genregulation auf.

Die nach Abbildung 4.3-2 und Tabelle 4.3-1 sortierten OPC (Positive Sort) aus WT und NG2 <sup>-/-</sup> Mäusen, sowie eine gleiche Anzahl an restlichen Zellen (Negative Sort, siehe Text), wurden einem Vergleich der mRNA Level mittels qRT-PCR unterzogen. Dabei wurde gegen GAPDH normalisiert ( $\Delta ct$ ) und schließlich das relative Verhältnis zu den WT OPC ( $\Delta \Delta ct$ , OPC WT=0) für jedes Zielgen gesetzt. Pkg-1 dient hierbei als zusätzliche Kontrolle (Haushaltsgen), NG2, PDGFR $\alpha$ , S100b, GFAP, PLP, MBP, MOG, NF-H dienen weiterhin als Zelltyp Marker. APP und ADAM10 als potentiell ubiquitäre Proteine/mRNAs (siehe ausführliche Beschreibung im Text). Für Nptx2 konnte eine Anreicherung innerhalb der OPCs gegenüber den restlichen Zellen gezeigt werden. Eine Regulation zwischen den Genotypen war nicht vorhanden. Für PTGDS konnte eine deutliche Reduktion der mRNA Level in den NG2 <sup>-/-</sup> OPC nachgewiesen werden (siehe Transkriptom Analyse 4.5). Bei den restlichen Zellen war eine genau umgekehrte Anreicherung zu beobachten. Was für eine Kompensation durch einen Zelltyp dieser Fraktion spricht. Siehe auch Tabelle 4.3-2.

## Ergebnisse

	PGK-1	NG2	PDGFRa	S100b	GFAP	PLP	MBP	MOG	NF-H	APP	A10	Nptx2	PTGDS
OPC KO n=4	0,4	-5,8	1,6	0,5	-1,9	4,7	4,1	4,0	0,1	0,6	-0,2	-0,1	-3,9
OPC WT n=3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Other KO n=2	-0,8	-13,4	-3,5	-2,3	0,1	0,5	1,1	0,3	1,8	0,0	-0,7	-2,2	-2,6
Other WT n=2	-0,8	-7,0	-4,1	-2,7	-2,1	2,0	1,7	1,6	0,8	-0,3	-0,8	-2,2	-7,5
deltaOPC (KO-WT)	0,4	-5,8	1,6	0,5	-1,9	4,7	4,1	4,0	0,1	0,6	-0,2	-0,1	-3,9
deltaOther (KO-WT)	0,1	-6,3	0,6	0,4	2,2	-1,5	-0,6	-1,4	1,0	0,2	0,2	0,0	4,9
KO OPC - KO Other	1,2	7,6	5,1	2,8	-1,9	4,2	3,0	3,7	-1,6	0,6	0,5	2,1	-1,3
WT OPC -WT Other	0,8	7,0	4,1	2,7	2,1	-2,0	-1,7	-1,6	-0,8	0,3	0,8	2,2	7,5
delta KO-WT	0,3	0,5	1,0	0,1	-4,1	6,2	4,6	5,3	-0,8	0,4	-0,4	-0,1	-8,8

Tabelle 4.3-2 Log2 Werte der mRNA Analyse aus Abbildung 4.3-3.

Hier sind die dem Balkendiagramm zugrunde liegenden log<sub>2</sub> Werte als Zahl angegeben. Wobei auch die Differenzen (delta) für verschiedene Vergleiche angegeben sind. Negative Werte bedeuten eine entsprechende Erniedrigung im KO gegenüber dem WT, positive das Gegenteil. [DeltaOPC (KO-WT)] bezieht sich dabei auf die Regulation zwischen den OPC der Genotypen. [DeltaOther (KO-WT)] auf die zwischen den restlichen Zellen (neg. Sorts) beider Genotypen. KO OPC - KO Other zeigt eine Anreicherung bei positiven Werten innerhalb KO OPC im Vergleich zu den restlichen Zellen, entsprechendes gilt für den WT. Für Nptx2 konnte eine Anreicherung innerhalb der OPCs gegenüber den restlichen Zellen in beiden Genotypen gezeigt werden (grünes Rechteck). Für PTGDS konnte eine deutlich unterschiedliche Regulation zwischen den Genotypen innerhalb der OPC, stark verminderte mRNA in den NG2 -/- OPC gemessen werden, als auch bei den restlichen Zellen wo eine genau umgekehrte Anreicherung zu beobachten war (rotes Rechteck).

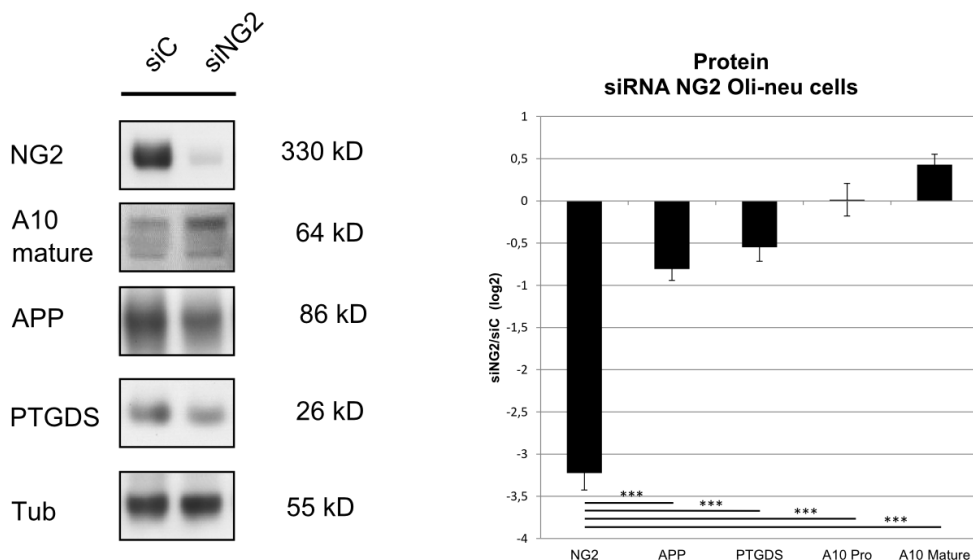


Abbildung 4.3-4 siRNA knock-down von NG2 zeigt vergleichbaren Effekt auf PTGDS.

Reduktion des NG2 Proteins in Oli-neu Zellen mittels siRNA, zeigt Auswirkungen auf die Proteinmengen von APP und PTGDS, beide erniedrigt. Die Erniedrigung der PTGDS Menge passt zur gefunden mRNA Regulation in den OPC von NG2 -/- Mäusen. (Abbildung 4.3-1und Abbildung 4.3-3).

Um die mRNA Expressionsmengen zwischen OPC aus WT und NG2  $-/-$  Mäusen vergleichen zu können, wurden diese mittels FACS aus einer P9 Einzelzellsuspension isoliert (vergleiche hierzu 3.9.5 und 4.3.3). Die heute bekannten spezifischen OPC Oberflächenmarker NG2 und PDGFR- $\alpha$ , wurden für die Markierung von WT OPC benutzt, im Falle von NG2  $-/-$  OPC wurde neben PDGFR- $\alpha$  endogenes eYFP (3.10.1) verwendet. Abbildung 4.3-2 zeigt eine FACS Analyse der Doppelmarkierung in beiden Genotypen. Alle lebenden Zellen (Hoechst negativ) wurden ausgewählt (*gate*) (A&B I-III) und als Ausgangspopulation für den Sort als 100% definiert (A&B IV).

Ausgehend von allen lebenden Zellen (100%), konnten so in den WT 8,4 % der lebenden Zellen mit beiden OPC Markern markiert werden, wobei die NG2 Färbung sehr schwach war und nur 0,6% der Gesamtzellen markiert wurden (7% der gesamt OPC), somit scheint diese für den FACS Sort nicht geeignet zu sein. Die PDGFR- $\alpha$  Färbung hingegen markierte 8,1 % der Gesamtzellen welches 96,43% der markierbaren OPC entsprach. Bei den NG2  $-/-$  OPC ließen sich im Schnitt 6,2% der lebenden Zellen als OPC markieren, also etwa 25% weniger als im WT. Und das obwohl hier die NG2 Färbung durch die endogene eYFP Markierung ersetzt wurde, welche im Schnitt 5,7 % der Gesamtzellen markierte was 92% der gesamt OPC entsprach, mit der PDGFR- $\alpha$  Färbung konnten 4,5% der Gesamtzellen markiert werden (73% der gesamt OPC)(Tabelle 4.3-1).

Für die eigentlichen Sorts wurden OPC aus WT mit PDGFR- $\alpha$  Markierung sortiert, NG2-KO OPC mittels eYFP. Da die OPC Populationen unterschiedlich groß waren und so jeweils die maximale OPC Anzahl sortiert werden konnte (rote Markierung, Tabelle 4.3-1).

Die Analyse der mRNA Mengen mittels qRT-PCR von den wie oben beschriebenen sortierten OPC beider Genotypen, sowie der restlichen Zellen, ist in Abbildung 4.3-3 als Balkendiagramm, sowie in Tabelle 4.3-2 als Auflistung der zu Grunde liegenden  $\log_2$  Werte, gezeigt. Für die Regulation der ausgewählten Zielgene kann nun entsprechend ein Vergleich zwischen den vier Proben Gruppen gezogen werden, wobei die Werte der WT OPC als Referenz (Null) gesetzt wurden ( $\Delta\Delta\text{act}$ ). So gibt ein Vergleich der OPC beider Genotypen, Aufschluss über eine Genotyp abhängige geänderte Regulation zwischen diesen ( $\text{deltaOPC}$  (KO-WT), Tabelle 4.3-2). Bzw. zwischen den restlichen Zellen beider Genotypen ( $\text{deltaOther}$  (KO-WT)). Positive delta Werte zeigen hier erhöhte mRNA Mengen im KO auf, negative reduzierte. Schwellenwert für eine Regulation waren delta Werte mit einem Betrag  $\geq 1$ . Ändert sich das Vorzeichen innerhalb eines regulierten Targets zwischen den  $\text{deltaOPC}$  und  $\text{deltaOther}$ , so kann man von einem Kompensatorischen Effekt ausgehen, insbesondere, wenn die Effekte in etwa den gleichen Betrag haben. Darüber hinaus kann es sinnvoll sein die generelle Anreicherung von mRNAs der OPC gegenüber den restlichen Zellen für jeden Genotyp zu betrachten (KO OPC – KO Other, bzw WT OPC – WT Other). Ein positiver Wert zeigt hier eine Anreicherung innerhalb der OPC an ein negativer das Gegenteil.

Mittels dieser Kriterien kann man die analysierten Targets näher betrachten, so sind PGK-1, S100 $\beta$ , NF-H, APP, A10 (ADAM10) und Nptx2 nicht Genotyp spezifisch reguliert. Die beiden Zelltypmarker S100 $\beta$  und NF-H dienen als Kontrolle für zelluläre Kontamination,

wobei der Astrozytenmarker S100 $\beta$  auch von einigen OPC exprimiert werden kann und deshalb nicht als reiner Astrozytenmarker verwendet werden kann. NF-H hingegen sollte spezifisch für neuronalen Zellen sein, hier kann man eine generelle Reduzierung der mRNA in den OPC feststellen. Die beiden OPC Marker NG2 ( $\log_2 \geq 7$ ) und PDGFR- $\alpha$  ( $\log_2 \geq 4,1$ ) konnten beide massiv in den OPC angereichert werden. Die Anreicherung der NG2 mRNA zeigte dabei erwartungsgemäß den größten Unterschied aller Zielgene und kann somit als zusätzlicher Schwellenwert gesehen werden. Im Kontrast zu S100 $\beta$  zeigte der Astrozytenmarker GFAP unterschiedliche mRNA Mengen sowohl bei den OPC als auch den restlichen Zellen, letztendlich ist das mRNA Niveau in -/- OPC reduziert (Pos Sort) im Neg Sort dagegen angereichert. Dies war mit umgekehrten Effekt bei allen untersuchten mRNAs für die Myelinproteine PLP, MBP, MOG der Fall. Diese konnten in NG2 -/- OPC deutlich angereichert werden, bei den restlichen Zellen dagegen waren diese im -/- angereichert.

Die beiden neurotrophen Targets Nptx2 und PTGDS betreffend (siehe Transkriptom Analyse 4.5), war Nptx2 nicht Genotyp spezifisch reguliert, konnte aber bei beiden Genotypen innerhalb der OPC um das 5 fache ( $\log_2$  von 2,2) in OPC angereichert werden. PTGDS zeigte wie GFAP, ein reduziertes Niveau der mRNA in den NG2 -/- OPC und einen umgekehrten Effekt zwischen den restlichen Zellen beider Genotypen, was Hinweis auf einen kompensatorischen Effekt sein kann, dabei sind beide Effekte etwa gleich groß (delta OPC - 3,9, delta Other 4,9 ( $\log_2$ )). Welches den größten ermittelten Unterschied bei den untersuchten Zielen, nach NG2, darstellt.

Um den möglichen Effekt von NG2 auf die PTGDS Expression weiter zu validieren, wurde mittels siRNA gegen NG2 ein *knock-down* des Proteins in Oli-neu durchgeführt (Abbildung 4.3-4). Die festgestellten Änderungen waren dort nicht so stark wie in den FACS sortierten *ex vivo* Zellen, aber es konnte durch den *knock-down* von NG2 die Protein Menge von PTGDS reduziert werden, weiterhin waren auch das APP FL sowie die mature Form von ADAM10 geändert.

### 4.3.3 Expression relevanter Ziele in kultivierten MACS sortierten primären OPC

Um die Expression der beiden Gene Nptx2 und PTGDS auf Proteinebene innerhalb einer differenzierenden OPC Primärkultur zu untersuchen, wurden MACS sortierte OPC (NG2 Sort /positiver Sort/MACS+) in Kultur genommen und zu unterschiedlichen Zeitpunkten post nukleäre (PN) Zelllysate mittels WB analysiert (Abbildung 4.3-5). Der früheste Zeitpunkt war 2h nach dem Sort (DIV0), darüber hinaus wurde nach 1, 2 und 4 Tagen (DIV1, 2 und 4) Lysate vom gleichen Sort erstellt. Die restlichen Zellen (negative Sort/MACS -) wurden ebenfalls unter gleichen Bedingungen kultiviert jedoch nur zum min bzw. max. Zeitpunkt analysiert (DIV0 und 4). Desweiteren wurden ein nicht neuronales Zell-Lysate von HEK Zellen bzw. ein Lysat von primären kortikalen Neuronen nach 5 tägiger Kultur (DIV5) als mögliche positiv bzw. negativ Kontrolle mit in die Analyse aufgenommen.

Das erste Augenmerk richtete sich auf die Expression von Zelltypmarkern, um die Reinheit der pOPC Kultur zu ermitteln. Da pOPC nicht vollständig davon abgehalten werden können zu reifen Oligodendrozyten zu differenzieren waren zunächst der OPC spezifische Markerprotein NG2 sowie das mit dem Myelinbildungsprozess exprimierte Myelinprotein PLP von Interesse. NG2 zeigte eine maximale Expression an DIV1 und viel danach stetig bis unter das Niveau von DIV0 ab. PLP war zu den ersten beiden Zeitpunkten im OPC Sort gar nicht nachweisbar und zeigte danach einen rasanten Anstieg, bei den restlichen Zellen war bereits an DIV0 ein Signal vorhanden. Dies entspricht dem erwarteten Verlauf, wenn man davon ausgeht, dass zunächst reine pOPC positiv sortiert und kultiviert wurden, welche im Laufe der Kultivierung dann zu differenzieren beginnen.

Um neuronale Kontaminationen auszuschließen wurden einige neuronale Marker angesehen (NF200,  $\gamma$ -Enolase, PSD-95) allerdings war von diesen nur PSD-95 in allen analysierten Lysaten nachweisbar und somit für die statistische Auswertung verfügbar. Generell enthält die verwendete Einzelzellsuspension (A, *other cells*), kaum noch Neurone, da diese die Homogenisierung am schlechtesten überleben. Dies ist auch an den geringen Mengen von PSD-95 erkennbar, sowie der teilweise kompletten Abwesenheit anderer neuronaler Marker in den beiden Sort Fraktionen. Die geringen Mengen von PSD-95 in den pOPC, zeigten keine Änderungen während des analysierten Zeitraums, weshalb man von einer sehr geringen bis gar keinen neuronalen Zell- Kontamination ausgehen kann. Im Vergleich dazu steigt bei den restlichen Zellen die PSD-95 Mengen von DIV0 zu DIV4 stark an, dies deutet auf eine neuronale Differenzierung hin. Der Astrozyten-marker GFAP war zum Zeitpunkt DIV0 sowohl in den restlichen als auch bei den pOPC nachweisbar, im letzteren allerdings wesentlich geringer. Bei den OPC blieb dieses zu den ersten beiden Zeitpunkten gleich und nahm dann zu. Dies kann zum einen an eine Erhöhung der GFAP Expression innerhalb von einer leichten Kontamination von Astrozyten liegen, zum anderen ist auch eine Differenzierung von OPC in Astrozyten möglich.



Nptx2 war in beiden Sort Fraktionen nachweisbar und darüber hinaus in den primären neuronalen Lysaten, nicht aber in HEK. Innerhalb der pOPC zeigte sich eine Zunahme der Expression bis DIV2 und danach ein Abfall des Signals auf das Ausgangsniveau. PTGDS war weder in Neuronen noch in HEK Lysaten nachweisbar, jedoch im gesamten Sort. Die zeitliche Expression in pOPC zeigte einen starken Anstieg von DIV0 nach DIV1, gefolgt von einem starken Abfall auf eine nicht mehr nachweisbares Niveau an DIV2. An DIV4 lag das Niveau wieder auf dem Ausgangswert.

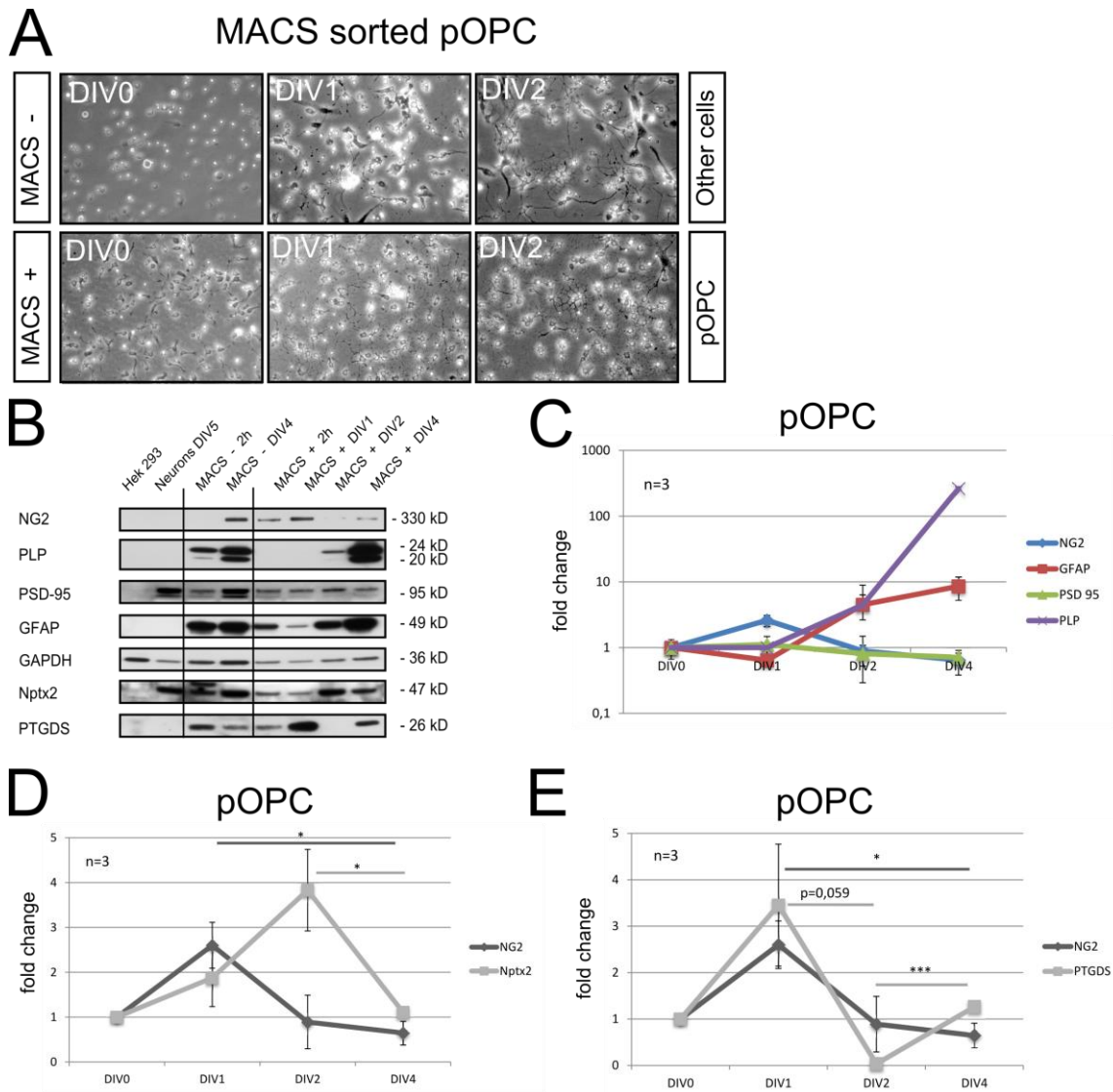


Abbildung 4.3-5 pOPC exprimieren PTGDS und Nptx2.

Proteinmengen in MACS sortierten pOPC wurden zu verschiedenen Zeitpunkten analysiert (DIV0=2h, DIV1=24h, DIV2=48h, DIV4=96h nach dem Ausplattieren). Dabei handelt es sich bei den MACS+ Zellen um die per NG2 AK sortierten OPC, bei den MACS- um die nicht markierten restlichen Zellen (negativ markierten Zellen). A zeigt dabei einige DIC Bilder der ersten drei Zeitpunkte von beiden Sorten. In B sind die Proteinlevel in Form eines WB für verschiedene Proteine gezeigt, neben den beiden Sorten, sind Lysate von Hek Zellen und primären Kortalen Neuronen nach 5 Tagen in Kultur (DIV5) untersucht. Für die grafische Darstellung (C-E nur pOPC) wurden die Proteinmengen ins relative Verhältnis zu DIV0 gesetzt (Wert von 1). C zeigt den Verlauf von untersuchten Zelltypmarkern, um die Reinheit der Kultur zu überprüfen. In D ist der Verlauf von NG2 und Nptx2 gezeigt, NG2 zeigt die höchste Menge an DIV1 und geht dann bis unter das Ausgangsniveau herunter. Nptx2 zeigt an Div2 die größte Proteinmenge und ist dann an DIV4 wieder auf Ausgangsniveau. Hek Zellen zeigen keine Expression von Nptx2, die DIV5 Neurone ein vergleichbares Niveau zu den höchsten Mengen des Pos und Neg Sorts (B). In E ist die PTGDS Expression ebenfalls in direktem Vergleich mit NG2 abgebildet. PTGDS zeigt die höchste Menge ebenfalls wie NG2 an DIV1 wird dann massiv auf eine nicht nachweisbares Niveau runterreguliert (DIV2) und lässt sich an DIV4 wieder auf Ausgangsniveau nachweisen. PTGDS ist nur in den Pos und Neg Sorts nachweisbar, nicht aber in Hek und Neuronen (B).

#### 4.3.4 Verhaltensversuche der NG2 $-/-$ Maus

Über den physiologischen Einfluss von PTGDS (bzw. PGD2) gibt es zahlreiche bekannte Studien (siehe Diskussion). Hier sind zwei Verhaltenstest der NG2  $-/-$  Mauslinie gezeigt, die in mit diesen in Zusammenhang gebracht werden können, unter Berücksichtigung einer geänderten PTGDS Physiologie im NG2  $-/-$  wie zuvor beschrieben. Die Versuche sind von Nadine Kaiser (Doktorarbeit, AG Lutz) durchgeführt worden. Im sogenannten *Forced Swim Test* (FST) (Abbildung 4.3-6 A) handelt es sich um einen Verhaltenstest, welcher für die Ermittlung depressiven Verhaltens begründet durch seinen Genotypes oder die Applikation einer Droge herangezogen wird. Die *floating time*, gibt dabei die Zeit an, welche die Maus ohne aktive Schwimmbewegung in einer offenen Wasserumgebung ohne Rastmöglichkeit verbringt, hierbei zeigte sich eine geringere *floating time* im NG2  $-/-$ , was auf ein aktiveres weniger depressives Verhalten hindeutet. Beim sogenannten Light-Dark Test (B), der unter Rückschlüsse auf ängstliches Verhalten eines Genotyp/Droge gibt, zeigte sich beim NG  $-/-$  Genotyp ein weniger ängstliches Verhalten. Zu erkennen an der Aufenthaltsdauer in einem offenen hellen Kompartiment (*lit compartment*) gegenüber der Ausweichmöglichkeit einer geschlossenen verdunkelten Box.

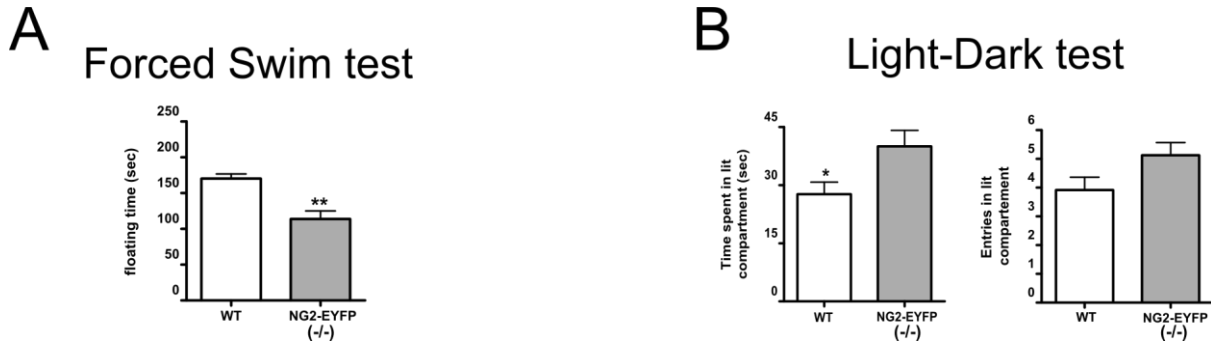


Abbildung 4.3-6 Verhaltensunterschiede in der NG2  $-/-$  Maus.

Die gezeigten Versuche sind von Nadine Kaiser (Doktorarbeit, AG Lutz) durchgeführt worden. Die hier gezeigten Versuche zeigen einen Phänotypen auf, der zu beschriebenen Verhaltensbeeinflussungen durch PGD2 (PTGDS, siehe Diskussion) passen. So ist der Forced Swim test (FST) A ein Verhaltenstest, welcher für die Ermittlung depressiven Verhaltens herangezogen wird. Die *floating time*, gibt dabei die Zeit an, welche die Maus ohne aktive Schwimmbewegung in einer offenen Wasserumgebung verbringt, hierbei zeigte sich ein aktiveres Verhalten des NG2  $-/-$  Genotyps (geringere *floating time*). Beim Light-Dark Test (LD) B, zeigte sich beim NG  $-/-$  Genotyp ein weniger ängstliches Verhalten, welches die Aufenthaltsdauer in einem offenen hellen Kompartiment gegenüber einem geschlossenen verdunkelten angibt. (FST: n=27/ NG2  $-/-$  and 15/WT, male animals, 5 or 13 months old; LD: n=24/ NG2  $-/-$  and 24/WT, male animals, 4 or 8 months old)

## 4.4 Funktionen der NG2 Ektodomäne

### 4.4.1 Einfluss von neuronaler Aktivität auf die NG2 Spaltung/Expression

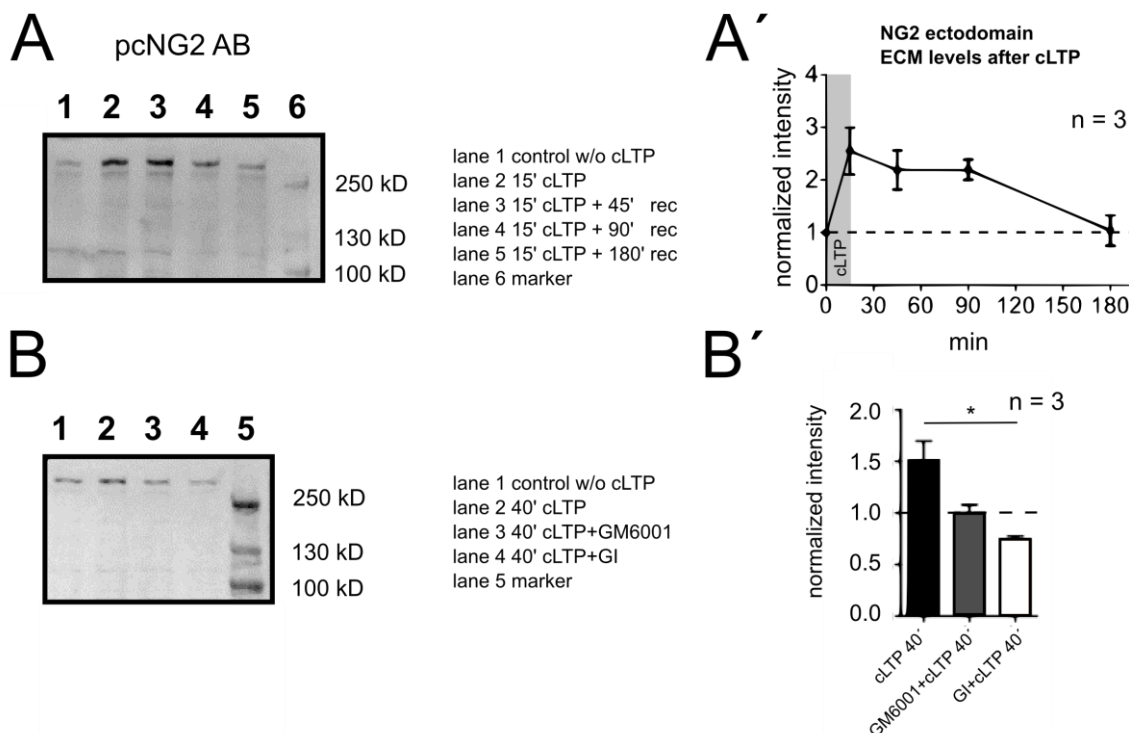


Abbildung 4.4-1 cLTP induzierte proteolytische Spaltung von NG2.

In mittels chemische induzierter LTP (cLTP/PFR Stimulation) behandelten hippocampalen Schnittkulturen aus 10 Wochen alten Ratten, zeigte sich eine kurzfristige Erhöhung der NG2 Ektodomäne in ECM Extrakten (A). Die Erhöhung war direkt nach der 15 min cLTP (15'PFR) Induktion am höchsten (2,5-fach) und sank dann, während der maximalen Erholungsphase von 180 min auf das Ausgangsniveau herab (A & B). B Eine 40 min cLTP Stimulation erhöhte die NG2 Ektodomänen Menge auf das 1,5-Fache gegenüber der Kontrolle ohne cLTP. In der Präsenz des Metalloprotease Inhibitors GM6001 zeigte sich trotz induziertem cLTP kein Effekt, die NG2 Ektodomänen Menge lag auf dem Niveau der Kontrolle. Der spezifische ADAM10 Inhibitor GI (Abbildung 4.1-2&Abbildung 4.1-4) erniedrigte die Menge der Ektodomäne noch unter die der Kontrolle (~0,7-Fache), dies deutet neben der Hemmung der cLTP induzierten Spaltung noch auf eine teilweise Hemmung der konstitutiv vorhandenen ADAM10 Spaltung hin. (Kollaboration mit Jeet Singh und Dr. R. Frischknecht (IfN, Magdeburg))(n=3, n=ein unabhängiges Experiment, WB Signale wurden gegen das Gesamtprotein aus einem Coomassie-Gel normalisiert)

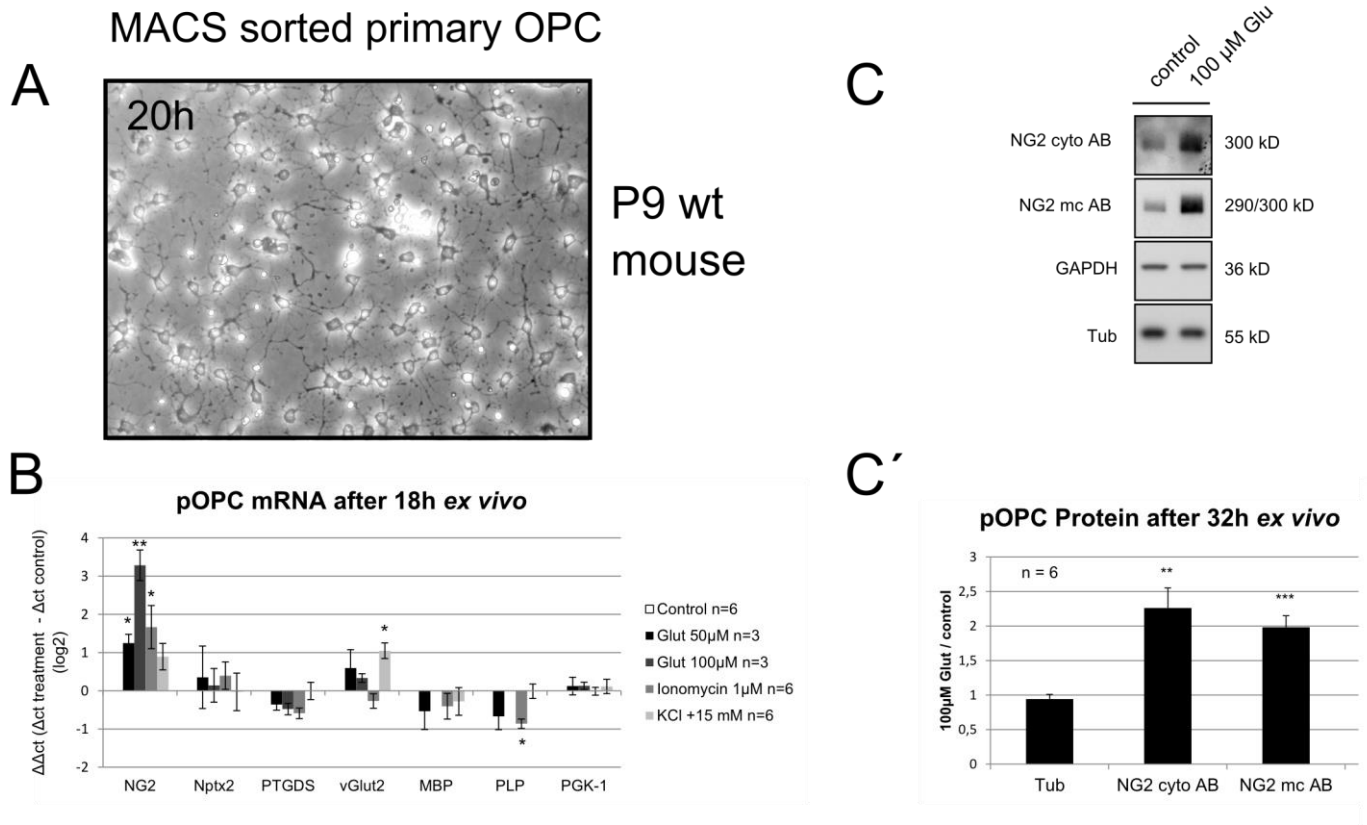
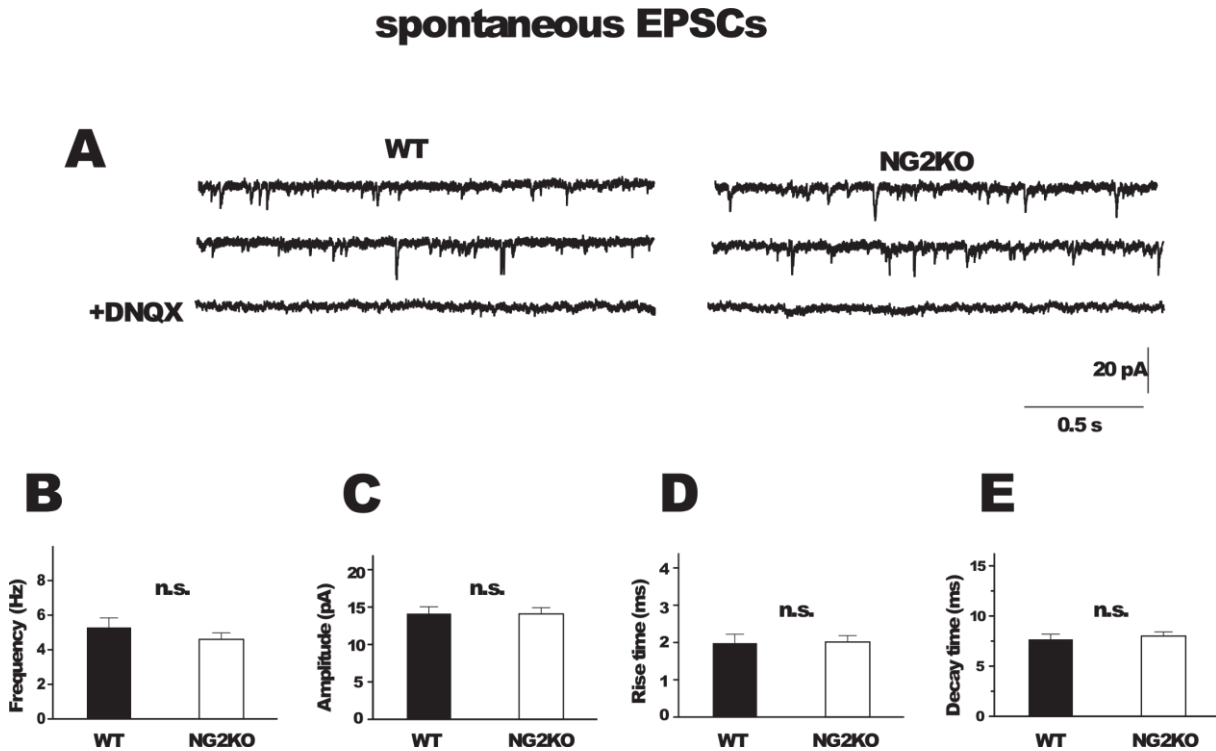


Abbildung 4.4-2 Aktivitätsabhängige Expression von NG2.

In mittels MACS sortierten primären OPC (pOPC) aus P9 WT Gesamthirnen (A nach 20h in Kultur), wurden verschiedene Bedingungen angewendet, die neuronale Aktivität simulieren. B die mRNA Level wurden mittels qRT-PCR zwischen den Bedingungen 12h nach der Behandlung (insgesamt 18h *in vitro*) verglichen. Zwei Glutamat (Glut) Konzentrationen simulieren die neuronale Ausschüttung des Neurotransmitters, Ionomycin bildet Ca<sup>2+</sup> permeable Poren in der Zellmembran und führt so zu einem Ca<sup>2+</sup> Einstrom, KCl depolarisiert die Zellmembran und simuliert so elektrische Aktivität. Für die Auswertung wurde die Kontrolle im Verhältnis auf Null gesetzt ( $\Delta\Delta ct$ ). Dabei findet sich die größte Regulation bei der NG2 mRNA, diese ist unter allen Bedingungen hochreguliert. Die anderen mRNAs zeigen keine signifikante Regulation, außer PLP eine leichte Reduktion bei der Ionomycin Behandlung und vGlut2 einen leichten Anstieg bei der KCl Behandlung. Auf Proteinebene C und C' war das NG2 FL-Protein ebenfalls nach 24h Glutamat Behandlung (insgesamt 32h *in vitro*) um mehr als das doppelte erhöht. (n=6, n=ein unabhängiges Experiment)

In hippocampalen Schnittkulturen von 10 Wochen alten Ratten, konnte eine unmittelbare aktivitätsabhängige Spaltung von NG2 beobachtet werden (Abbildung 4.4-1). Die zur Grunde liegenden Versuche wurden in Kollaboration mit Jeet Singh und Dr. R. Frischknecht (IfN, Magdeburg) durchgeführt. Dabei wurde erhöhte neuronale Aktivität mittels chemisch induziertem LTP (cLTP/ durch PFR Stimulation) simuliert, welche zu einem Anstieg der cAMP Menge führt (Levenson et al., 2004). Die in aCSF frisch angelegten Schnittkulturen wurden dabei für 15/40 min mit PFR stimuliert und die Proteinmenge innerhalb der ECM zu verschiedenen Zeitpunkten/Bedingungen nach/während der Stimulation ermittelt. Da es sich bei der Analyse um detergenten-freie durch Chondroitinase ABC Verdau gewonnene ECM Extrakte handelt, konnten diese für eine direkte Quantifizierung der NG2 Ektodomäne herangezogen werden. Es zeigte sich, dass die Ektodomäne bereits unmittelbar nach der 15min PFR Stimulation um das 2,5-Fache erhöht war, die erhöhte Menge nahm dann langsam ab bis es sich nach 180 min wieder auf Ausgangsniveau befand. Bei etwas längerer cLTP Stimulation von 40min war eine Erhöhung der Ektodomäne um das 1,5-Fache feststellbar. War die Metalloproteaseaktivität durch GM6001 gehemmt, zeigte sich keine Spaltung trotz induziertem cLTP, da die Ektodomänen Mengen auf Kontroll-Niveau blieben. Durch spezifische Hemmung von ADAM 10 durch GI, war die Ektodomän-Menge noch unter der Kontroll-Menge detektierbar (0,7-Fache). Wodurch die cLTP induzierte Spaltung von NG2 auf ADAM10 zurückzuführen ist, wobei zusätzlich noch von einer zumindest teilweisen Hemmung der konstitutiven ADAM10 Aktivität ausgegangen werden kann.

Um einen möglichen Einfluss von neuronaler Aktivität auf die generelle Expression von NG2 in OPC zu untersuchen, wurden folgenden Experiment durchgeführt. Dazu wurden primäre OPC (pOPC) die mittels MACS Verfahren direkt aus dem murinem P9 Gesamthirn isoliert und in der Präsenz verschiedener Substanzen kultiviert. Zum einen wurden verschiedene Konzentrationen des Neurotransmitters Glutamat (50 u. 100  $\mu$ M) appliziert des weiteren kam Ionomycin, welches die äußere Zellmembran  $Ca^{2+}$  permeabel macht und KCl zum Einsatz, welches in dieser hohen Konzentration eine generelle Depolarisierung des Membranpotentials hervorruft. Unter diesen Bedingungen konnte mittels qRT-PCR gezeigt werden, dass die NG2 mRNA als einzige von allen untersuchten mRNAs unter jeder Bedingung gegenüber der Kontrolle (unbehandelte Zellen) hochreguliert war (Abbildung 4.4-2 B). Ein weitere Reihe von Experimenten mit Glutamat behandelten pOPC konnte auch eine Hochregulation des NG2 Proteins zeigen (C&C`), wobei die Glutamat Behandlung keine größere Auswirkung auf die Zellzahl hatte, welches auch an den GAPDH und Tub Mengen im abgebildeten WB erkennbar ist, für diesen wurde gleiche Volumina des Zelllysates geladen.

4.4.2 Neuronale Aktivität im Cortex von NG2  $-/-$  MäusenAbbildung 4.4-3 Spontane Aktivität von Pyramidal Zellen in NG2  $-/-$  Mäusen zeigt keine Unterschiede.

Die von Dr. Neitz (AG Mittmann) durchgeführten Ganz-Zell Messungen (Patch-Clamp) an Pyramidal Zellen des Layers 2/3 im somatosensorischen Kortex, zeigen keinen Unterschied bei ihrer spontanen Aktivität (sEPSC) in P21 alten Mäusen bei einem Vergleich zwischen WT und NG2  $-/-$  Tieren.

Ausgehend von der Hypothese, dass OPC neuromodulatorische Substanzen wie Nptx2 oder PTGDS (PGD2) exprimieren und freisetzen, war die Frage ob in NG2  $-/-$  Mäusen ein genereller Effekt auf das Neuronale Netzwerk besteht. Um die neuronale Aktivität im KO zu untersuchen, wurde eine Kollaboration mit Dr. Angela Neitz und Prof. Mittmann (Universitätsmedizin Mainz) begonnen. Alle in diesem Kapitel gezeigten Elektrophysiologie Daten sind von Dr. Angela Neitz erzeugt und ausgewertet worden. Ursprung der Untersuchungen waren stets Einzelzellableitungen von pyramidalen Neuronen des Somatosensorischen Kortex (Layer 2/3) von P21 Mäusen. Abbildung 4.4-3 zeigt die spontane Aktivität dieser Neurone im NG2  $-/-$  und WT. Bei den spontanen *excitatoric post synaptic currents* (sEPSCs), zeigten sich keine Unterschied zwischen den Genotypen.

## Kinetics of evoked EPSCs

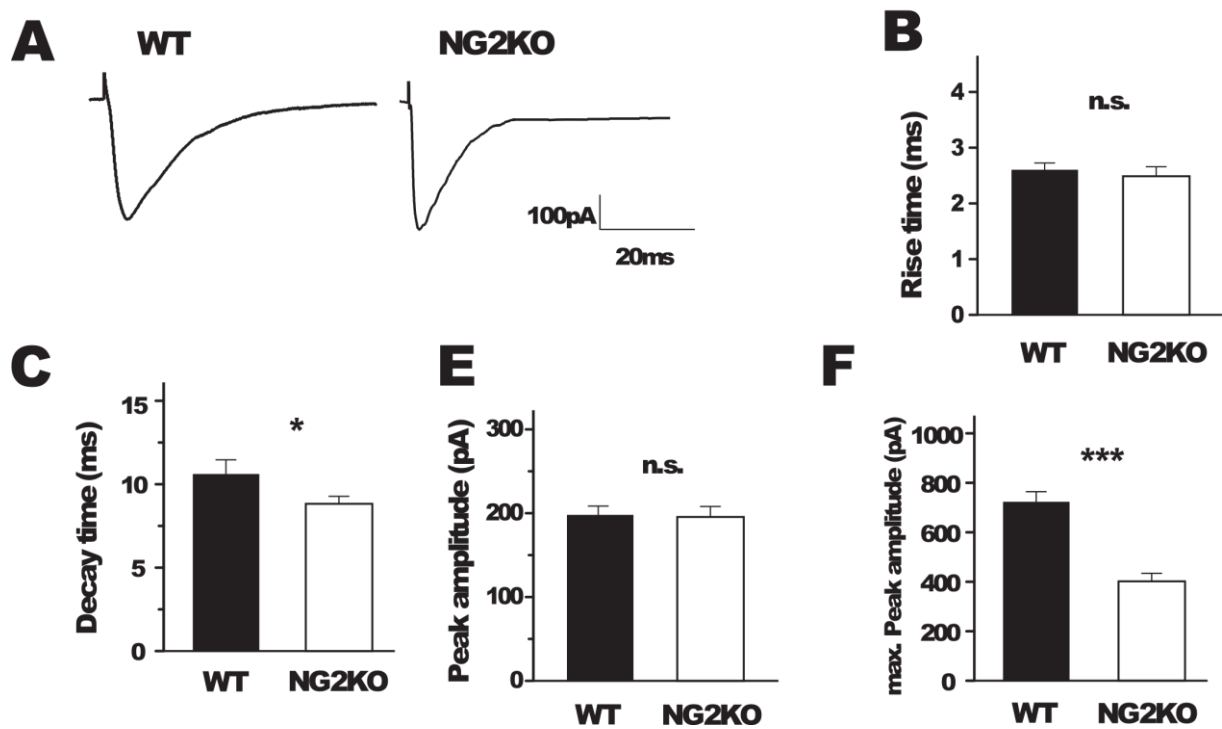


Abbildung 4.4-4 Induzierte Aktivität von Pyramidal Zellen zeigt in NG2<sup>-/-</sup> Mäusen.

Bei induzierter Aktivität (eEPSC) in P21 alten Mäusen bei einem Vergleich zwischen WT und NG2<sup>-/-</sup> Tieren. Dabei wurden eEPSCs an Pyramidalzellen im somatosensorischen Cortex Layer 2/3 gemessen (wie bei sEPSCs Abbildung 4.4-3) und innervierende Neurone aus Layer 4 einzeln gereizt. Dabei zeigte sich eine leichte Reduktion der Decay time bei der Repolarisation der Reizantwort in den NG2<sup>-/-</sup> Tieren. Eine deutliche Reduktion war bei der max. Amplitude der Reizantwort auf eine supramaximalen Reiz erkennbar. Dies lässt auf einen geänderten Ionenfluß und somit geänderte Glutamatrezeptor Konfiguration im NG2<sup>-/-</sup> schließen.



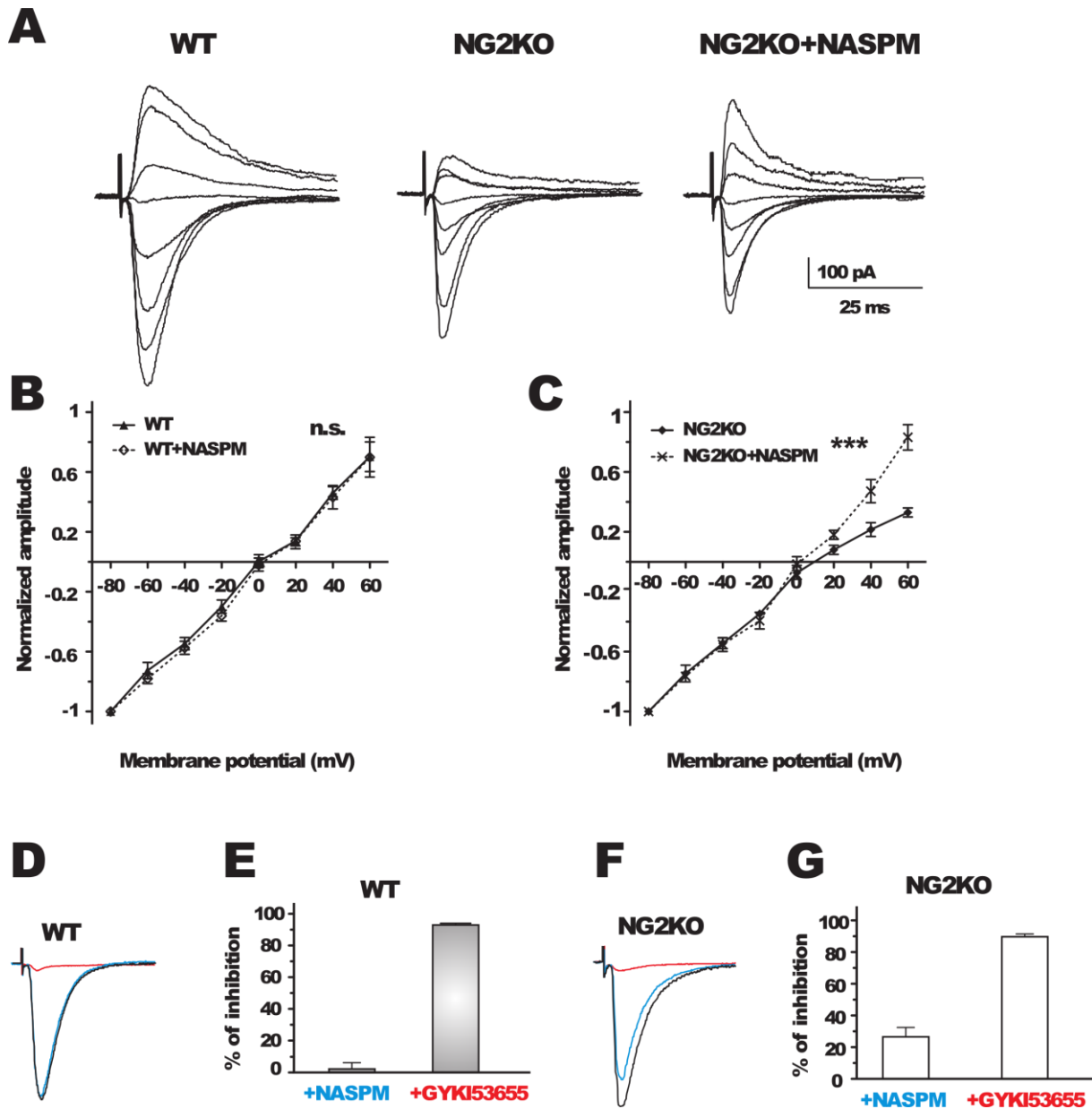


Abbildung 4.4-5 Pyramidal Zellen im NG2  $-/-$  zeigen geänderte Strom Spannungskurven.

Die gezeigten Stromspannungskurven wurden (I/V curves) wurden an bereits erwähnten kortikalen pyramidal Zellen Layer 2/3 einer Ganz-Zell Ableitung gemessen. Dies geschah in der Präsenz von NMDA und GABA Rezeptor Blockern um mögliche Effekte durch die Ionotrope Glutamatrezeptoren AMPAR und Kainat-R zu untersuchen. Der WT zeigte ein lineares Verhältnis zwischen Amplitude und angelegtem Membranpotential (A&B), wie es typisch für GluR2 Untereinheiten (UE) enthaltende AMPAR ist. Im NG2  $-/-$  hingegen ergab sich eine verminderte Amplitude bei positiven Membranpotentialen (A&C), wie es typisch für AMPAR ohne GluR2 UE ist. Durch das Polyamine NASPM, dass an AMPAR ohne GluR2 UE spezifisch hemmt, konnte zudem im NG2  $-/-$  der WT Phänotyp wiederhergestellt werden, im WT hatte die Applikation keinen Effekt auf die I/V Kurve. Die Applikation des gesamt AMPAR Blockers GYKI53655 inhibierte die komplette zelluläre Antwort in beiden Genotypen, weshalb ein Effekt über den Kainate R ausgeschlossen werden kann.

Bei den induzierten „evoked EPSCs“ (eEPSCs), wurde an den gleichen pyramidalen Neuronen eine Einzelzelleableitung gemessen wie bei den sEPSCs, zusätzlich wurde ein Neuron im Layer 4 Überschwellig gereizt, da die Layer 4 Neurone die pyramidalen Neurone von Layer 2&3 glutamaterg innervieren, konnte die Reaktion auf den gegebenen Reiz gezielt untersucht werden und so Rückschlüsse auf die glutamaterg synaptische Übertragung zwischen den beiden Neuronen Typen gezogen werden. Bei diesen Versuchen, zeigte sich eine leichte Reduktion der Decay time in den NG2  $-/-$  Tieren, bei nicht maximaler Reizung. Bei maximaler (supramaximaler) Reizung zeigte sich ein deutlicher Unterschied bei der Amplitude in den pyramidalen Zellen (Abbildung 4.4-4). So war die max. Peak Amplitude in den NG2  $-/-$  Tieren um mehr als ein Drittel reduziert, welches für einen geänderten Ionenfluss durch die beteiligten Ionenkanäle schließen lässt. Da die Messungen in der Präsenz von GABA<sub>A</sub> und NMDA Rezeptor Blockern durchgeführt wurden, und die Übertragung zwischen den untersuchten Neuronen glutamaterg stattfindet, wurde ein AMPAR abhängiger Effekt vermutet und weiter untersucht.

Weiterhin zeigten sich bei von ganzen pyramidalen Zellen gemessenen Strom Spannungskurven (I/V curve), Unterschiede im Stromfluss bei positiven Membranpotentialen, diese waren im NG2  $-/-$  stark reduziert, der WT zeigte hingegen einen erwartungsgemäßen linearen Verlauf der I/V Kurve (Abbildung 4.4-5 B&C) (Kamboj et al., 1995; Pellegrini-Giampietro, 2003). Durch die Zugabe eines Spermins (NASPM), das spezifisch alle AMPAR ohne GluR2 Untereinheiten (UE) blockiert, konnte im NG2  $-/-$  der WT Phänotyp hergestellt werden, im WT selber hatte die Zugabe von NASPM keinen Effekt auf den Verlauf der I/V-Kurve. Somit kann von einer geänderten Zusammensetzung eines Teils der sich an der Zelloberfläche befindlichen AMPAR im NG2  $-/-$  gegenüber des WT ausgegangen werden. Im NG2  $-/-$  scheint es einen signifikant höheren Anteil an AMPA Rezeptoren ohne GluR2 an der Oberfläche zu geben. Wie erwähnt waren GABA und NMDA Rezeptoren bei diesen Versuchen blockiert, um einen Effekt über den Kainate Rezeptor auszuschließen, wurde mittels einer zusätzlichen vollständigen Hemmung des AMPAR mittels GYKI53655 ermittelt, ob der Effekt noch messbar war. Diese Hemmung führte zu einer komplett gehemmten Ionenfluß über die Membran, dies legt eine 100% Kontribution des AMPAR zu diesem Effekt dar (D-G).

Um die Proteinmengen zum gleichen Zeitpunkt (P21) zu untersuchen, wurde das gleiche Korticale Areal des somatosensorischen Kortex von WT und NG2  $-/-$  Tieren präpariert und in einer salinen Lösung homogenisiert, diese wurde von den Zellkernen befreit und anschließend mittels Ultrazentrifugation in 100.000 g Pellet und Überstand separiert und analysiert (Abbildung 4.4-6). Im 100.000g Pellet zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Genotypen bis auf die Proteinmenge der GluR1 UE des AMPAR, GluR 2 u 3 waren unverändert. Bei den neurotrophischen Substanzen, war Nptx2 unverändert, PTGDS war im Pellet unter/an der Nachweisgrenze. Im Überstand war eins der beiden Haushaltsgene geändert so wie GAPDH eine leichte Änderung auf in etwa gleicher Ausprägung wie Nptx2 und PTGDS. Das neuronale Enzym  $\gamma$ -Enolase zeigte hingegen keinen Unterschied.

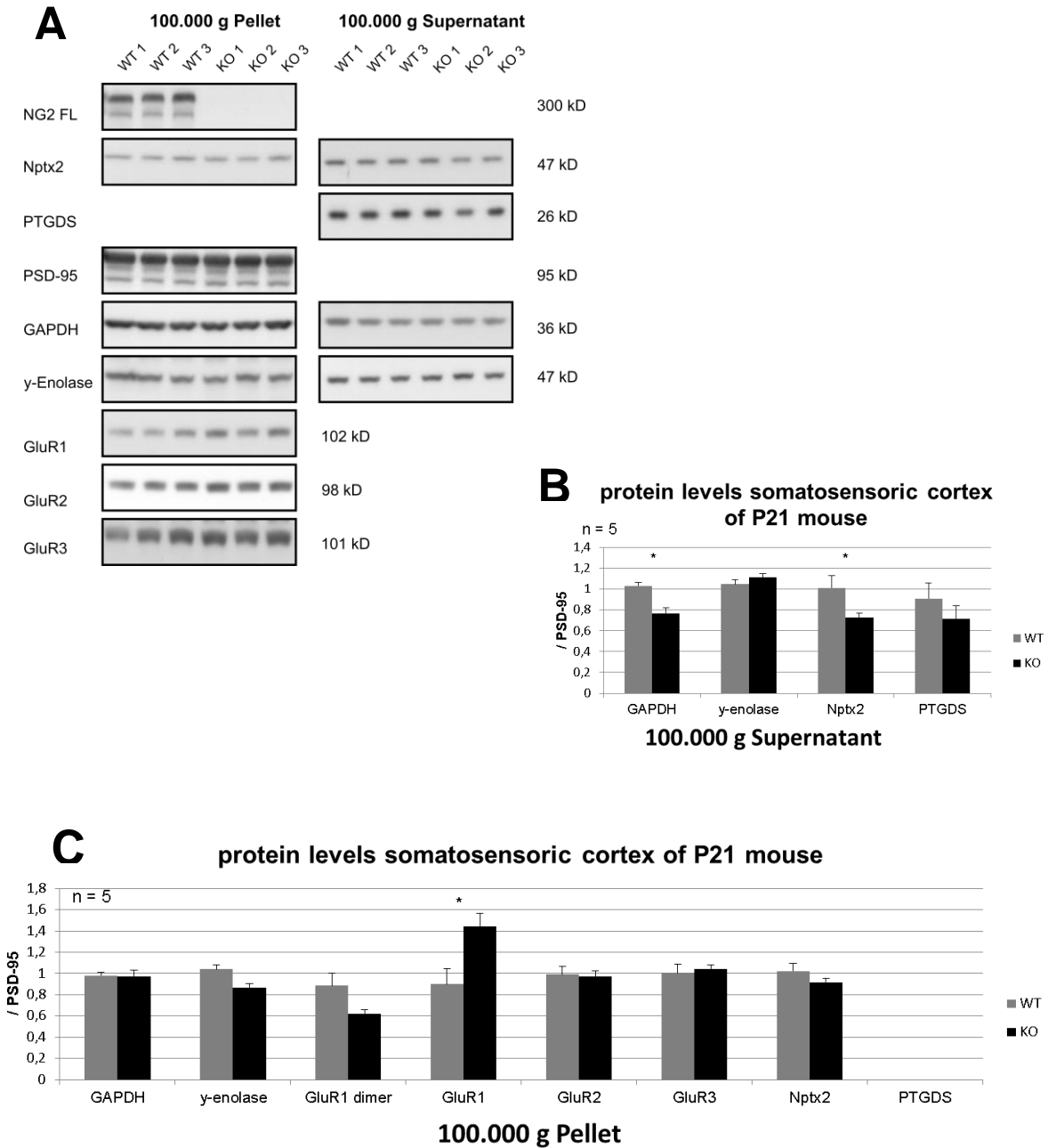


Abbildung 4.4-6 Unterschiede in den Protein Level im somatosensorischen Kortex in NG2 <sup>-/-</sup> Mäusen.

Es wurden saline kernfreie Gewebsextrakte von P21 Mäusen der beiden Genotypen nach Ultrazentrifugation untersucht. Dabei war im 100.000g Pellet lediglich ein Unterschied bei den GluR1 UE des AMPA Rezeptors erkennbar, diese war im NG2 <sup>-/-</sup> erhöht. Die Nptx2 Level waren ungeändert und PTGDS nicht nachweisbar (A&C). Im Überstand (A&B) waren Nptx2 und PTGDS im NG2 <sup>-/-</sup> leicht reduziert, allerdings GAPDH als Haushaltsgen auch. γ-Enolase als neuronales Haushaltsgen war ungeändert. Alle Proteine wurden gegen das PSD-95 Level aus dem Pellet normalisiert. Neben der deutlichen Änderung bei der Proteinmenge des GluR1, kann man bei den anderen untersuchten Proteinen keine größeren Änderungen erkennen. (n=5, 5 Mäuse pro Genotyp)

## 4.5 Transkriptom Analyse der NG2 $-/-$ Maus

### 4.5.1 Analyse des Transkriptoms im lädierten Kortex der NG2 $-/-$ Maus

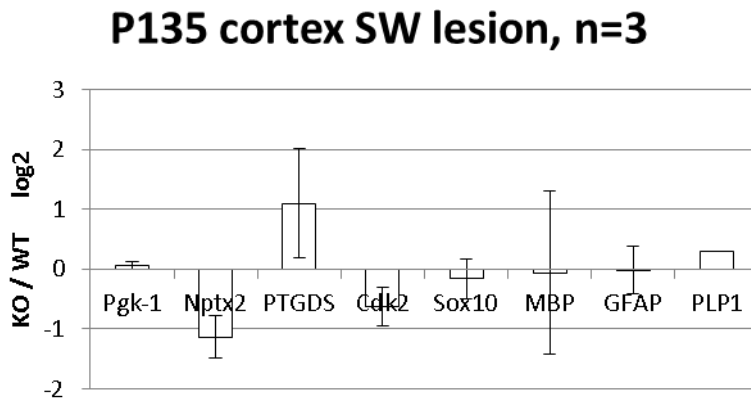


Abbildung 4.5-1 mRNA Menge im lädierten Gewebe der NG2  $-/-$  Maus.

Stab wound lesions von WT und NG2  $-/-$  Mäusen wurden als Ausgangsgewebe für die mRNA Analyse verwendet. Die mRNA wurde mittels qRT-PCR analysiert und gegen HMBSS normalisiert ( $\Delta\text{Act}$ ) und zwischen den Genotypen verglichen ( $\Delta\Delta\text{Act}$ ). Es zeigen sich zwei interessante Zielgene Nptx2 und PTGDS, wobei letzteres nicht signifikant reguliert ist. Da es sich hier um zum einen lädiertes und zum anderen Gesamtgewebe handelt, stellt sich die Frage ob die beiden Zielgene auch von OPC exprimiert sind und in wie weit es einen genotypischen Effekt auf deren Expression auch unter nicht Läsionsbedingungen gibt. (n=3, 3 Tiere pro Genotyp)

Die in Kooperation mit Dr L. Dimou (AG Götz, LMU München) durchgeführten *stab wound* (SW) Läsionen im somatosensorischen Cortex von P135 alten NG2  $-/-$  und BL6/N Mäusen, wurden u.a. für die RNA Isolierung verwendet. Die mRNA wurde von 3 WT und 3 NG2  $-/-$  Tieren, ausschließlich von lädiertem Gewebe, mittels Genechip (AG Kyewski, DKFZ Heidelberg) analysiert. Die gesamte Liste der regulierten Gene ist in dieser Arbeit nicht abgebildet.

Für erste weitergehende Experimente wurden drei Gene ausgesucht. Das am höchsten regulierte Gen CCL-21 wurde in Kooperation mit C. Huang und Prof. M. Schäfer (Unimedizin Mainz) in einem weiteren Läsionsmodell analysiert, hierbei wurden *controlled cortical impact* (CCI) Läsionen durchgeführt.

Für eigene experimentelle Ansätze wurden 2 Gene ausgewählt die im Zusammenhang mit neuromodulatorischen Funktionen stehen und bei denen eine Expression innerhalb von OPC möglich ist. Dementsprechend wurde das zu den Pentraxinen gehörende neuronale Pentraxin 2 (Narp/Nptx2) im Folgenden nur noch Nptx2 genannt ausgewählt, weil diese als modulatorischer Faktor im Sinne einer AMPAR stabilisierenden Rolle auf Neuronen bekannt ist. Als zweites Gen wurde PTGDS ausgewählt, welches das gleichnamige Enzym kodiert, dass Prostaglandin H2 in D2 umwandelt. Prostaglandin D2 wiederum ist das aktivste Prostaglandin im ZNS und besitzt ein dementsprechend großes Wirkungsspektrum.

Beide Gene Nptx2 und PTGDS waren in der Chipanalyse auf mRNA Ebene signifikant reguliert. Wobei man beachten muss, dass Gesamt-mRNA aus lädiertem Gewebe analysiert

wurde, innerhalb derer ein ausschließlich von OPC stammender Effekt relativ geringe Änderungen hervorrufen sollte, da OPC nur etwa 10% der Gesamtzellen ausmachen. Mittels qRT-PCR wurden die gleichen RNA Proben analysiert (Abbildung 4.5-1). Hierbei zeigte sich ein Regulation von Nptx2 und PTGDS, wobei nur erstere signifikant reguliert war. Um eine generelle Expression bzw. NG2 abhängige Regulation dieser beiden Targets vor allem unter nicht Läsions Bedingungen innerhalb von OPC zu untersuchen, wurden die bereits gezeigten Experimente durchgeführt.

#### 4.6 Darstellung synaptischer Interaktionen von OPC

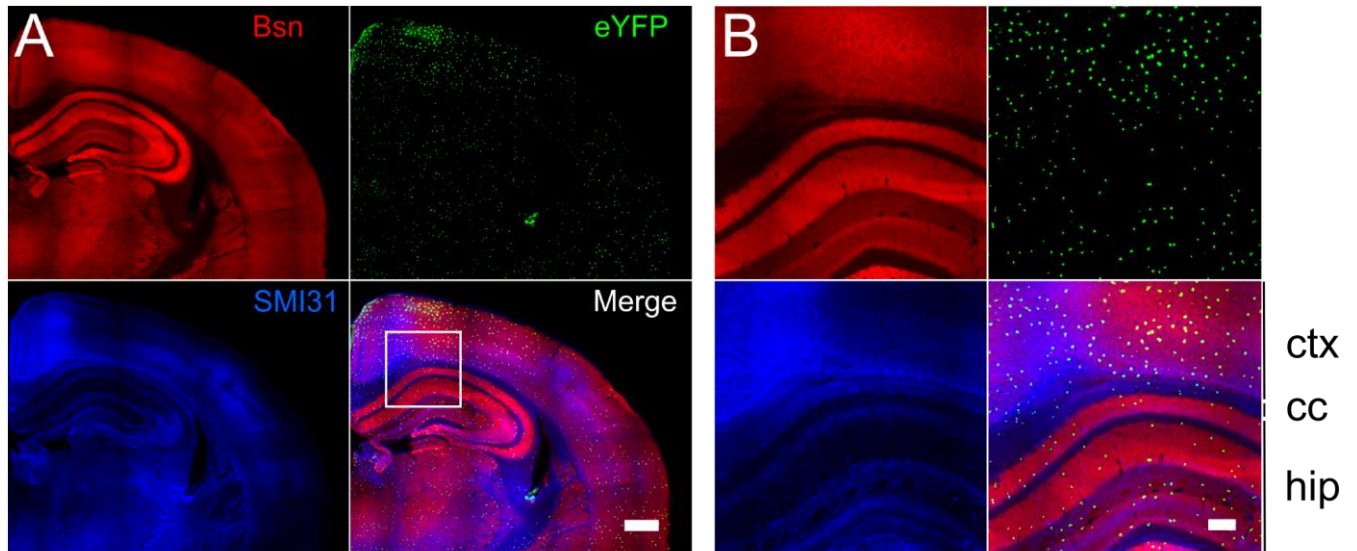


Abbildung 4.6-1 OPC sind in allen adulten Hirnarealen vorhanden.

A zeigt eine Hemisphäre eines adulten koronalen Hirnschnitts einer heterozygoten NG2 +/- Maus. Bsn (rot) färbt das präsynaptische Protein Bassoon, SMI31 (blau) axonales NF-H und eYFP in grün endogenes YFP in OPC und Merge die Überlagerung der RGB Kanäle (scale bar = 350  $\mu$ m). B zeigt den durch das Quadrat markierten Ausschnitt als Vergrößerung (scale bar= 100  $\mu$ m). Die OPC als grüne Punkte in allen angeschnittenen Arealen erkennbar, dem Cortex (ctx), dem Corpus callosum (cc) und dem Hippocampus (hip).

Um die Interaktionen von OPC mit dem neuronalen Netzwerk näher zu betrachten, wurden verschiedene Färbungen in heterozygoten NG2-EYFP +/- Mäusen durchgeführt. Welches eine Identifizierung der OPC sowohl über das zytoplasmatische EYFP, als auch über das membrangebundene NG2 Protein ermöglichte.

Abbildung 4.6-1 A zeigt eine Hemisphäre in einem koronalen murinen Hirnschnitt einer erwachsenen NG2 +/- Maus. Es sind der Präsynaptische Marker Bassoon (Bsn, rot), die OPC (eYFP, grün) und NF-H (SMI31, blau) als axonale Färbung, gezeigt. Die OPC als kleine grüne Punkte erkennbar verteilen sich gleichmäßig über das gesamte Hirnareal. In B ist eine Vergrößerung des durch das Quadrat markierten Bereiches gezeigt. Hierbei handelt es sich um den Übergangsbereich der untersten kortikalen Schichten (ctx) zum *Corpus callosum* (cc) und anschließend zum Hippocampus (hip). Der cc gehört als einziger dieser Bereiche zur weißen Substanz. Auch hier ist erkennbar, dass die OPC innerhalb aller gezeigten Bereiche eine homogen verteilte Population darstellen.

In Abbildung 4.6-2 ist die 3 dimensionale (3D) Rekonstruktion eines OPC im Cortex samt umgebendem neuronalen Netzwerks gezeigt. Diesmal aufgenommen mit einem *confocal laser*

*scanning micrope* (CLSM). Für die 3D Rekonstruktion wurde eine *volume render* Methode des ImageJ 3d Viewers verwendet. Das neuronale Netzwerk wurde hierbei in einem Kanal mit drei unterschiedlichen primären AK angefärbt. SMI31 erkennt NF-H und färbt somit Axone an MAP2 erkennt das gleichnamige Protein, das hauptsächlich innerhalb von Dendriten lokalisiert ist und NeuN ist Marker für neuronale Zellkörper. Verfolgt man die grünen Fortsätze des OPC so wird ersichtlich, dass diese das neuronale Netzwerk dicht durchziehen und somit potentiell an den meisten, wenn nicht allen Faserbündeln eine Signalübertragung aufgrund der räumlichen Nähe, möglich wäre. Anhand kurzer Unterbrechungen lässt sich eine nicht ganz durchgängige Färbung der OPC Fortsätze erkennen, da das zytoplasmatische eYFP nicht in die dünnsten Fortsätze bzw. dünnere Stellen innerhalb der Fortsätze vordringen kann. Es kann somit von einer noch größeren Fortsatzdichte ausgegangen werden.

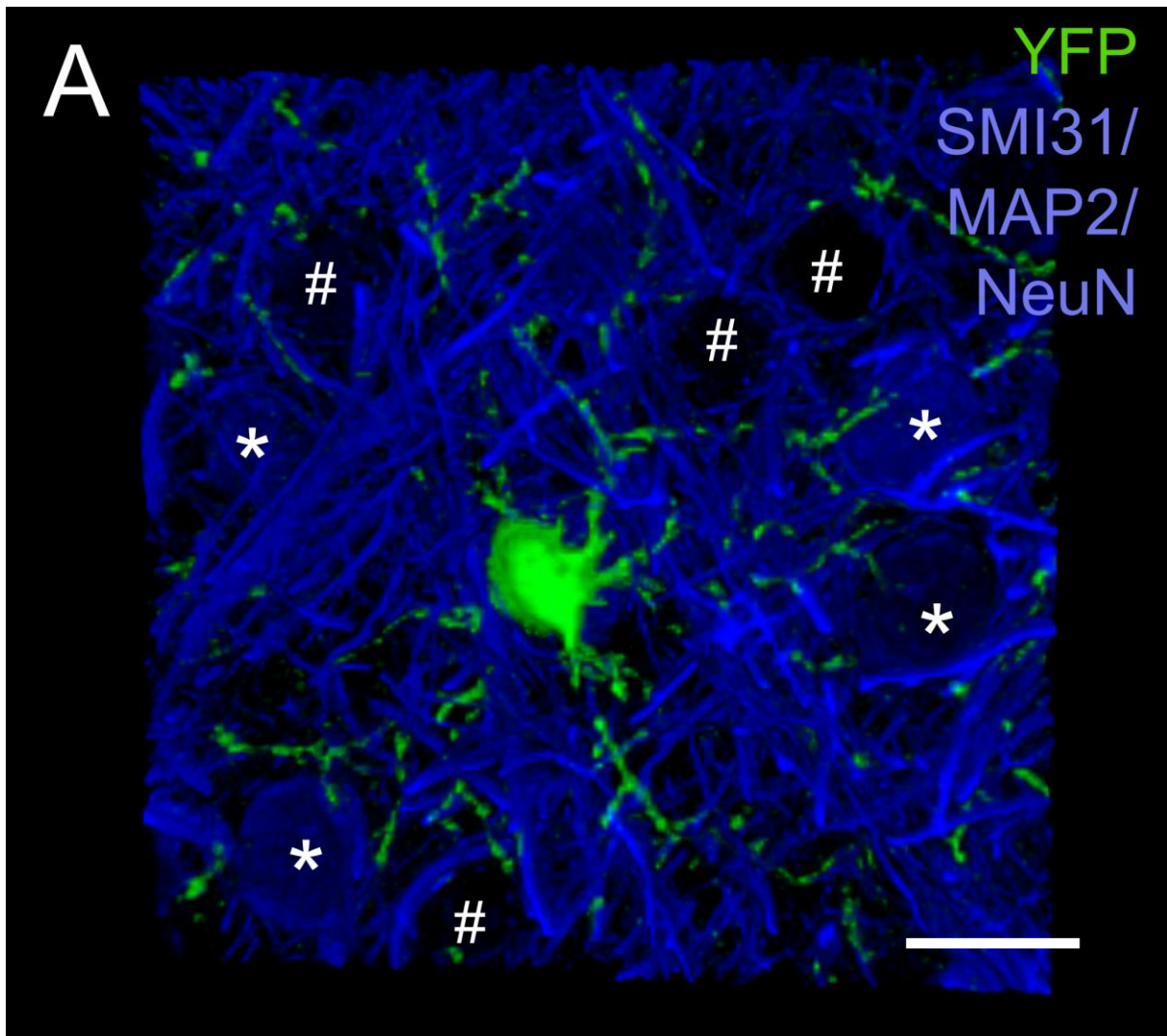


Abbildung 4.6-2 OPC durchdringt das kortikale Neuronales Netzwerk.

Zur Verdeutlichung der Fortsatzdichte eines OPC wurde diese als 3 dimensionale Rekonstruktion innerhalb des Neuronales Netzwerks rekonstruiert. Das Neuronales Netzwerk im blauen Kanal wurde dabei mit drei unterschiedlichen primären AK angefärbt, SMI31 erkennt axonales NF-H, MAP2 das hauptsächlich dendritische Protein, NeuN gibt eine Kernfärbung des DNA bindenden Protein in den meisten reifen Neuronen. Der OPC wurde mittels GFP AK gefärbt. Es zeigt sich eine hohe Fortsatzdichte die weite Teile des neuronalen Netzwerks durchdringt, welches eine Vielzahl an Interaktionen ermöglicht. Vergleichend kann hier Abbildung 4.6-1 für die OPC Dichte im Cortex herangezogen werden. (scale bar=20µm)



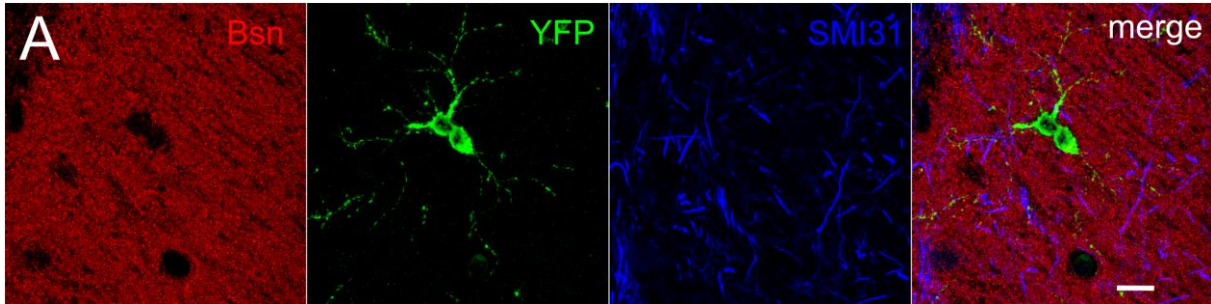


Abbildung 4.6-3 SEM Projektion offenbart mitotischen OPC im adulten Hippocampus.

Dieser CLSM Stack wurde von einer Färbung mit dem präsynaptischen Marker Bassoon (Bsn), YFP (OPC der (+/-) NG2 -/- Maus), axonalem NF-H (SMI31) erstellt. In dieser Darstellungsvariante sind klar die beiden sich trennenden Zellkörper des OPC erkennbar, sowie eine sehr hohe synaptische Dichte (Bsn Färbung). (Scale Bar=20µm)

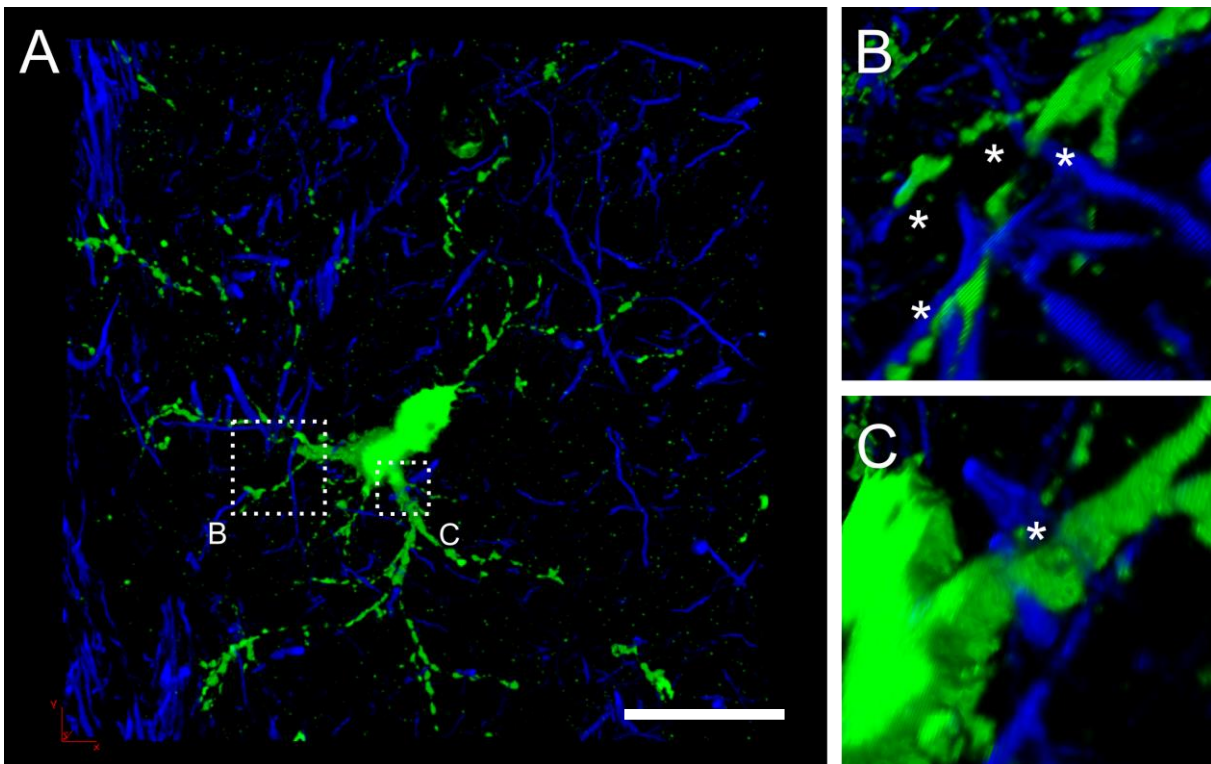


Abbildung 4.6-4 3D Volumenrender offenbart Interaktion zwischen OPC Fortsätzen und axonalem Netzwerk.

Der in Abbildung 4.6-3 gezeigte hippocampale OPC ist hier in 3d einer *volume render* Ansicht gezeigt. Dabei ist zusätzlich die axonale NF-H (SMI31) Färbung gezeigt, um die räumliche Nähe der OPC Fortsätze zu den Axonen illustrieren (A). Dabei sind in B und C Vergrößerungen der mit den Quadraten in A markierten Bereiche (Orientierung leicht geändert). Es sind in den mit den \* markierten Bereichen direkte Kontaktstellen zwischen den Fortsätzen der beiden Zell-Typen erkennbar. (Scale Bar =40µm)

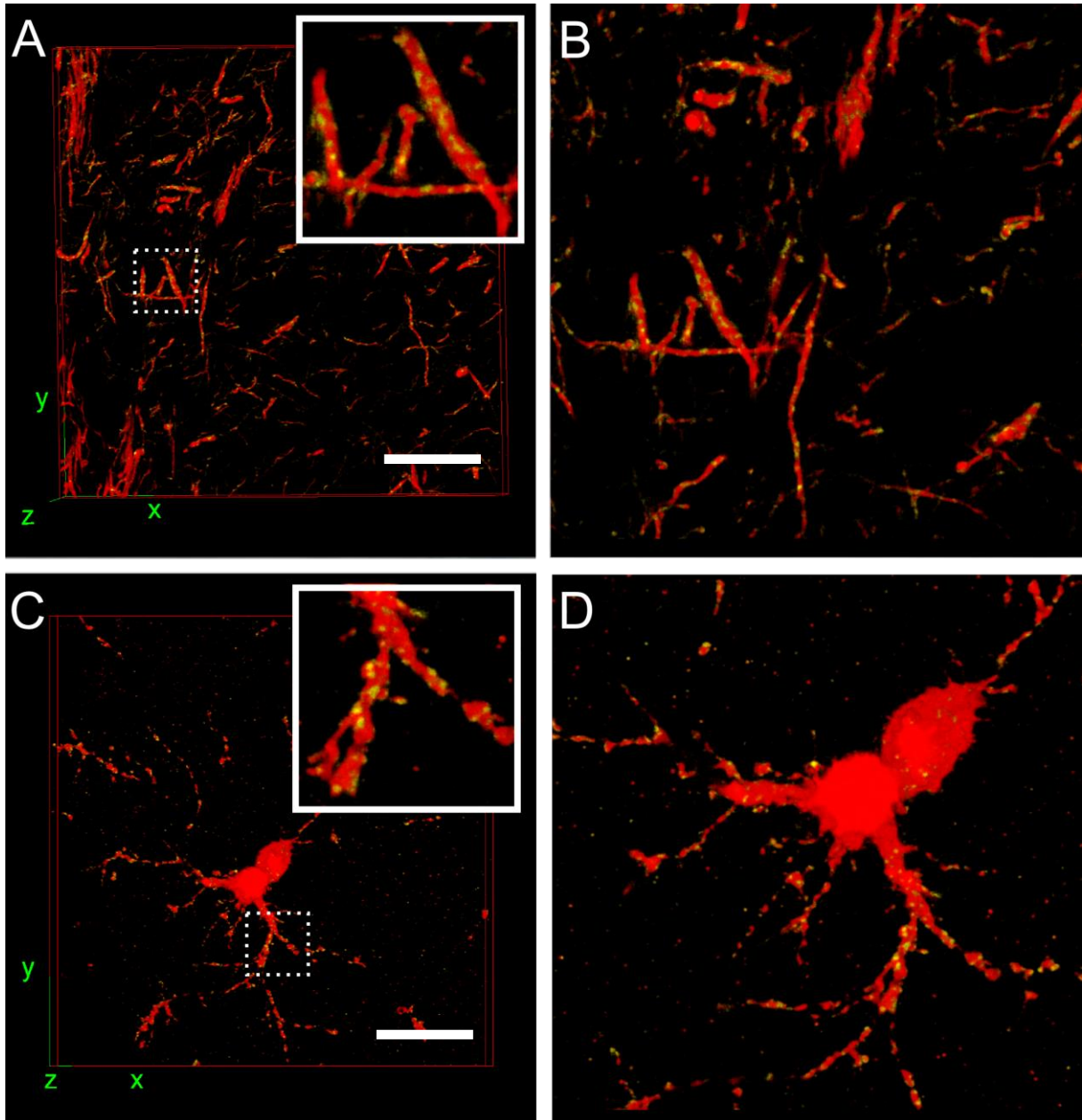


Abbildung 4.6-5 3 Korticale Axone und OPC weisen gleiche Verteilung von präsynaptischen Markern auf.

Hierbei handelt es sich um die gleiche Darstellungsweise des teilungsaktiven hippocampalen OPC sowie der Axone wie in Abbildung 4.6-4. Dabei sind diesmal die überlagernden Färbungen mit der Bassoon Färbung gezeigt und zwar in A und B überlagernden Strukturen in gelb (bzw grün) mit der axonalen Färbung in rot (SMI31). In C und D sind die überlagernden Strukturen in gleiche Weise mit dem OPC in rot (YFP) gezeigt. Die in A und C gezeigten Ausschnitte (Quadrat) sind Vergrößerungen der mit dem gepunkteten Quadrat markierten Bereiche. B und D sind dabei leicht vergrößerte Darstellungen aus A und C. Es lassen sich in beiden Fällen überlagernde Bassoon Färbungen auf den Fortsätzen erkennen, welches eine unmittelbare Nähe von Präsynaptischen Strukturen zeigt. (Scale Bar = 40µm)

Der in Abbildung 4.6-3 dargestellte hippocampale OPC befindet sich noch in der Zellteilung, erkennbar an den Zellkernen sowie der fast vollständigen Zytoplasmaeinschnürung. Es sind der präsynaptische Marker Bassoon (Bsn, rot), YFP als OPC Marker (grün) sowie SMI31 als axonale Markierung gefärbt. Der 3D *volume render* Abbildung 4.6-4 zeigt intime Interaktionen zwischen OPC Fortsätzen (grün) und Axonen (blau), welche unter B und C vergrößert dargestellt ist und durch den \* markiert.

In Abbildung 4.6-5 ist der selbe CLSM Stack wie in Abbildung 4.6-3 wiederum als 3D *volume render* dargestellt, diesmal ist jedoch pro gezeigtem Bild mit Vergrößerung (AuB und CuD) entweder die Axone in rot (AuB) oder der OPC (CuD) gezeigt. Der präsynaptische Marker Bsn ist abweichend von Abbildung 4.6-3 wo die gesamte Bsn Färbung gezeigt ist, nur dort gezeigt wo sie mit der roten Färbung sprich Axone oder OPC überlagert (in grün eingezeichnet => gelben Strukturen durch Überlagerung mit dem roten Kanal). Dies soll potentielle präsynaptische Endigungen in engster räumlicher Nähe zu den Axonen/OPC darlegen. Ob es sich dabei um tatsächliche Synapsen handelt, kann durch die Färbung nicht beantwortet werden.

Ein weiterführender Ansatz, zeigt ausgehend von der bekannten OPC und Bsn Färbung eine zusätzliche PSD-95 Färbung, welches ein klassisches Markerprotein für Postsynapsen darstellt. Abbildung 4.6-6 A und B zeigt zunächst eine überlagernde (co-lokalisierende) Färbungen von PSD-95 (A) bzw Bsn (B) mit der OPC Färbung (eYFP). In C und D sind diese beide Färbungen aus A und B in einer zusammengefasst worden, wobei PSD-95 nun im blauen Kanal dargestellt ist. Durch die Überlagerung aller drei Marker ergeben sich weiß gefärbte Strukturen. In diesen liegen alle drei Marker, der Auflösungsgrenze entsprechend, räumlich zusammen, dies macht eine synaptische Innervierung des OPC an dieser Stelle sehr wahrscheinlich. In der hier gezeigten Zelle lassen sich diese dreifach Ko-Lokalisierungen nur auf den Fortsätzen finden (D \*), der Zellkörper weist nur Ko-Lokalisierungen mit Bassoon auf (#).

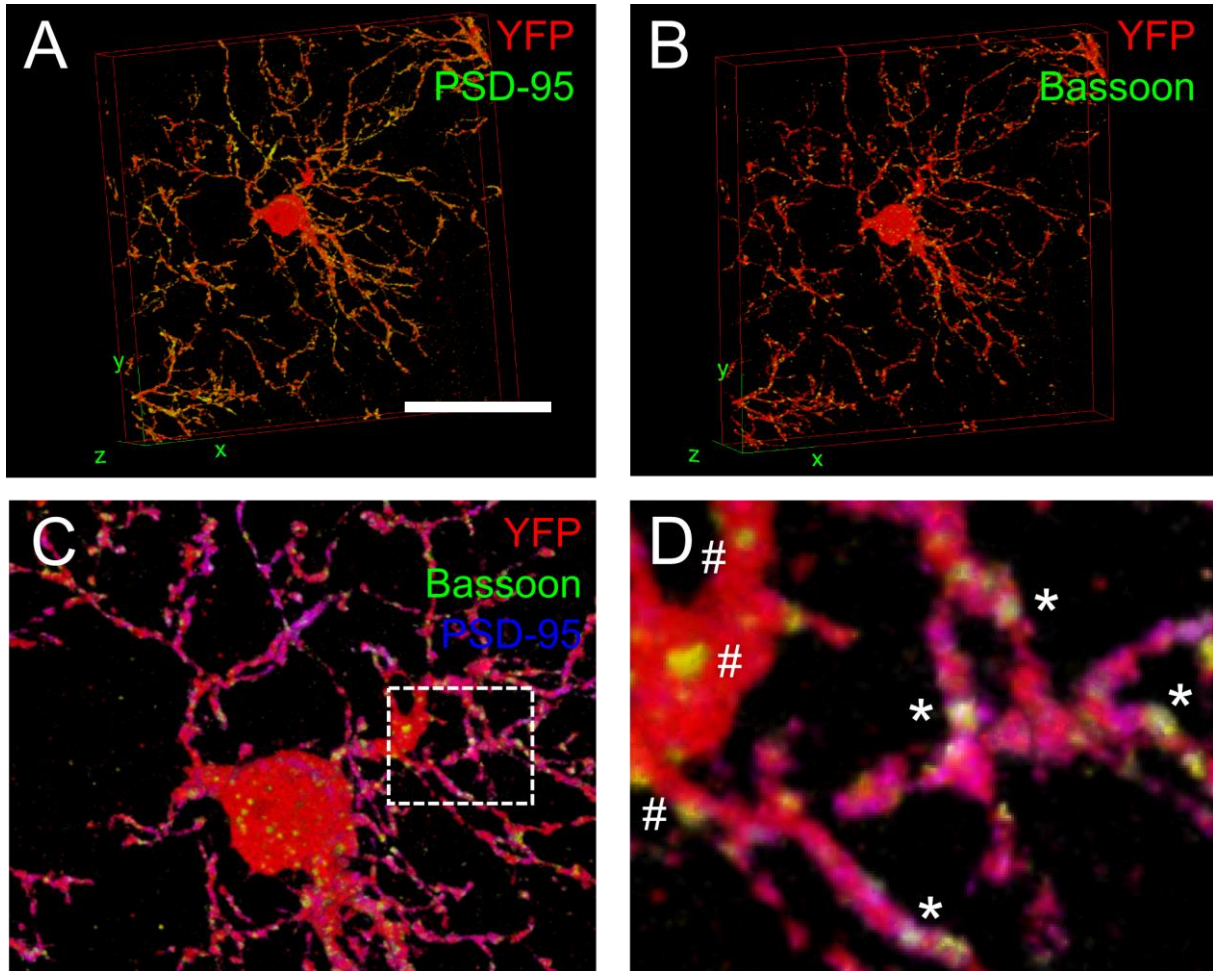


Abbildung 4.6-6 Prä- und Postsynaptische Marker ko-lokalisieren auf kortikalem OPC.

Bei diesem kortikalem OPC (YFP, rot) sind die überlagernden Färbungen für PSD-95 (A) und Bassoon (B), jeweils in gelb (grüner RGB Kanal) dargestellt. In C und D sind alle drei Färbungen überlagert dargestellt (RGB) wobei PSD-95 in den blauen RGB Kanal gelegt wurde. Daraus ergeben sich entsprechende Mischfarben, so entstehen weiße Strukturen durch eine Überlagerung aller drei RGB Kanäle. Weiße Strukturen bei denen der Prä- und Postsynaptische Marker (Bsn bzw PSD-95) mit der GFP Färbung komplett Überlagern sind durch einen \* markiert und waren nur auf den Fortsätzen erkennbar. Auf dem Zellkörper waren nur Überlagerungen mit der Bsn Färbung erkennbar (gelbe Strukturen, #). Die extreme räumliche Nähe aller drei Marker macht eine synaptische Innervierung an den \* Stellen sehr wahrscheinlich. (Scale Bar = 40µm)

## 4.7 Zellteilungsanalyse von OPC in NG2 $-/-$ Mäusen

Die mitotischen Eigenschaften der OPC im Allgemeinen (Simon et al., 2011)/2.2.2 sowie der Einfluss des NG2 Proteins auf die Teilungseigenschaften, legen eine genauere Analyse dieser in der NG2  $-/-$  nahe (Sugiarto et al., 2011).

Dazu wurde zunächst das Teilungsverhalten beider Genotypen im lädierten Gewebe untersucht (siehe auch 2.2.4). Die in Kollaboration mit Dr. Leda Dimou (AG Götz, LMU München) durchgeführten *stab wound lesions* (SW), wurden dabei als Läsionsmodell verwendet.

### 4.7.1 Analyse der mitotischen Zellen im lädierten Kortex

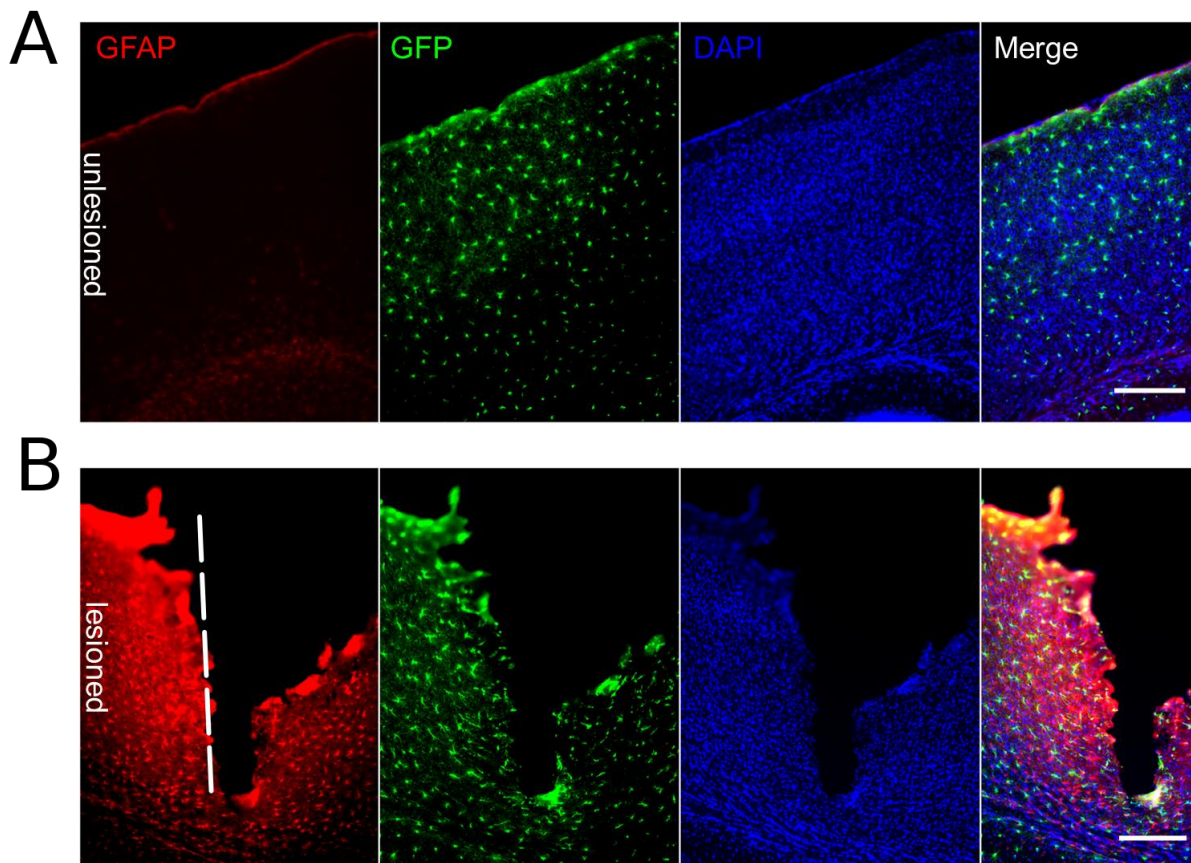


Abbildung 4.7-1 Stab wound Läsionen im murinen somatosensorischen Cortex einer adulten NG2  $-/-$  Maus.

Dargestellt ist ein Ausschnitt aus der unlädierten (A) sowie aus der mit Stab Wound Läsion versehenen Cortex Hemisphäre (B, gestrichelte Linie  $\sim 0,7$ mm Tiefe). Es wurden das in Astrozyten vorhandene Intermediärfilament GFAP, YFP (OPC) sowie DNA (DAPI) angefärbt. Es sind die Dimensionen der Wunde sowie eine stark erhöhte Expression von GFAP im Gewebe um die Läsion erkennbar. Der Zeitpunkt war 3 Tage nach Erzeugung der Wunde (3dpi), einer adulten P135 NG2  $-/-$  Maus. (Scale Bar = 200 $\mu$ m)

Wie Abbildung 4.7-1 A zu entnehmen, zeigt der unlädierte Cortex kaum GFAP gefärbte Zellen/Fläche. Im Gegensatz dazu führte eine Schnitt Wunde (*stab wound*), zu einer massiven Hochregulation von GFAP im umliegenden Gewebe 3 Tage nach der Läsion (Abbildung 4.7-1 B). Neben dieser Reaktion der Astrozyten sind noch weitere zelluläre Reaktionen in diesem Zeitraum feststellbar. Abbildung 4.7-2 zeigt, eine starke Zunahme der mitotischen Zellen in im lädierten Gewebe, was man an den BrdU gefärbten Zellkernen im Vergleich zur ipsi-lateralen Hemisphäre (nicht lädierte Cortex Hälfte) erkennen kann. Dieser Effekt ist sowohl in WT als auch in NG2  $-/-$  Tieren feststellbar und wird im Folgenden genauer aufgelöst. Mit lädiertem Gewebe ist dabei der kortikale Bereich im Abstand von maximal 300 $\mu$ m von der Läsionskante (gestrichelte Linie) definiert.

Eine weitere Beobachtung ist die Änderung der Zellmorphologie von OPC im lädierten Gewebe wie es für den WT in Abbildung 4.7-3 gezeigt ist. Im unlädierten Gewebe weisen die meisten OPC eine sternförmige Morphologie auf, wohingegen im lädierten die meisten ein Polarisierung, in Form eines verlängerten Zellkörpers und weniger dickerer Fortsätze, aufweisen. Abbildung 4.7-4 zeigt OPC im lädierten Gewebe beider Genotypen, wobei der WT eine stärkere Polarisierung aufweist sowie eine höhere Zahl an OPC vermuten lässt.

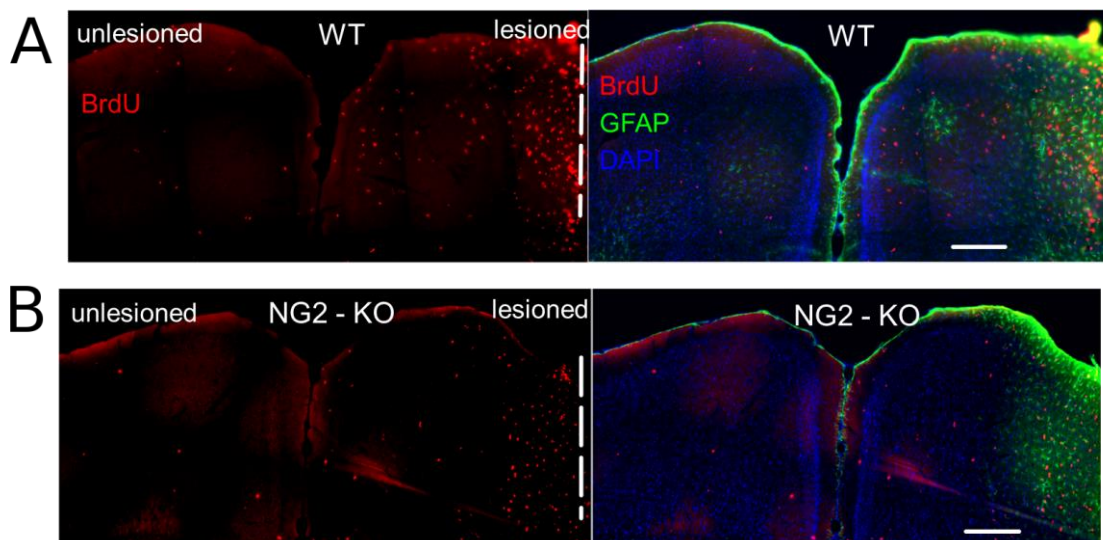


Abbildung 4.7-2 Zellteilungsunterschiede im Cortex nach einer stab wound.

Die zusammenhängenden Cortex Hemisphären 3 *days post injury* (dpi) gezeigt, die Kante der Stab Wound ist durch die gestrichelte Linie markiert. Die BrdU Färbung (rot) zeigt alle innerhalb von 3 Tagen nach der Läsion Teilungsaktiven Zellen. Sowohl die Zellteilung als auch die GFAP Hochregulation in einem Abstand von etwa 300-400  $\mu$ m von der Läsionskante, den größten Unterschied zeigt und zwar sowohl im WT (A) als auch im NG2  $-/-$  (B). (Scale Bar = 200 $\mu$ m)

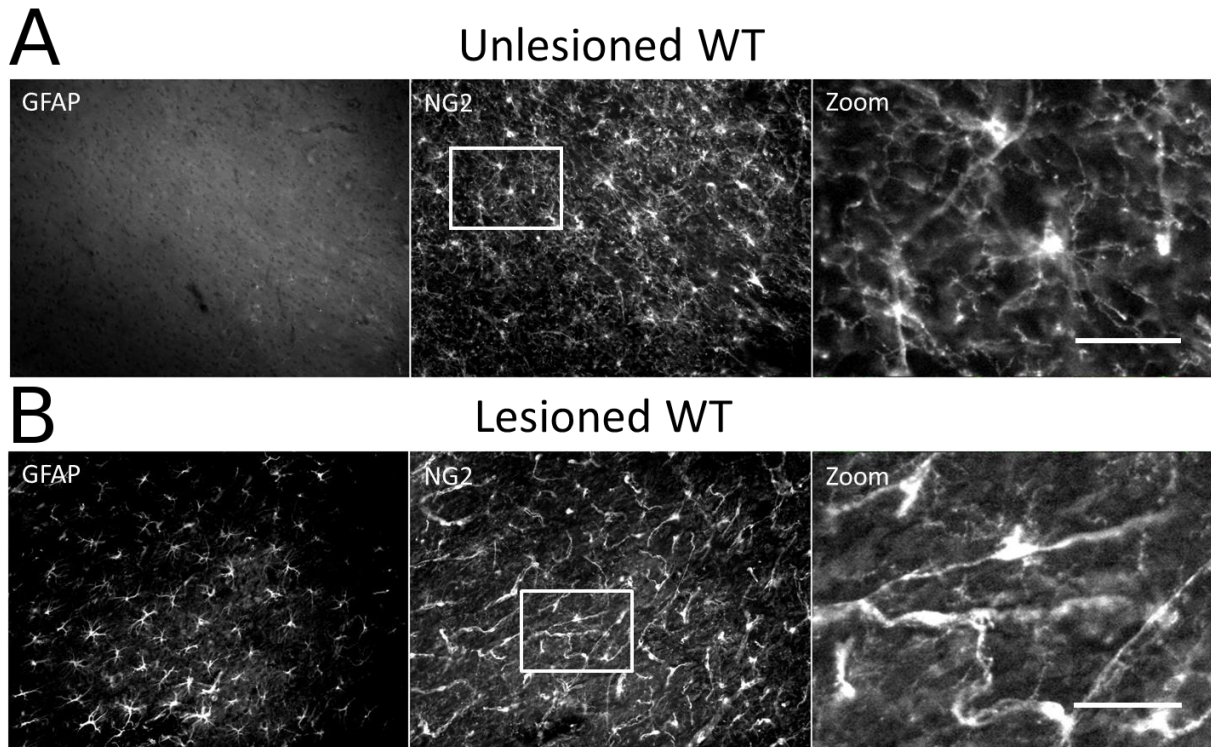


Abbildung 4.7-3 Morphologieunterschiede von WT OPC im unlädierten und lädierten Cortex.

Die in A gezeigten mit NG2 AK gefärbten WT OPC, haben in unlädierten Cortexarealen eine sternförmige Morphologie mit vielen Fortsätzen (A). In unmittelbarer Nähe zur Läsion zeigen die meisten OPC eine polarisierte Morphologie mit zwei dicken Fortsätzen (B). Die Läsionsnähe kann anhand der GFAP Färbung erkannt werden. (Scale Bar = 40µm)

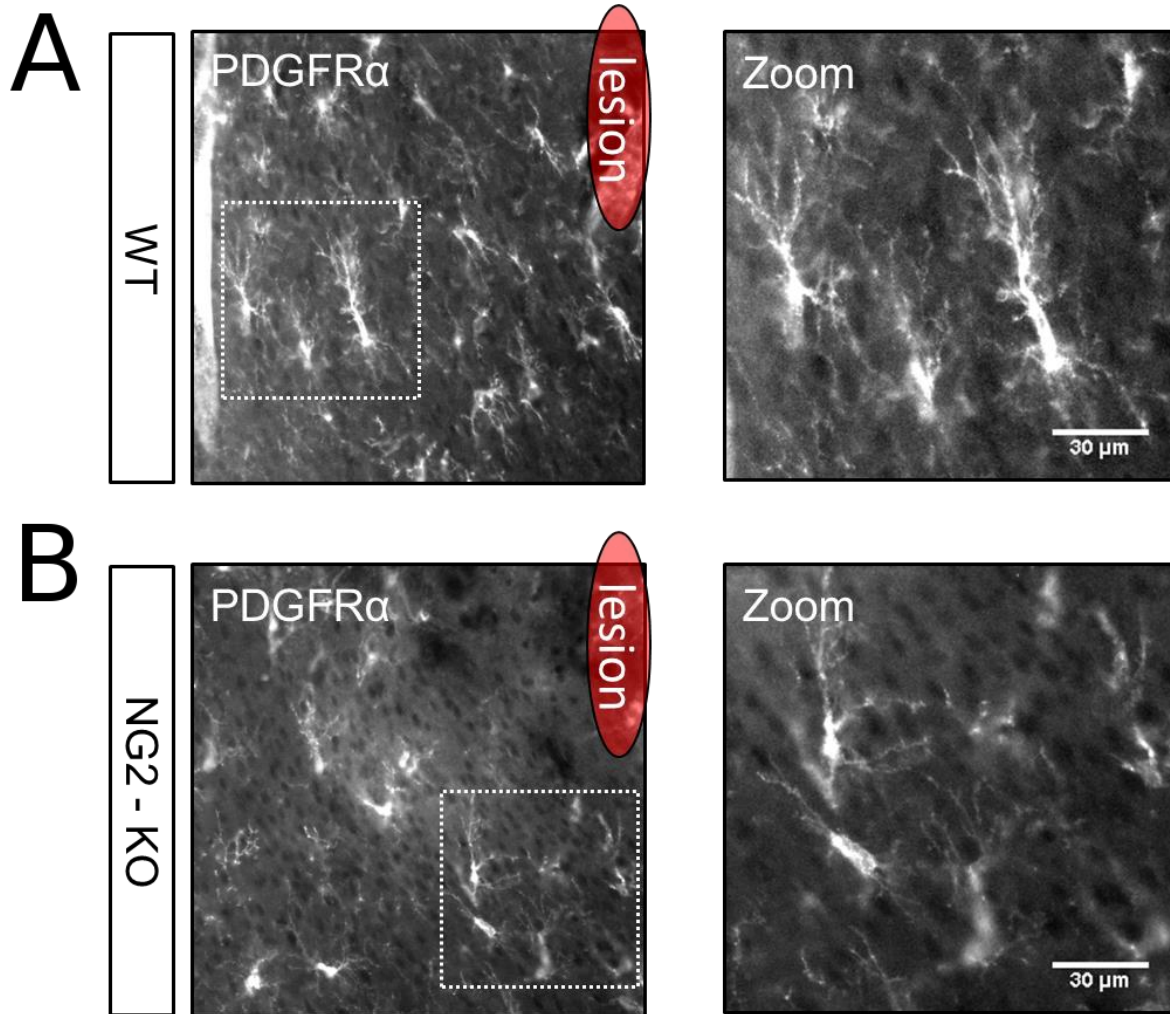


Abbildung 4.7-4 Morphologieunterschiede von WT und NG2  $-/-$  OPC im lädierten Cortex.

In Anlehnung an die morphologischen Unterschiede der OPC durch die Läsion (Abbildung 4.7-3), ist hier ausschließlich lädiertes Gewebe gezeigt und zwar sowohl vom WT als auch vom NG2  $-/-$ . Die OPC wurden dabei mit einem AK gegen PDGFR- $\alpha$  angefärbt. Es deuten sich morphologische Unterschiede als auch Unterschiede in der Zellzahl an. (scale bar = 30 $\mu$ m)



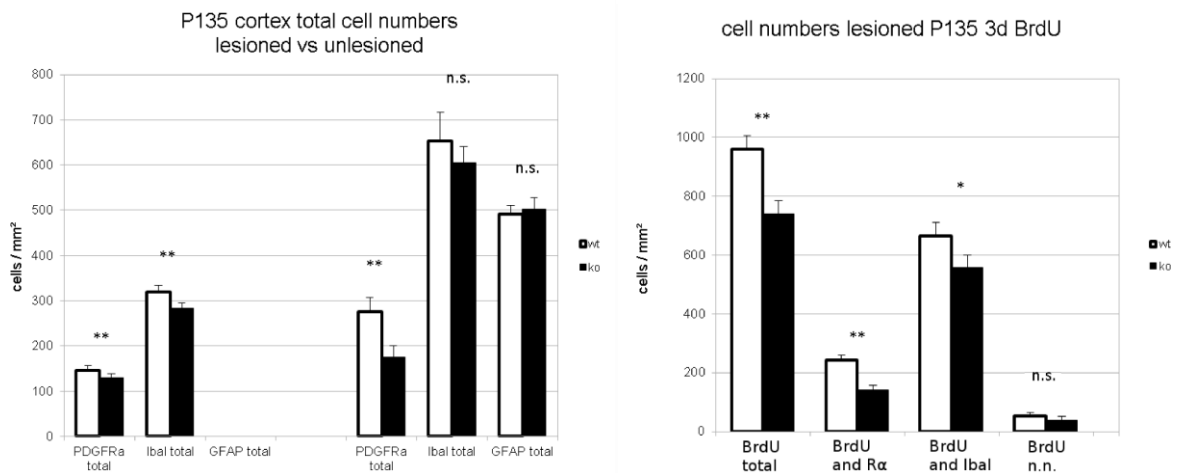


Abbildung 4.7-5 Unterschiede in der Zellzahl verschiedener Zelltypen im lädierten und unlädierten Cortex.

Die Zellzahl der Gesamtzellen (A) sowie die Zusammensetzung der BrdU+ Zellen im lädierten Gewebe (B) wurde im WT und NG2 -/- ermittelt und dargestellt. Dabei zeigten sich die größten Unterschiede sowohl bei der Gesamtzahl (PDGFRα+) als auch bei den teilungsaktiven OPC 3dpi (BrdU+/PDGFRα+). Beide sind im NG2 -/- reduziert. (n=4, 4 Tiere pro Genotyp)

Nach umfassender Auswertung der Zelltypen anhand bestimmter Zelltyp-Marker, lassen sich folgende Unterschiede zwischen den Genotypen feststellen (Abbildung 4.7-5). In der unlädierten kontralateralen Cortex Hemisphäre, gibt es keine größeren Unterschiede in der Zellzahl von OPC (PDGFRα+ Zellen) sowie bei der Microglia (Iba1+ Zellen). Im lädierten Gewebe, finden sich etwa eine Drittel weniger OPC, Microglia und Astrozyten zeigen 3dpi keine größeren Unterschiede. Bei den sich teilenden Zellen (BrdU+), gibt es im lädierten Gewebe 3dpi im NG2 -/- etwa 1/5 weniger Zellen als im WT. Bei den zu diesem Zeitpunkt teilungsaktiven Gruppen OPC und Microglia, zeigt sich der Größte Unterschied zwischen den OPC der beiden Genotypen.

## 4.7.2 Analyse der mitotischen Zellen im unlädierten Cortex

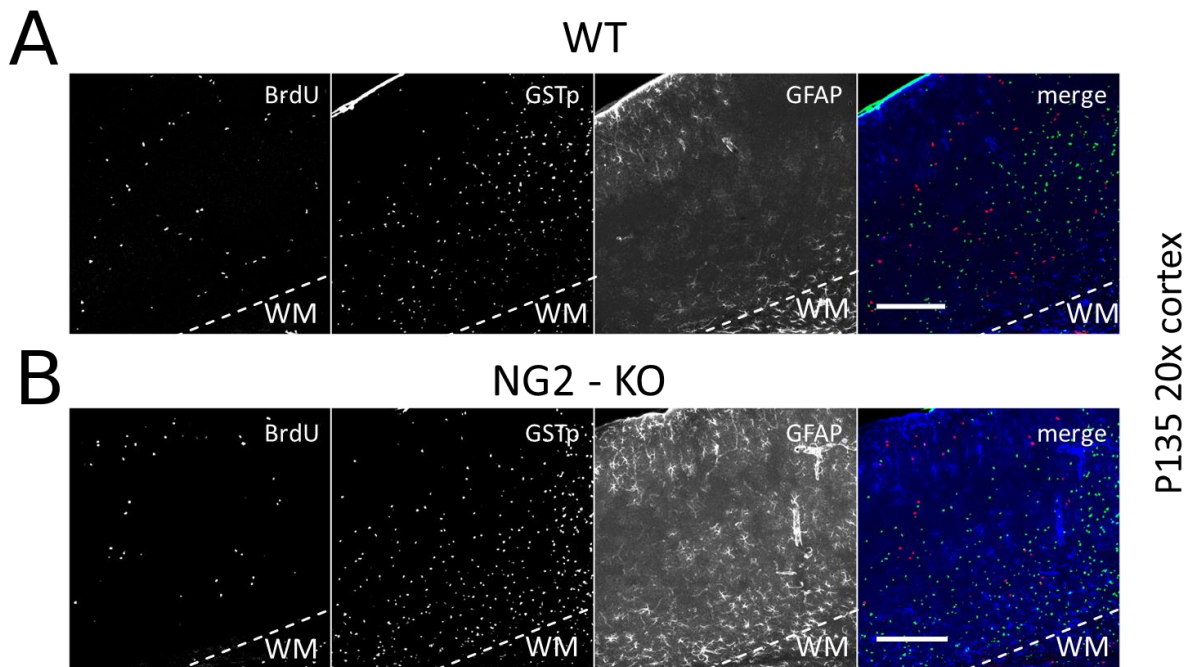


Abbildung 4.7-6 Leichte Unterschiede bei den mitotischen Zellen im Cortex von WT und NG2<sup>-/-</sup> Tieren.

Die Zellteilung im unbeschädigten Cortex wurde in Mäusen beider Genotypen untersucht, die zuvor mit BrdU markiert worden waren. So sind im Cortex alle Zellen durch eine BrdU Färbung darstellbar, die sich in diesem Zeitraum geteilt haben. Darüber hinaus sind hier reife Oligodendrozyten (GSTp) und GFAP gefärbt. Es ist ein Unterschied zwischen den Genotypen erkennbar sowohl was die Zellzahl, weniger im NG2<sup>-/-</sup> (B), als auch die GFAP gefärbte Fläche, größer im NG2<sup>-/-</sup> (B), angeht. (Scale Bar = 200µm)

Um Unterschiede bei der Zellteilung im unlädierten Cortex weiter zu untersuchen, mussten wesentlich längere Markierungszeiten für die BrdU Inkorporation gewählt werden, da die Zellzykluslänge im adulten Cortex ohne Läsion um ein vielfaches höher liegt. Somit wurden adulte Tiere im postnatalen Alter von P80, P135, P225 untersucht. Bei allen Altersgruppen fand zuvor eine zwei wöchige Applikation von BrdU statt, wobei eine Gruppe danach weitere 90 Tage ohne BrdU in der Haltung gelassen wurde (*retaining periode*, 90ret), dies traf auf die P225 Tiere zu. Abbildung 4.7-6 ist zu entnehmen, dass nach 2 wöchiger BrdU Behandlung eine repräsentante Anzahl an mitotischen Zellen in der Färbung nachweisbar ist. Bei diesen Teilungsaktiven Zellen, handelte es sich hauptsächlich um OPC, allerdings waren auch einige Microglia Zellen BrdU positiv (Abbildung 4.7-7&Abbildung 4.7-8).

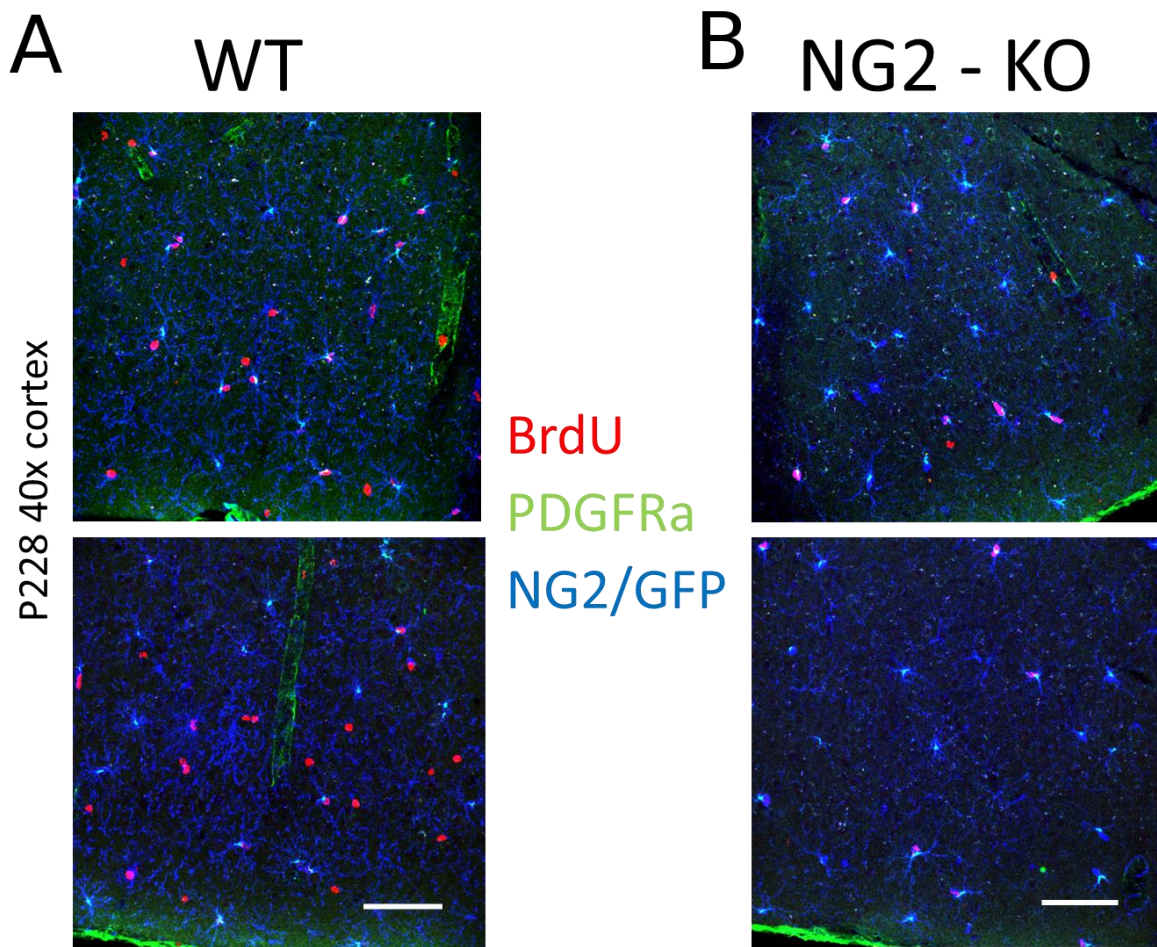


Abbildung 4.7-7 Identifizierung der mitotischen Zellen zwischen WT und NG2  $-/-$  Mäusen.

Die meisten der BrdU $+$  Zellen waren OPC (GFP $+$  oder NG2 $+$ /PDGFR $\alpha$  $+$ /BrdU $+$ ), allerdings waren einige der BrdU $+$  Zellen nicht als OPC identifizierbar. (Scale Bar = 50 $\mu$ m)

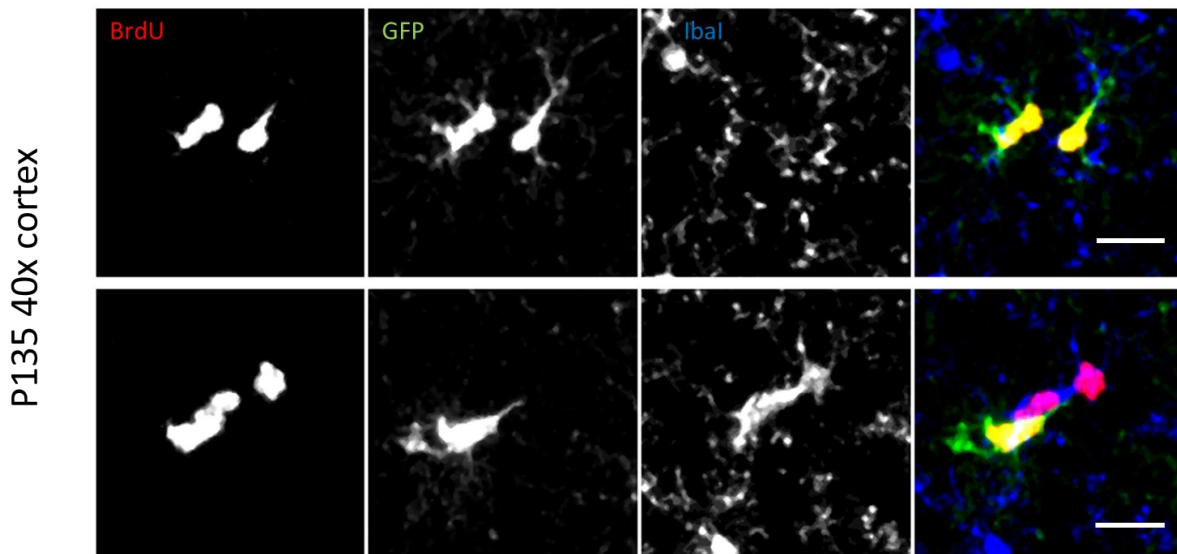


Abbildung 4.7-8 Identifizierung der mitotischen Zelltypen im Cortex der NG2 <sup>-/-</sup> Maus.

Wie erwähnt waren die meisten der BrdU<sup>+</sup> Zellen OPC (GFP<sup>+</sup>/BrdU<sup>+</sup>), die restlichen BrdU<sup>+</sup> Zellen ließen sich als Microglia (IbaI<sup>+</sup>/BrdU<sup>+</sup>) identifizieren. (Scale Bar = 20µm)

Nach statistischer Auswertung, zeigte sich bei den Gesamt-Zellzahlen der Analysierten Zelltypen OPC (PDGFR $\alpha$ , R $\alpha$ ), Microglia (IbaI) und Oligodendrozyten (GSTp), bis auf eine Ausnahme, bei allen Alterszeitpunkten, kaum Unterschiede. Lediglich die GSTp Zellezahl waren im NG2 <sup>-/-</sup> bei den älteren Tieren (P135, P225) erhöht (Abbildung 4.7-9 A).

Die mitotischen Zellen (BrdU<sup>+</sup>) lagen zu jedem Zeitpunkt im NG2 <sup>-/-</sup>, unter denen der WT (Abbildung 4.7-9 B). Allerdings stellte sich bei der Identifizierung, der Zelltypen heraus, dass dieser Unterschied bei den älteren Tieren (P135, P225) hauptsächlich auf teilungsaktive Microglia zurückzuführen war. Lediglich bei den P80 Tieren ging dies ausschließlich auf die OPC zurück.

Darüber hinaus zeigte sich ein Unterschied in der GFAP gefärbten Cortexfläche, diese war im NG2 <sup>-/-</sup> bei P135 alten Tieren deutlich größer als in den WT (Abbildung 4.7-10 A). Eine Analyse der S100 $\beta$ <sup>+</sup> Zellen, zeigte keinen Unterschied zwischen den Genotypen zu diesem Zeitpunkt (B), auch eine grobe Analyse der Myelinisierung (MBP u MOG Area und Intensity) zeigte keinen Unterschied (C).

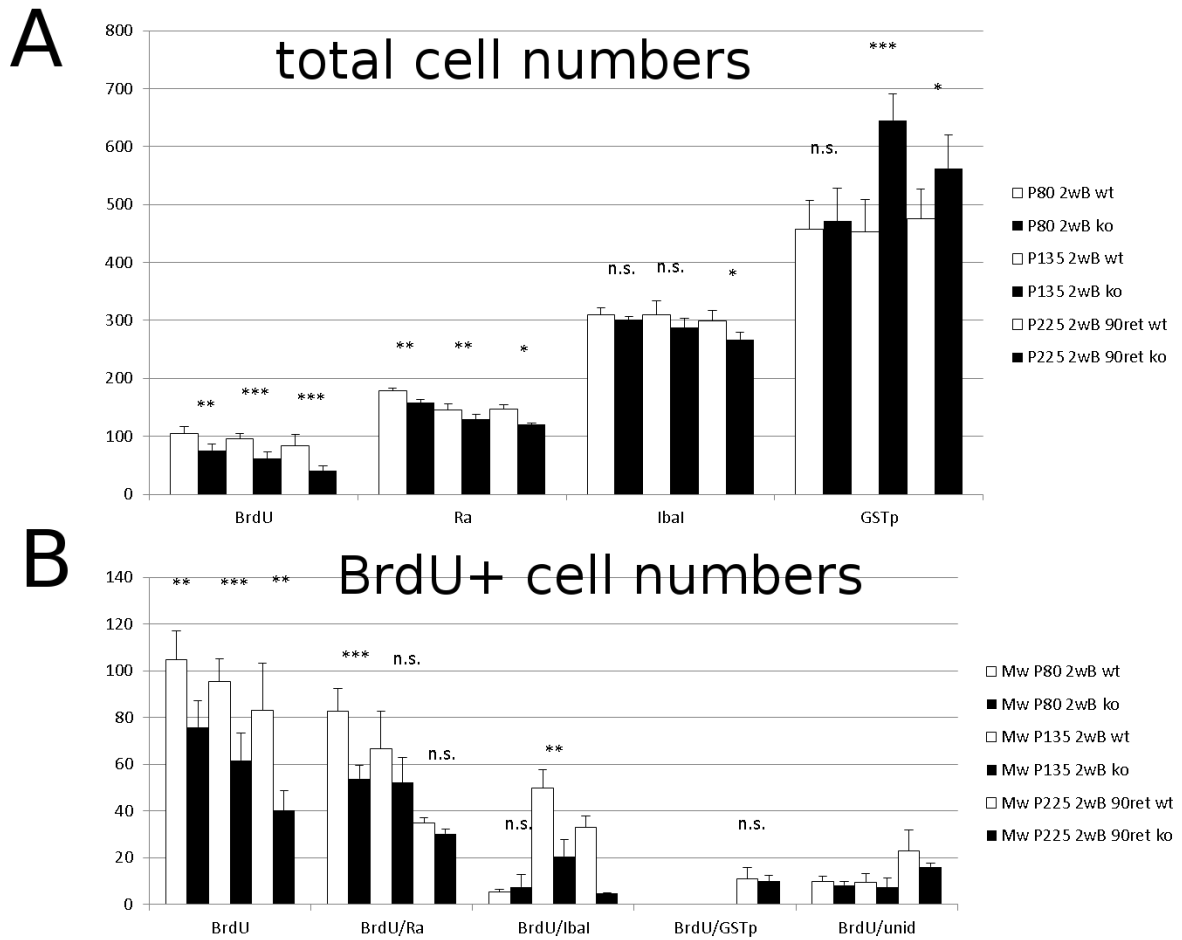


Abbildung 4.7-9 Zellzahlunterschiede verschiedener Zelltypen im Cortex von WT und NG2 -/- Tieren bei verschiedenen Altersgruppen.

Es wurden Auswertung von 3 verschiedenen Altersgruppen P80, P135 und P225 durchgeführt, alle Tiere waren für 2 Wochen vor der Analyse mit BrdU markiert worden, wobei die Tiere des letzten Zeitpunkt noch einer 90 tägigen Phase ohne BrdU unterzogen worden waren, dabei zeigten sich Unterschiede zwischen den Genotypen bei der Gesamtzahl der BrdU+ Zellen diese waren stets im NG2 -/- reduziert. Die Anzahl der Oligodendrozyten (GSTp+) war bei den letzten beiden Altersgruppen im NG2 -/- erhöht (A). Die Identifizierung der BrdU+ Zelltypen ergab dass diese bei den P80 Tieren fast ausschließlich OPCs waren, bei den P135 und P225 kam ein signifikanter Anteil an Microglia (IbaI+) hinzu (B).

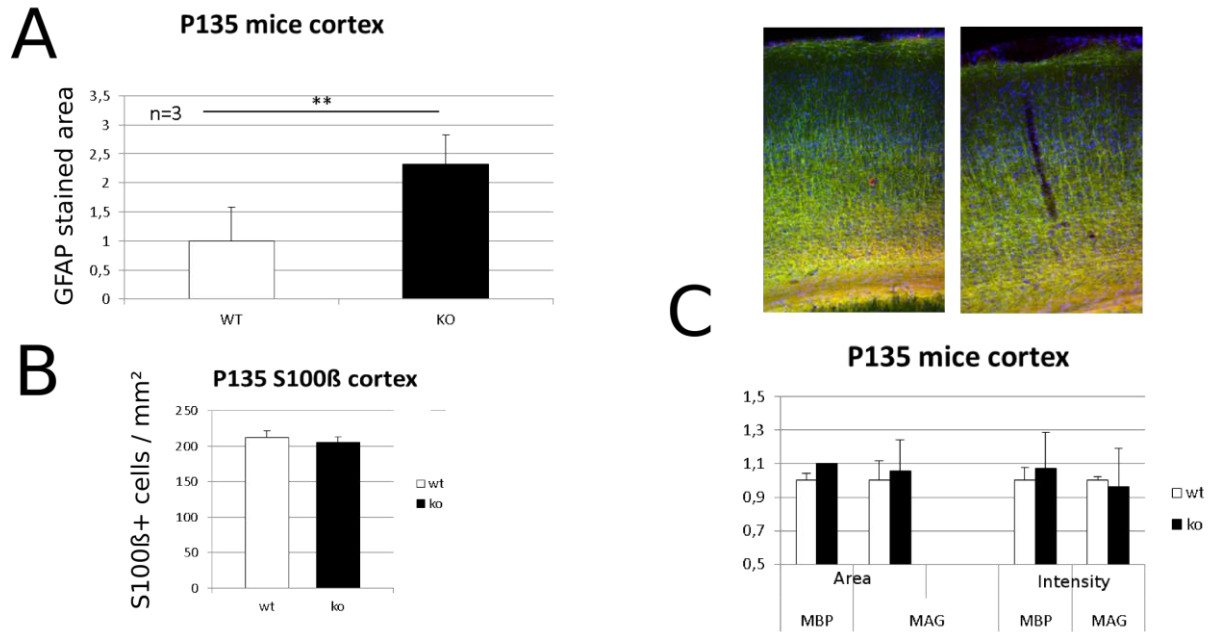


Abbildung 4.7-10 Astrogliose und Myelinunterschiede zwischen WT und NG2  $-/-$  Tieren.

Der in Abbildung 4.7-6 gezeigte Effekt einer erhöhten GFAP gefärbten Fläche im Cortex von NG2  $-/-$  wurde in A quantifiziert. In B wurde die Zellzahl von S100 $\beta$ + Zellen (hauptsächlich Astrozyten) im  $-/-$  verglichen, um die Unterschied bei der GFAP gefärbten Fläche aus A, auf zellulärer Ebene zu untersuchen. In C ist die Myelinisierung zwischen den Genotypen verglichen, die in Abbildung 4.7-9 A den größten Unterschied bei der Anzahl der Oligodendrozyten zeigten. Es wurde die kortikale Fläche und Intensität einer MBP und MAG Färbung zwischen den Genotypen verglichen, wobei sich kein Unterschied zeigt.

## 5 Diskussion

### 5.1 Morphologie von OPC / Synapsen

Die zur Identifizierung von synaptischen Verbindungen zwischen Neuronen und OPC (Bergles et al., 2000) durchgeführten Immunofluoreszenz-Färbungen in adulten Tieren der NG2-EYFP Mauslinie, dienen der Veranschaulichung der anatomischen Interaktion von OPC mit dem neuronalen Netzwerk. Weiterhin wurde der Versuch unternommen synaptische Verbindungen zwischen den beiden Zelltypen darzustellen um diese zu lokalisieren und quantifizieren.

Das verwendete *confocal laser scanning microscope* (cLSM) bewegt sich dabei methodisch bei einer Auflösungsgrenze von 200nm. Damit ist der Abstand zweier Punkte gemeint, welche noch als getrennte Objekte dargestellt werden können. Als Grundlage gilt hierbei die halbe Wellenlänge ( $\lambda/2$ ) des verwendeten Lichts als Limit der klassischen Lichtmikroskopie (Herbert et al., 2012). Da es sich bei synaptischen Verbindungen um sehr kleine Strukturen handelt, die typische Breite des synaptischen Spalts beträgt 20 nm (wikipedia), bewegt man sich mit der verwendeten Methode an bzw. unter der Auflösungsgrenze.

Für die generelle Verteilung der OPC Zellkörper, konnte eine homogene Anordnung in allen untersuchten Hirnarealen beobachtet werden, wofür es bereits zahlreiche Studien gibt (Hughes et al., 2013; Karram et al., 2008; Sakry et al., 2011). Bei der genaueren Untersuchung von kortikalen und hippocampalen OPC konnte eine hohe Anzahl und Länge der Zellfortsätze beobachtet werden. Die Fortsatzlänge betrug dabei fast immer ein Vielfaches der Zellkörperlänge. Auch waren sehr dichte Interaktionen mit den Neuriten oder auch neuronalen Zellkörpern zu beobachten, dies lässt sich durch die engste mögliche räumliche Nähe in den gezeigten 3D Rekonstruktionen nachvollziehen. Präsynaptische Marker waren hauptsächlich auf den OPC Fortsätzen zu beobachten, wobei diese eine vergleichbare Größe, mit denen auf Axonen aufwies, dies ist anhand der überlagernden Färbungen verdeutlicht. Durch die Überlagerung von prä- und postsynaptischem Marker sowie der OPC Färbung, waren darüber hinaus einige Strukturen zu identifizieren, welche aufgrund dessen als mögliche synaptische Verbindungen in Betracht kommen.

Wegen der bereits erwähnten methodischen Limitierung, sowie der Unfähigkeit die Funktionalität der postulierten synaptischen Verbindungen nachzuweisen, wurde von einer Quantifizierung abgesehen. Wobei auch hier die o.g. Dreifachüberlagerungen (potentielle Synapsen) nur auf den Fortsätzen zu finden waren. Ob OPC postsynaptische Marker wie PSD-95 exprimieren ist durch die Literatur noch nicht beantwortet, wird aber durch diese Studie nahegelegt.

## 5.2 Verhalten von OPC unter Läsionsbedingungen

OPC konnten in unterschiedlichen Läsionsmodellen als einer der Zelltypen identifiziert werden, die neben der Microglia unmittelbar auf die Beschädigung des Nervengewebes reagieren (Dimou et al., 2008; Simon et al., 2011). Dabei sind die augenscheinlichsten zellulären Reaktionen eine erhöhte Proliferationsrate, eine geänderte Morphologie im Sinne einer Zellpolarisierung, sowie eine gerichtete Migration in das umliegende Gewebe der Läsion (Hughes et al., 2013). Um mögliche Unterschiede in NG2  $-/-$  Mäusen aufzudecken, wurde in Kollaboration mit Dr. Leda Dimou (LMU), *stab wound* Läsionen in diesen Tieren erzeugt. Dabei zeigte sich eine verminderte Proliferationsrate, gemessen an der Gesamtzahl der BrdU+ Zellen, im NG2  $-/-$ . Diese ging mit einer erniedrigten Anzahl an OPC im lädierten Gewebe einher. Zudem konnte eine verminderte Fähigkeit zur Polarisierung der NG2  $-/-$  OPC im lädierten Gewebe gezeigt werden, welche während der Entwicklung bei entlang des RMS migrierenden OPC nicht beobachtet werden konnte. Als läsionsspezifische Ursache für den Unterschied bei der Polarisierung im NG2  $-/-$ , konnte ein FGF Gradient identifiziert werden (Daten hier nur zum Teil gezeigt, siehe auch (Biname et al., 2013)). Dieser könnte auch als Erklärung für die Unterschiede bei der Proliferationsrate dienen. Generell dient NG2 als FGF Co-Rezeptor auf NG2+ Zellen (Goretzki et al., 1999), dessen *down-stream signalling* auch mit Schlüsselmolekülen des Zellzyklus, wie CDC42, in Verbindung steht (Eisenmann et al., 1999).

Um die Frage nach der Läsionspezifität des Proliferationsunterschiedes bei NG2  $-/-$  Tieren zu beantworten, wurden mehrere Altersgruppen ohne Läsion untersucht. Die Gesamtzahl der OPC war dabei fast gleich, 8-16% weniger kortikale OPC im NG2  $-/-$ . Der sich beim jüngsten untersuchten Alter ankündigende Unterschied in der Anzahl der sich teilenden OPC, konnte in den älteren Tieren nicht bestätigt werden. Hier zeigten sich zwar weniger BrdU+ Gesamtzellen, diese wurden aber zu einem erheblichen Anteil als Microglia identifiziert (auch in den WT)(4.7.2). Da dies unter nicht pathologischen Bedingungen nicht den aus der Literatur abgeleiteten Erwartungen entsprach (Simon et al., 2011), muss dies auf eine mögliche durch die Haltung der Tiere hervorgerufene Infektion zurück zu führen sein.



### 5.3 Konstitutive Spaltung von NG2 durch $\alpha$ - und $\gamma$ -Sekretase

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass NG2 sequentiell von  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Sekretase proteolytisch prozessiert wird. Diese Art der Prozessierung scheint ein genereller Mechanismus für Typ-1 Membranproteine zu sein, der schon für viele Substrate gezeigt werden konnte, Notch, APP, L1, N-Cadherin und Neuroligin (Blaumueller et al., 1997; Kohutek et al., 2009; Lammich et al., 1999; Peixoto et al., 2012; Riedle et al., 2009; Suzuki et al., 2012) sind hier Beispiele mit besonderer Relevanz für das Nervensystem. ADAM10, welche als  $\alpha$ -Sekretase für die APP Spaltung identifiziert werden konnte, war auch im Falle von NG2 für den Großteil der konstitutiven sowie der aktivitätsabhängigen Ektodomän Spaltung (*Shedding*) verantwortlich (siehe unten). Die Spaltung von NG2 durch ADAM10 führte zu zwei Fragmenten: Einer ~10 kD kleineren Ektodomäne sowie eines 12 kD großen C-terminalen Fragments (CTF). Beide Fragmente waren von endogenem sowie von dem rekombinanten verkürzten NG2<sub>del</sub> Konstrukt nachweisbar.

Die NG2 Ektodomäne als 290 kD Form im Vergleich zum FL-Protein von 300 kD ist schon seit Längerem bekannt (Nishiyama et al., 1995). Über jegliche membrangebundenen (CTF) oder intrazellulär abgespaltenen Domänen (ICD) von NG2 fehlt bis heute jedoch jeglicher Nachweis in der Literatur. Für o.g. sonstige Substrate sind CTF und ICD jedoch beschrieben und charakterisiert (Prox et al., 2012), da diese als grundlegender Nachweis für die Prozessierung durch  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Sekretase gesehen werden. Das NG2 CTF welches hier zum ersten Mal nachgewiesen werden konnte, fand sich ausschließlich in Membranfraktionen und war darüber hinaus stets durch die Hemmung des  $\gamma$ -Sekretase Komplexes anreicherbar. Darüberhinaus war eine gewisse endogene Menge des NG2 CTF ohne Hemmung nachweisbar. Somit lässt sich zum einen die Prozessierung des NG2 CTF ebenfalls als konstitutives Ereignis beschreiben, wobei zum anderen ein Teil dieses Fragments stabilisiert ist. Als zusätzlicher Nachweis der  $\gamma$ -Sekretase Spaltung ließ sich neben der erhöhten CTF Menge, durch die pharmakologische Hemmung, die NG2 ICD zum ersten Mal nachweisen, deren Mengen ebenfalls in Abhängigkeit zur  $\gamma$ -Sekretase Aktivität standen. Die für die  $\gamma$ -Sekretase als obligatorisch beschriebene  $\alpha$ -Sekretase Spaltung (De Strooper et al., 1999), konnte auch für NG2 festgestellt werden. Somit spaltet die  $\gamma$ -Sekretase das NG2 CTF nicht aber das FL-Protein.

Für die Untersuchung einer weiteren physiologischen Relevanz der konstitutiven bzw. aktivitätsabhängigen (siehe unten) sequentiellen Spaltung von NG2 standen nun zwei Hauptwege zur Verfügung. Zum einen ein möglicher Einfluss der intrazellulären Fragmente/Teils von NG2 auf intrazelluläre Signalwege, wie Beispielsweise eine Beeinflussung der Proteinexpression. Zum anderen der Einfluss der NG2 Ektodomäne innerhalb der ECM bzw. einer möglichen Interaktion dieser.

## 5.4 Funktion des intrazellulären Teils von NG2

### 5.4.1 Die Lokalisierung von intrazellulären NG2 Fragmenten

Wie bereits erwähnt konnten NG2 CTF und ICD das erste Mal in dieser Studie gezeigt werden, darüber hinaus besitzt das FL NG2 Protein die gleiche intrazelluläre Sequenz wie das CTF und die ICD. Für mögliche intrazelluläre Funktionen stehen somit das FL, CTF und die ICD als mögliche Regulatoren zur Verfügung.

Um zunächst die Frage nach der Lokalisierung dieser Fragmente zu klären wurden einige Experimente durchgeführt. Das FL NG2 Protein zeigt in der Zellfärbung eine hauptsächliche Lokalisierung an der Zellmembran, welches den bekannten Erwartungen entspricht (Niehaus et al., 1999). Da NG2\_del zu sehr großem Anteil gespalten wird und zu massiv erhöhter NG2 CTF Menge führt, kann dessen Expression auch als Expression des NG2 CTFs gesehen werden. Das CTF/NG2\_del lässt sich nur membranständig nachweisen, allerdings ist es neben der Zellmembran auch massiv an intrazellulären Membranen nachweisbar, welches wohl hauptsächlich auf die hohen Expressionsmengen zurückzuführen ist, die einen Rückstau in den an der Zelloberflächenlokalisierung beteiligten Kompartimenten wie ER und Golgi hervorrufen. Somit stellt die Lokalisierung des NG2\_del/CTFs keine unerwartete Erkenntnis dar.

Die größten Möglichkeiten der intrazellulären Lokalisierung ergeben sich für die NG2 ICD die theoretisch freibeweglich sein sollte, da sie nicht mehr kovalent mit der Transmembrandomäne verbunden ist. Für das Notch Protein konnte beispielsweise gezeigt werden, dass dessen ICD (NICD) welche eine konservierte DNA Bindedomäne enthält, in den Zellkern translokalisiert und dort als Transkriptionsfaktor mit entsprechender Regulation von Zielgenen auftreten kann (De Strooper et al., 1999). Die Sequenzanalyse der NG2 ICD wies keine konservierten Proteindomänen auf. Neben dem PDZ-Bindemotiv mit bekannten Interaktionspartnern, zeigte diese einige für eine nukleäre Lokalisierung relevanten Sequenzen auf. So waren am N-Terminus der ICD zwei nukleäre Lokalisierungssequenzen (NLS) zu finden, sowie innerhalb der ICD Sequenz ein WW4 Bindemotif. WW Domänen enthaltende Proteine gibt es mit Hinblick auf ihre Funktion in mehreren Gruppen, so gibt es beispielsweise eine Gruppe die Funktionen im Zellkern wahrnehmen, wie die eines Transkriptionsfaktors (Sudol et al., 2001). Die nachweisbare Lokalisierung der NG2 ICD betreffend, konnte hier gezeigt werden, dass diese unter transienten Expressionsbedingungen (NG2\_del oder NG2\_ICD) in HEK und Oli-neu Zellen, eine starke nukleäre Präsenz zeigte sowohl in ICC Färbungen als auch bei biochemischen Fraktionierungen. Allerdings war die endogene NG2 ICD in Oli-neu Zellen nicht reproduzierbar nachweisbar. War diese hier nachweisbar, dann nur in Membranfraktionen nicht aber in nukleären Fraktionen. Dies könnte mit dem permanenten Vorläuferstatus in Oli-neu Zellen zusammenhängen (Jung et al., 1995), sollte eine differenzierungsabhängige Lokalisierung der ICD stattfinden. Durchgeführte ICC

der endogenen NG2 ICD waren aufgrund der hohen Kreuzreaktivität des NG2\_cyto AK nicht eindeutig.

#### 5.4.2 Einfluss von NG2 (Fragmenten) auf die Expression von PTGDS

Das Enzym PTGDS katalysiert die Umwandlung von Prostaglandin H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>) in die neuromodulatorisch aktive Form D<sub>2</sub> (PGD<sub>2</sub>) und konnte innerhalb des unbeschädigten ZNS hauptsächlich innerhalb von Oligodendrozyten nachgewiesen werden (Urade et al., 1993). Deshalb wurde hier die Expression von PTGDS in primären OPC (pOPC) untersucht, welche sich bestätigen ließ wobei weiter von einer differenzierungsabhängigen Expression in OPC und reifen Oligodendrozyten ausgegangen werden kann.

Die Reduzierung der Proteinexpression von PTGDS innerhalb der OPC konnte für alle drei Hauptfragmente von NG2 gezeigt werden dem FL, CTF und der ICD. Da bei den beiden Fragmenten NG2 CTF und ICD aber das CTF die stärkste Reduzierung aufwies, kann davon ausgegangen werden, dass zwar die ICD Sequenz ausreicht um einen Effekt zu erzeugen allerdings die membrangebundene Form den stärkeren Effekt ausbilden kann. Widersprüchlich erscheint auch, dass sowohl der *knock-down* vom FL-NG2 als auch die Überexpression von NG2 CTF/ICD die PTGDS Protein Menge senkten. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass unterschiedliche Fragmente die PTGDS Expression durch unterschiedliche Mechanismen regulieren. Passend zu der Regulation im NG2 *knock-down*, fand sich eine entsprechende Regulation in OPC vom NG2 *-/-* (siehe unten). Neben einer geänderten Proteinexpression ist auch eine Beeinflussung der PTGDS Freisetzung denkbar. So ist PTGDS auch im CSF nachweisbar (Kim et al., 2012). Allerdings sprechen die im Folgenden diskutierten OPC mRNA Mengen, für eine Bestätigung eines Effekts auf die Expression.

Bei mittels FACS sortierten OPC des NG2 Genotypen *-/-* (aus der NG2 *-/-* Maus) konnte *in vivo* eine starke Reduzierung (~16-fach) der PTGDS mRNA gegenüber von WT Mäusen isolierten OPC nachgewiesen werden, analog zum *knock-down* von NG2 *in vitro*. Interessanterweise zeigte sich bei den ebenfalls analysierten restlichen Zellen des FACS Sorts (hauptsächlich Oligodendrozyten, Astrozyten) eine dem Genotyp entsprechende umgekehrte Anreicherung der PTGDS mRNA. Dies spricht für eine Kompensation durch einen oder mehrere Zelltypen dieser Fraktion. Dazu passend war die gesamt PTGDS Proteinmenge vom Gesamthirn in NG2 *-/-* Tieren kaum reduziert. Als Folgerung dieser Ergebnisse kann man somit von einer generellen Beeinflussung der PTGDS Expression durch das NG2 Protein sprechen. Zudem ist im Falle des NG2 *-/-* Mausmodells von einer Verschiebung der PTGDS Expression von OPC zu einem anderen Zelltypen auszugehen. Dies stellt eine ZNS weite Änderung im PTGDS Stoffwechsel dar. Die unveränderte Gesamtproteinmenge von PTGDS zwischen den Genotypen bestätigt dabei eine vollständige Kompensation des gesamt ZNS. Allerdings sind kurzfristige Unterschied durch diese Kompensation wahrscheinlich. Es liegt

daher nahe beschriebene Einflüsse von PTGDS auf das Nervensystem bzw. das Verhalten genauer zu betrachten und mit Verhaltensunterschieden der NG2 *-/-* Mauslinie zu vergleichen.

So finden sich bei einem Blick in die Literatur zahlreiche Einflüsse von PTGDS auf neurale Funktionen bzw. Verhaltensbeeinflussungen. So scheinen sich *motor activity* aber auch depressives (bipolares) Verhalten durch PTGDS bzw. PGD2 beeinflussen zu lassen (Begemann et al., 2008; Forstermann et al., 1983; Marin-Mendez et al., 2012). Darunter finden sich auch Koinzidenzen zwischen diesen Verhaltensauffälligkeiten und geänderten PTGDS Mengen im Menschen. Ein anderes Beispiel wäre der Tag/Nacht Rhythmus eines Organismus, der durch PTGDS reguliert wird welches mit einer geänderten neuronalen Aktivität des gesamten Nervensystems einhergeht (Huang et al., 2007). In humanen MS Läsionen und demyelinisierenden Tiermodellen, konnte PTGDS als eines der am stärksten hochregulierten Gene identifiziert werden (Chabas et al., 2001). Interessanterweise scheint diese Änderung nur lokal im geschädigten Gewebe innerhalb von Oligodendrozyten bzw. Astrozyten nachweisbar zu sein (Kagitani-Shimono et al., 2006). Die genaue Rolle der OPC wäre hier ein interessantes Untersuchungsobjekt.

Die *motor activity* aber auch das depressive Verhalten betreffend, lassen sich einige Verhaltensunterschiede in NG2 *-/-* Mäusen feststellen. So zeigte sich in klassischen Verhaltens Test wie dem *Forced Swim Test* (FST) oder dem *Light-Dark Test* (LD), welche depressives bzw. ängstliches Verhalten in den Versuchstiere ermitteln, Unterschiede zu den WT Tieren. Der FST, wies in der NG2 *-/-* Linie einen weniger depressiven Phänotypen aus, der LD Test einen weniger ängstlichen. Was sich in beiden Tests durch die höhere Aktivität der NG2 *-/-* Tiere erkennen ließ und mit den o.g. Verhaltensbeeinflussungen durch PTGDS bzw. PGD2 korreliert.

## 5.5 Funktion der NG2 Ektodomäne

### 5.5.1 Lokalisierung und Funktion der NG2 Ektodomäne innerhalb der ECM

Bereits in den ersten Berichten nach der Entdeckung des NG2 Proteins (Stallcup, 1977), wird die unterschiedliche Extrahierbarkeit der 290kD Form von NG2 aus zum Teil rein wasserlöslichen ZNS Fraktionen gegenüber der 300 kD FL-Proteins beschrieben (Nishiyama et al., 1995). In Übereinstimmung mit diesen Beobachtungen konnte die 290 kD Form von NG2 hier sowohl innerhalb von wässrigen Extraktionen als auch Triton Fraktionen isoliert werden, wobei das FL-Protein von 300 kD sich nur innerhalb von Triton (Detergenz) enthaltenden Fraktionen nachweisen ließ. Dabei scheint sich das Verhältnis zwischen den beschriebenen hochmolekularen Formen von NG2 etwa innerhalb von lädiertem ZNS Gewebe zu verschieben (Asher et al., 2005). Die 290 kD Form entspricht der durch  $\alpha$ -Sekretase Aktivität abgespaltenen Ektodomäne von NG2. Legt man die gleiche Isolierbarkeit der NG2 Fragmente dem Drosophila Homolog Kon-tiki zu Grunde, so konnte zudem die gespaltene Kon-tiki Ektodomäne sowie das FL-Protein mit der gleichen Methodik wie bei der Maus nachgewiesen werden. Dies lässt auf eine konservierte Ektodomänen Spaltung bzw. eine entsprechende weitere Prozessierung durch die  $\gamma$ -Sekretase bereits in Drosophila schließen. Für Notch konnte eine Prozessierung durch Kuzbanian dem ADAM10 Homolog in Invertebraten nachgewiesen werden (Pan and Rubin, 1997), welches eine entsprechende Spaltung von Kon-tiki durch Kuzbanian nahe legt, da sich bis heute kein Hinweis für mögliche andere Homologe der ADAM Familie gefunden haben.

Die NG2 Ektodomäne scheint demnach sowohl Funktionen innerhalb der ECM (wasserlösliche Form) als auch in der gebundenen Form (detergenz lösliche Form). Diese Beobachtung hatte sich bereits in den initialen Versuchen angedeutet. So lässt sich zwar ein Teil der NG2 Ektodomäne abgespalten und von einer reinen Membranfraktion innerhalb des wässrigen Überstandes nachweisen, der Großteil liegt jedoch in membrangebundener Form vor. In der Literatur findet man sowohl Nachweise über die Interaktion der NG2 Ektodomäne mit ECM Bestandteilen wie Kollagen V&VI und  $\beta$ 1 Integrin (Fukushi et al., 2004; Tillet et al., 1997), als auch Interaktionen mit Zelloberflächenproteinen wie dem PDGF- oder dem FGF-Rezeptor (Goretzki et al., 1999). Für die beiden Rezeptoren wird NG2 als Co-Rezeptor postuliert, wobei jüngste Studien zumindest für den FGF-R zeigen konnten, dass eine Interaktion der NG2 Ektodomäne für den damit verbundenen intrazellulären Signalweg ausreichend ist (Cattaruzza et al., 2012). Der Signalweg ist dabei für NG2+ Zellen beschrieben, womit dies eine Interaktion der Ektodomäne *in cis*, d.h. auf dem gleichen Zelltyp/Zelle darstellt.

In der Literatur finden sich zahlreiche Studien welche einen Einfluss der NG2 Ektodomäne auf den Neuriten Auswuchs beschreiben (Busch et al., 2010; Davies et al., 2004). Wobei wie bereits angedeutet die vermutlich erhöhten NG2 Ektodomänen Menge in lädiertem Gewebe von einigen Gruppen zum glären Narbengewebe (*glial scar*) gezählt werden (Kwok et al.,

2008). In Tiermodellen für Rückenmarksverletzungen konnte gezeigt werden, dass durch den enzymatischen Verdau von Zuckerketten (ChondroitinaseABC) der *glial scar*, ein verbesserter Neuritenauswuchs feststellbar ist (Novotna et al., 2011). Die isolierten LNS Domänen u.a. der NG2 Ektodomäne werden als Neuritenauswuchs fördernd beschrieben (Ichikawa et al., 2005), welches auf einen inhibitorischen Effekt der Zuckerketten hindeutet. Weiterhin konnte durch Injektion der NG2 Ektodomäne eine gehinderte neuronale Signalübertragung festgestellt werden, dies lässt auf eine unmittelbare Interaktion der Ektodomäne mit dem neuronalen Netzwerk schließen (Hunanyan et al., 2010).

### 5.5.2 Aktivitätsabhängige Spaltung der NG2 Ektodomäne

Hier konnte gezeigt werden, dass innerhalb von detergenten-freien ECM Extrakten von akuten hippocampalen Schnittkulturen, die NG2 Ektodomäne nachgewiesen werden kann. Wobei sich die Menge der so isolierten Ektodomäne, abhängig von der chemisch induzierten *long-term potentiation* (cLTP) verhielt. Die cLTP Stimulation wiederum führt zu einer Erhöhung der cAMP Menge (Levenson et al., 2004). Diese Erhöhung steht wiederum in direktem Zusammenhang mit der Ausprägung einer physiologischen LTP, wie es durch eine der klassischen Arbeiten von E. Kandel (Frey et al., 1993) gezeigt werden konnte. Somit kann man von einer durch den Prozess der LTP regulierten Spaltung und Freisetzung der NG2 Ektodomäne in die ECM sprechen.

Weiterhin konnte mit dem gleichen Versuchsaufbau gezeigt werden, dass diese Spaltung der NG2 Ektodomäne, ADAM10 abhängig ist, da die spezifische Hemmung dieser Protease die komplette aktivitätsabhängig induzierten Spaltung sowie einen Teil der konstitutiven Spaltung verhinderte. Somit ist ADAM10 auch *in vivo* die  $\alpha$ -Sekretase mit der größten Aktivität in Bezug auf die NG2 Ektodomäne Spaltung. Dass die ADAM10 Spaltung durch generelle neuronale Aktivität beeinflusst werden kann, konnte jüngst für das neuronale Adhäsionsprotein Neuroligin gezeigt werden (Peixoto et al., 2012; Suzuki et al., 2012) bzw. ist schon seit längerem für N-Cadherin bekannt (Tai et al., 2008).

Wie bereits erwähnt ist für die konstitutive  $\gamma$ -Sekretase Spaltung des NG2 CTF die ADAM10 Aktivität als  $\alpha$ -Sekretase obligatorisch. Somit ist die Regulation der ADAM10 Aktivität nicht nur für die ECM Menge der Ektodomäne, sondern auch für die der intrazellulären Fragmente von entscheidender Bedeutung.

Was die zelluläre Lokalisierung des gesamten NG2 Spaltungsprozesses betrifft, so erscheint es am wahrscheinlichsten, dass dieser zum Großteil an der Zellmembran von OPC stattfindet. Die Nachweisbarkeit der NG2 Ektodomäne setzt dabei eine Spaltung an der Zelloberfläche voraus. Eine Spaltung auf bzw. an anderen Zelltypen neben OPC ist zwar denkbar, allerdings unwahrscheinlich. Da hierfür kein Mechanismus bekannt ist, welcher einen Transport der Protease zum OPC oder des NG2 FL-Proteins zu einem Membrankompartiment eines anderen

Zelltypen gewährleisten könnte. Besonders unter Berücksichtigung der gespaltenen Menge und des zur Verfügung stehenden Zeitraums.

Unterstellt man somit eine proteolytische Freisetzung von NG2 an der OPC Oberfläche, so muss auch die Regulierung dieses Prozesses durch die LTP innerhalb dieses Zelltyps stattfinden. Passend dazu konnte von Ge et al. bereits gezeigt werden, dass OPC LTP *per se* auf elektrophysiologischer Ebene ausprägen können (Ge et al., 2006). Auch die Erhöhung der Expression des NG2 FL-Proteins in pOPC durch „neuronal“ Aktivität, wie sie hier gezeigt werden konnte, könnte somit die durch die Spaltung reduzierte Menge an NG2 FL-Protein erneuern.

Mechanistisch ergibt sich nun folgende Möglichkeit: Über die synaptische Innervierung von OPC durch Neurone (Bergles et al., 2000) wird durch einen entsprechendem Stimulus LTP ausgelöst (Ge et al., 2006), dieses führt zu einer Erhöhung der proteolytischen Ektodomänfreisetzung von NG2 in die ECM. Die NG2 Ektodomän kann jetzt vermehrt ihre entsprechenden Funktionen wahrnehmen (siehe oben), wobei eine völlig neue Funktion dieser im Folgenden diskutiert wird.

### 5.5.3 Einfluss der NG2 Ektodomäne auf das Neuronale Netzwerk

Für die Untersuchung eines möglichen Einflusses auf das neuronale Netzwerk steht nun zum einen die NG2 Ektodomäne zur Verfügung, deren Menge wie hier gezeigt aktivitätsabhängig reguliert ist. Außerdem weisen die LNS-G Domänen der NG2 Ektodomäne, die zum ersten Mal auf Laminen beschrieben wurden (Tisi et al., 2000), hohe Ähnlichkeiten mit Mitgliedern der Pentraxine auf (Beckmann et al., 1998), welche im ZNS in hohem Maße neuromodulatorisch aktiv sind (Chang et al., 2010). Somit liegt eine ähnliche Funktion der NG2 Ektodomäne nahe. Zudem ist das rapide Absinken der NG2 ECM Menge nach kurzfristiger cLTP induzierter Erhöhung ein starker Hinweis auf eine Bindung der Ektodomäne beispielsweise an einen Zelloberflächen Rezeptor, wodurch sie nicht mehr mit der ECM gelöst werden kann.

Zum anderen sind von OPC freigesetzte Substanzen die neuromodulatorische Funktionen aufweisen von Interesse. Als Beispiel ist hier das Enzym PTGDS bzw. PGD2 zu nennen, für welches hier eine Expression durch OPC und eine Beeinflussung der Expression durch NG2 gezeigt wurde.

In beiden Fällen, NG2 Ektodomäne sowie PTGDS, ist die NG2-EYFP *-/-* Mauslinie ein ideales Untersuchungsobjekt um Änderungen im neuronalen Netzwerk zu untersuchen, da bei dieser NG2 als Schlüsselmolekül fehlt.

Wie hier aufgeführt konnte durch die elektrophysiologischen Versuche von Dr.A. Neitz, welche aus o.g. Gründen initiiert wurden, gezeigt werden, dass in Pyramidal Zellen des somatosensorischen Cortex Layer 2/3 (Neurone) im NG2 *-/-* eine geänderte

Zusammensetzung der AMPAR an der Zelloberfläche besteht. Im Detail, weisen die WT in den gleichen Zelltypen (Pyramidal Zellen) einen linearen Verlauf bei den gemessenen Strom-Spannungskurven (I/V) auf, so wie es als charakteristisch für AMPAR mit GluR2, die typisch für diesen Typ von Neuronen sind, gezeigt wurde (Kamboj et al., 1995; Pellegrini-Giampietro, 2003). Der NG2  $-/-$  hingegen weist einen nicht linearen Verlauf der I/V Kurven bei positiven Membranpotentialen auf, dies ist wiederum als Charakteristikum für AMPAR ohne GluR2 an der Zelloberfläche beschrieben. Die Kontribution von anderen Glutamatrezeptoren wie NMDAR oder Kainate-R konnte durch entsprechende Kontrolleexperimente ausgeschlossen werden. Effekte von GABA Rezeptoren waren bei allen Versuchen durch entsprechende Hemmung bereits im Vorfeld ausgeräumt. Somit besitzt der NG2  $-/-$  auf der Oberfläche von pyramidalen Neuronen des kortikalen Layers 2/3 hauptsächlich AMPAR ohne GluR2 UE, wohingegen der WT fast ausschließlich AMPAR mit GluR2 besitzt.

Sollte dieser Effekt direkt von der NG2 Ektodomäne ausgehen, so wäre eine direkte Interaktion mit der GluR2 UE im WT denkbar. Diese wurde schon für andere Pentraxine wie Narp/NPTX2 gezeigt (O'Brien et al., 2002). Ein geeignetes Experiment um einen Zusammenhang mit der NG2 Spaltung herzustellen, ist in diesem Fall eine Hemmung der ADAM10 Spaltung von NG2 in WT Tieren um eine Angleichung an den NG2  $-/-$  Phänotyp zu untersuchen. Dies ist Gegenstand aktueller Experimente von Dr. Neitz.

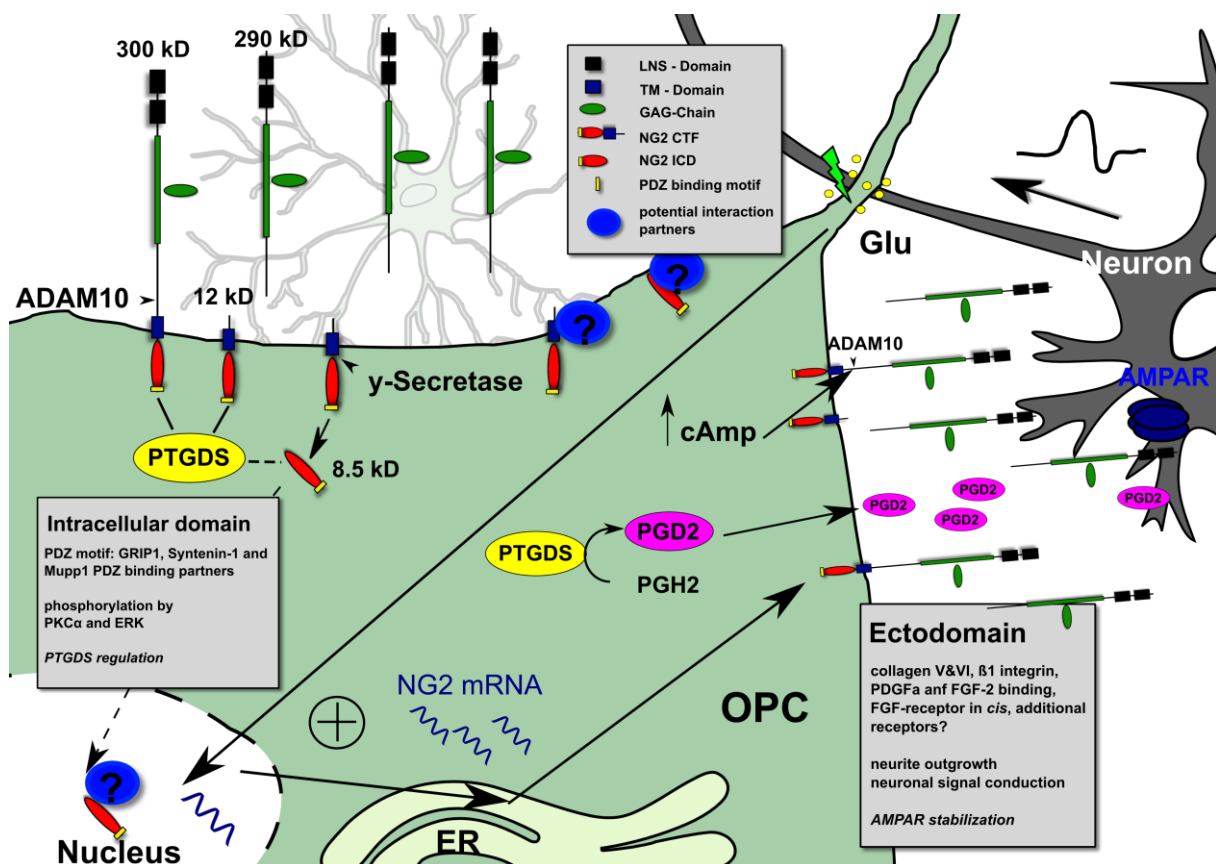


Abbildung 5.5-1 Zusammenfassung der Ergebnisse.



## 6 Zusammenfassung

Die wichtigsten im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse sind in Abbildung 5.5-1 schematisch zusammengefasst. So konnte eine für Typ-1 Membranproteine typische konstitutive Prozessierung von NG2 durch die  $\alpha$ -Sekretase, ADAM10, sowie den  $\gamma$ -Sekretase Komplex gezeigt werden. Neben der Bestätigung der bekannten Ektodomäne von 290 kD konnte ein C-terminales Fragment (CTF) von 12 kD, sowie eine intrazelluläre Domäne (ICD) von 8,5 kD nachgewiesen werden. In Zelllinien konnte eine Kernlokalisierung der NG2 ICD gezeigt werden. Als Zielgen von NG2 konnte PTGDS identifiziert werden, so waren alle NG2 Fragmente in der Lage die PTGDS Protein Menge zu beeinflussen, dieser Effekt konnte auch *in vivo* auf mRNA Ebene in OPC von NG2  $-/-$  Mäusen bestätigt werden. Dazu korrelieren Verhaltensunterschieden in NG2  $-/-$  Mäusen, welche durch andere Studien bereits als unter dem Einfluss von PTGDS bzw. PGD2 stehend, gezeigt worden sind. Es konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass das NG2 Drosophila Homolog Kon-tiki eine ähnliche Ektodomän Spaltung aufweist. Dies macht eine weitere Prozessierung durch den  $\gamma$ -Sekretase Komplex auch in diesem System wahrscheinlich.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die ADAM10 abhängige Spaltung sowie die Expression des FL-Proteins aktivitätsabhängig in OPC reguliert ist. Im Hinblick auf die Regulation durch die neuronale synaptische Innervierung der OPC stellen diese Ergebnisse die ersten zellulären Mechanismen dar, welche die physiologische Relevanz dieser Innervierung darlegen. Im Falle der erhöhten ADAM10 abhängigen Spaltung die durch systemweite Erhöhung der cAMP Mengen (cLTP) herbeigeführt wurde, ergibt sich eine zusätzliche physiologische Funktion für den in OPC beschriebenen Mechanismus der LTP. Damit steht die synaptische Innervierung der OPC für eine Regulation der NG2 Spaltung abhängig vom neuronalen Signal zur Verfügung. Wodurch somit wiederum der intrazelluläre bzw. der Signalweg der Ektodomäne beeinflusst wird. Mit einer Funktion der freigesetzten Ektodomäne, könnten hier beschriebene Modifikationen auf bestimmten Neuronen in Verbindung stehen, welche auf eine geänderte neuronale AMPAR Zusammensetzung schließen lassen.

Durch oben genannte Mechanismen werden OPC zum funktionellen Bestandteil des Neuronalen Netzwerks.

Für das Verhalten von NG2  $-/-$  OPC *in stab wound* Läsionen, konnte gezeigt werden, dass diese im lädierten Gewebe weniger stark proliferieren sowie polarisieren, was mit einer niedrigeren Gesamtzahl an OPC gegenüber den WT Mäusen einhergeht.

## 7 Ausblick

Eine wichtige Frage ist eine mögliche Signalfunktion der NG2 ICD im Zellkern. Ein Nachweis über die generelle Bindung an Chromatin, als Voraussetzung für eine Interaktion mit genomischer DNA, könnte mit einer Überlappung von fluoreszent-markierten Histonen und den NG2\_ICD Expressionskonstrukten erfolgen. Um Zielgene zu identifizieren könnte eine Chromatin IP durchgeführt werden, welche die DNA Zielsequenz eines möglichen NG2 ICD Interaktionskomplexes liefern kann. Mittels dieser Sequenz könnten daraufhin Zielpromotoren/Gene ermittelt werden und entsprechende experimentelle Nachweise auf Funktionsebene erbracht werden. *In vivo* könnte eine Überexpression der NG2 ICD in verschiedenen Tiermodellen (Maus, *D. Melanogaster*) Aufschluss über Einflüsse auf die physiologischen Funktionen der Zielzellen im Gewebe geben.

Die Rolle der NG2 Ektodomäne betreffend ist es von großem Interesse diese als direktes Signalmolekül mit neuromodulatorischen Eigenschaften zu bestätigen. Dadurch würde NG2 als *cell adhesion molecule* (CAM) auf einer Funktionsebene mit neuronalen CAM wie N-Cadherin stehen, welches aktivitätsabhängig gespalten wird, wobei die Ektodomäne AMPAR an der Zelloberfläche stabilisiert. Der Großteil der Nachweise in Bezug auf diese Funktion für NG2 konnte durch die hier beschriebenen Experimente nachgewiesen werden. Allerdings fehlt für die *bis dato* beschriebenen bzw. möglichen elektrophysiologischen neuronalen Phänotypen im NG2 *-/-* der unmittelbare Nachweis für den erwähnten direkten Effekt der NG2 Ektodomäne. Eine Spaltungsabhängigkeit des WT Phänotyps ist hier ein guter Hinweis, noch besser wäre es im NG2 *-/-* den WT Phänotyp durch eine Expression von NG2 bzw. der NG2 Ektodomäne *in vivo* wiederherzustellen. Dafür käme beispielsweise ein virales Expressionssystem oder die Zugabe aufgereinigter NG2 Ektodomänfragmente in den gemessenen Schnitten in Frage.

## 8 Anhang

### 8.1 Veröffentlichungen und Kongressbeiträge

#### Veröffentlichungen

Sakry D, Karram K, Trotter J. Synapses between NG2 glia and neurons. *J Anat.* 2011 Jul;219(1):2-7. doi: 10.1111/j.1469-7580.2011.01359.x.

Biname F, Sakry D, Dimou L, Jolivel V and Trotter J. NG2 regulates directional migration of Oligodendrocyte Precursor Cells via Rho GTPases and polarity complex proteins. *J Neurosci.* 2013 Jun 26;33(26):10858-74. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5010-12.2013.

Sakry D, Singh J, Kaiser N, Biname F, Bustos A, Endres K, Pinto S, Karram K, Altenhein B, Lutz B, Frischknecht R, Trotter J. Secretase-dependent cleavage of the glial proteoglycan NG2/Kon-tiki is activity dependent, mediates signaling and is conserved between species. In prep.

Neitz A, Marongiu D, Sakry D, Trotter J, Mittmann T. NG2 protects against madness: Deletion of NG2 alters glutamate receptor dependent synaptic plasticity. In prep.

Maus F, Sakry D, Binamé F, Karram K, Rajalingam K, Watts C, Heywood R, Krüger R, Stegmüller J, Werner H, Nave KA, Krämer-Albers EM and Trotter J. The mitochondrial protease OMI/HtrA2 binds to NG2 protecting OPC from stress-induced apoptosis. In prep.

Huang C, Sakry D, Trotter J, Schäfer M. CCL21 mediates cell response in CCI model. In prep.

## **Kongressbeiträge**

**IAK Neurobiology Symposium 2009, Mainz**, Characterisation of synaptic structures between NG2 glia and neurones, Sakry et al. (Poster)

**EuroGlia 2009, Paris**, CHARACTERISATION OF SYNAPTIC STRUCTURES BETWEEN NG2 GLIA AND NEURONES, Sakry et al. (Poster/AbstractBook)

**RMN<sup>2</sup> 2010, Oberwesel**, CHARACTERISATION OF SYNAPTIC STRUCTURES BETWEEN NG2 GLIA AND NEURONES, Sakry et al. (Poster)

**IAK Neurobiology Symposium 2011, Mainz**, Shedding and signaling of the oligodendrocyte precursor protein NG2 , Sakry and Reinhardt et al. (Poster)

**RMN<sup>2</sup> 2012, Oberwesel**, Shedding and signaling of the oligodendrocyte precursor protein NG2, Sakry and Reinhardt et al. (Poster)

**Cold Spring Harbor, Glia in Health and Disease 2012, New York**, Neuromodulatory potential of oligodendrocyte precursor cells: Role of the NG2 protein, Sakry et al. (Poster/AbstractBook)

**Myelin Meeting 2013, Kassel**, Alpha and gamma secretase dependent cleavage of the proteoglycan NG2/Kon-tiki is conserved between species and mediates signaling, Sakry et al. (Poster)

**DGZ and DfE Meeting 2013, Heidelberg**, Alpha and gamma secretase dependent cleavage of the proteoglycan NG2/Kon-tiki is conserved between species and mediates signaling, Sakry et al. (Poster/AbstractBook)

**Euro Glia 2013, Berlin**. Alpha and gamma secretase dependent cleavage of the proteoglycan NG2 is conserved between species and mediates signaling. Sakry et al. (Poster/AbstractBook)

## 8.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1-1 Mikroskope .....	20
Tabelle 3.1-2 Zentrifugen.....	20
Tabelle 3.1-3 Sonstige Geräte .....	20
Tabelle 3.1-4 Software .....	21
Tabelle 3.2-1 Kits & Marker .....	21
Tabelle 3.2-2 Primäre Antikörper .....	23
Tabelle 3.2-3 Sekundäre Antikörper .....	23
Tabelle 3.2-4 Plasmide und Oligonukleotide .....	26
Tabelle 3.2-5 PCR Primer .....	26
Tabelle 3.2-6 qRT-PCR Primer.....	27
Tabelle 3.2-7 Sequenzier Primer .....	27
Tabelle 3.2-8 siRNA .....	27
Tabelle 3.3-1 Lösungen und Medien für die Zellkultur .....	28
Tabelle 3.3-2 Lösungen und Medien für die Molekularbiologie .....	28
Tabelle 3.3-3 Lösungen für die Proteinbiochemie .....	29
Tabelle 3.3-4 Lösungen für Immunofluoreszenzfärbungen .....	29
Tabelle 4.3-1 OPC lassen sich mit hoher Effizienz aus beiden Genotypen isolieren. ....	58
Tabelle 4.3-2 Log2 Werte der mRNA Analyse aus Abbildung 4.3-3.....	60

## 8.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1-1: Zelltypen im ZNS. ....	6
Abbildung 2.2-1: Differenzierung von OPCs während der Entwicklung und im Erwachsenenalter. ....	9
Abbildung 2.3-1 Struktur des NG2 Proteins. ....	12
Abbildung 2.4-1 Prozessierung von Typ-1 Membranproteinen. A Schematische Darstellung der Prozessierung eines Typ-1 Membranproteins durch $\alpha$ - und $\gamma$ -Sekretase. B APP Prozessierung und bekannte Interaktionspartner (Quelle: Abcam).....	15
Abbildung 2.4-2 Shedding eines Typ-1 Membranproteins.....	18
Abbildung 2.4-3 Struktur der $\gamma$ -Sekretase. Die vier Membranproteine Presenilin, Aph-1 und Pen-2 sind essentieller Bestandteil des $\gamma$ -Sekretase Komplexes. (Google Images)18	18
Abbildung 3.2-1 Plasmid Karten.....	25
Abbildung 4.1-1 Überexpression von ADAM 10 und 17 reduzieren eine Form des NG2 Proteins.....	42
Abbildung 4.1-2 Pharmakologische Hemmung von ADAM 10 reduziert die NG2 Proteinmenge.....	44
Abbildung 4.1-3 Pharmakologische Hemmung der $\gamma$ -Sekretase erhöht NG2 CTF Menge. ....	45
Abbildung 4.1-4 NG2 wird sequentiell durch $\alpha$ - und $\gamma$ -Sekretase gespalten. ....	47
Abbildung 4.2-1 NG2 ICD zeigt unterschiedliche Lokalisierung.....	49
Abbildung 4.2-2 NG2 ICD weist nukleäre Färbung auf. ....	51
Abbildung 4.2-3 NG2 Ektodomäne lässt sich in Maus und Drosophila nachweisen. ....	52
Abbildung 4.3-1 NG2 Konstrukte beeinflussen die Proteinexpression. ....	55

Abbildung 4.3-2 Unterschiede bei der OPC Gesamtpopulation von WT und NG2 -/- .....	58
Abbildung 4.3-3 OPC von NG2 -/- Mäusen weisen Unterschiede bei der Genregulation auf.	59
Abbildung 4.3-4 siRNA <i>knock-down</i> von NG2 zeigt vergleichbaren Effekt auf PTGDS. ....	60
Abbildung 4.3-5 pOPC exprimieren PTGDS und Nptx2. ....	65
Abbildung 4.3-6 Verhaltensunterschiede in der NG2 -/- Maus. ....	66
Abbildung 4.4-1 cLTP induzierte proteolytische Spaltung von NG2. ....	67
Abbildung 4.4-2 Aktivitätsabhängige Expression von NG2. ....	68
Abbildung 4.4-3 Spontane Aktivität von Pyramidal Zellen in NG2 -/- Mäusen zeigt keine Unterschiede. ....	70
Abbildung 4.4-4 Induzierte Aktivität von Pyramidal Zellen zeigt in NG2 -/- Mäusen. ....	71
Abbildung 4.4-5 Pyramidal Zellen im NG2 -/- zeigen geänderte Strom Spannungskurven. ....	72
Abbildung 4.4-6 Unterschiede in den Protein Level im somatosensorischen Kortex in NG2 -/- Mäusen. ....	74
Abbildung 4.5-1 mRNA Menge im lädierten Gewebe der NG2 -/- Maus. ....	75
Abbildung 4.6-1 OPC sind in allen adulten Hirnarealen vorhanden. ....	77
Abbildung 4.6-2 OPC durchdringt das kortikale Neuronale Netzwerk. ....	79
Abbildung 4.6-3 SEM Projektion offenbart mitotischen OPC im adulten Hippocampus. ....	80
Abbildung 4.6-4 3D Volumenrender offenbart Interaktion zwischen OPC Fortsätzen und axonalem Netzwerk. ....	80
Abbildung 4.6-5 3 Kortikale Axone und OPC weisen gleiche Verteilung von präsynaptischen Markern auf. ....	81
Abbildung 4.6-6 Prä- und Postsynaptische Marker ko-lokalisieren auf kortikalem OPC. ....	83
Abbildung 4.7-1 Stab wound Läsionen im murinen somatosensorischen Cortex einer adulten NG2 -/- Maus. ....	84
Abbildung 4.7-2 Zellteilungsunterschiede im Cortex nach einer stab wound. ....	85
Abbildung 4.7-3 Morphologieunterschiede von WT OPC im unlädierten und lädiertem Cortex. ....	86
Abbildung 4.7-4 Morphologieunterschiede von WT und NG2 -/- OPC im lädierten Cortex. ....	87
Abbildung 4.7-5 Unterschiede in der Zellzahl verschiedener Zelltypen im lädierten und unlädierten Cortex. ....	88
Abbildung 4.7-6 Leichte Unterschiede bei den mitotischen Zellen im Cortex von WT und NG2 -/- Tieren. ....	89
Abbildung 4.7-7 Identifizierung der mitotischen Zellen zwischen WT und NG2 -/- Mäusen. ....	90
Abbildung 4.7-8 Identifizierung der mitotischen Zelltypen im Cortex der NG2 -/- Maus. ....	91
Abbildung 4.7-9 Zellzahlunterschiede verschiedener Zelltypen im Cortex von WT und NG2 - /- Tieren bei verschiedenen Altersgruppen. ....	92
Abbildung 4.7-10 Astrogliose und Myelinunterschiede zwischen WT und NG2 -/- Tieren. ....	93
Abbildung 5.5-1 Zusammenfassung der Ergebnisse. ....	103

## 8.4 Literaturverzeichnis

- Aguirre, A., J.L. Dupree, J.M. Mangin, and V. Gallo. 2007. A functional role for EGFR signaling in myelination and remyelination. *Nat Neurosci.* 10:990-1002.
- Aguirre, A., and V. Gallo. 2004. Postnatal neurogenesis and gliogenesis in the olfactory bulb from NG2-expressing progenitors of the subventricular zone. *J Neurosci.* 24:10530-10541.
- Allen, N.J., and B.A. Barres. 2009. Neuroscience: Glia - more than just brain glue. *Nature.* 457:675-677.
- Asai, M., C. Hattori, B. Szabo, N. Sasagawa, K. Maruyama, S. Tanuma, and S. Ishiura. 2003. Putative function of ADAM9, ADAM10, and ADAM17 as APP alpha-secretase. *Biochem Biophys Res Commun.* 301:231-235.
- Asher, R.A., D.A. Morgenstern, F. Properzi, A. Nishiyama, J.M. Levine, and J.W. Fawcett. 2005. Two separate metalloproteinase activities are responsible for the shedding and processing of the NG2 proteoglycan in vitro. *Mol Cell Neurosci.* 29:82-96.
- Barritt, D.S., M.T. Pearn, A.H. Zisch, S.S. Lee, R.T. Javier, E.B. Pasquale, and W.B. Stallcup. 2000. The multi-PDZ domain protein MUPP1 is a cytoplasmic ligand for the membrane-spanning proteoglycan NG2. *J Cell Biochem.* 79:213-224.
- Bartus, K., N.D. James, K.D. Bosch, and E.J. Bradbury. 2012. Chondroitin sulphate proteoglycans: key modulators of spinal cord and brain plasticity. *Exp Neurol.* 235:5-17.
- Beckmann, G., J. Hanke, P. Bork, and J.G. Reich. 1998. Merging extracellular domains: fold prediction for laminin G-like and amino-terminal thrombospondin-like modules based on homology to pentraxins. *J Mol Biol.* 275:725-730.
- Begemann, M., D. Sargin, M.J. Rossner, C. Bartels, F. Theis, S.P. Wichert, N. Stender, B. Fischer, S. Sperling, S. Stawicki, A. Wiedl, P. Falkai, K.A. Nave, and H. Ehrenreich. 2008. Episode-specific differential gene expression of peripheral blood mononuclear cells in rapid cycling supports novel treatment approaches. *Mol Med.* 14:546-552.
- Bergles, D.E., J.D. Roberts, P. Somogyi, and C.E. Jahr. 2000. Glutamatergic synapses on oligodendrocyte precursor cells in the hippocampus. *Nature.* 405:187-191.
- Biname, F., D. Sakry, L. Dimou, V. Jolivel, and J. Trotter. 2013. NG2 Regulates Directional Migration of Oligodendrocyte Precursor Cells via Rho GTPases and Polarity Complex Proteins. *J Neurosci.* 33:10858-10874.
- Blaumueller, C.M., H. Qi, P. Zagouras, and S. Artavanis-Tsakonas. 1997. Intracellular cleavage of Notch leads to a heterodimeric receptor on the plasma membrane. *Cell.* 90:281-291.
- Bourin, M., and M. Hascoet. 2003. The mouse light/dark box test. *Eur J Pharmacol.* 463:55-65.
- Busch, S.A., K.P. Horn, F.X. Cuascut, A.L. Hawthorne, L. Bai, R.H. Miller, and J. Silver. 2010. Adult NG2+ cells are permissive to neurite outgrowth and stabilize sensory axons during macrophage-induced axonal dieback after spinal cord injury. *J Neurosci.* 30:255-265.
- Campoli, M., S. Ferrone, and X. Wang. 2010. Functional and clinical relevance of chondroitin sulfate proteoglycan 4. *Adv Cancer Res.* 109:73-121.
- Cao, X., and T.C. Sudhof. 2001. A transcriptionally [correction of transcriptively] active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60. *Science.* 293:115-120.

- Cattaruzza, S., U. Ozerdem, M. Denzel, B. Ranscht, P. Bulian, U. Cavallaro, D. Zanocco, A. Colombatti, W.B. Stallcup, and R. Perris. 2012. Multivalent proteoglycan modulation of FGF mitogenic responses in perivascular cells. *Angiogenesis*.
- Chabas, D., S.E. Baranzini, D. Mitchell, C.C. Bernard, S.R. Rittling, D.T. Denhardt, R.A. Sobel, C. Lock, M. Karpuj, R. Pedotti, R. Heller, J.R. Oksenberg, and L. Steinman. 2001. The influence of the proinflammatory cytokine, osteopontin, on autoimmune demyelinating disease. *Science*. 294:1731-1735.
- Chang, M.C., J.M. Park, K.A. Pelkey, H.L. Grabenstatter, D. Xu, D.J. Linden, T.P. Sutula, C.J. McBain, and P.F. Worley. 2010. Narp regulates homeostatic scaling of excitatory synapses on parvalbumin-expressing interneurons. *Nat Neurosci*. 13:1090-1097.
- Chatterjee, N., J. Stegmuller, P. Schatzle, K. Karram, M. Koroll, H.B. Werner, K.A. Nave, and J. Trotter. 2008. Interaction of syntenin-1 and the NG2 proteoglycan in migratory oligodendrocyte precursor cells. *J Biol Chem*. 283:8310-8317.
- Chow, V.W., M.P. Mattson, P.C. Wong, and M. Gleichmann. 2010. An overview of APP processing enzymes and products. *Neuromolecular Med*. 12:1-12.
- Crawley, J.N. 1999. Behavioral phenotyping of transgenic and knockout mice: experimental design and evaluation of general health, sensory functions, motor abilities, and specific behavioral tests. *Brain Res*. 835:18-26.
- Cryan, J.F., and A. Holmes. 2005. The ascent of mouse: advances in modelling human depression and anxiety. *Nat Rev Drug Discov*. 4:775-790.
- Davies, J.E., X. Tang, J.W. Denning, S.J. Archibald, and S.J. Davies. 2004. Decorin suppresses neurocan, brevican, phosphacan and NG2 expression and promotes axon growth across adult rat spinal cord injuries. *Eur J Neurosci*. 19:1226-1242.
- Dawson, M.R., J.M. Levine, and R. Reynolds. 2000. NG2-expressing cells in the central nervous system: are they oligodendroglial progenitors? *J Neurosci Res*. 61:471-479.
- De Strooper, B., W. Annaert, P. Cupers, P. Saftig, K. Craessaerts, J.S. Mumm, E.H. Schroeter, V. Schrijvers, M.S. Wolfe, W.J. Ray, A. Goate, and R. Kopan. 1999. A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain. *Nature*. 398:518-522.
- Deepa, S.S., D. Carulli, C. Galtrey, K. Rhodes, J. Fukuda, T. Mikami, K. Sugahara, and J.W. Fawcett. 2006. Composition of perineuronal net extracellular matrix in rat brain: a different disaccharide composition for the net-associated proteoglycans. *J Biol Chem*. 281:17789-17800.
- Dimou, L., C. Simon, F. Kirchhoff, H. Takebayashi, and M. Gotz. 2008. Progeny of Olig2-expressing progenitors in the gray and white matter of the adult mouse cerebral cortex. *J Neurosci*. 28:10434-10442.
- Eisenmann, K.M., J.B. McCarthy, M.A. Simpson, P.J. Keely, J.L. Guan, K. Tachibana, L. Lim, E. Manser, L.T. Furcht, and J. Iida. 1999. Melanoma chondroitin sulphate proteoglycan regulates cell spreading through Cdc42, Ack-1 and p130cas. *Nat Cell Biol*. 1:507-513.
- Estrada, B., S.S. Gisselbrecht, and A.M. Michelson. 2007. The transmembrane protein Perdido interacts with Grip and integrins to mediate myotube projection and attachment in the Drosophila embryo. *Development*. 134:4469-4478.
- Etxeberria, A., J.M. Mangin, A. Aguirre, and V. Gallo. 2010. Adult-born SVZ progenitors receive transient synapses during remyelination in corpus callosum. *Nat Neurosci*. 13:287-289.
- Forstermann, U., R. Heldt, and G. Hertting. 1983. Effects of intracerebroventricular administration of prostaglandin D2 on behaviour, blood pressure and body



- temperature as compared to prostaglandins E2 and F2 alpha. *Psychopharmacology (Berl)*. 80:365-370.
- Frey, U., Y.Y. Huang, and E.R. Kandel. 1993. Effects of cAMP simulate a late stage of LTP in hippocampal CA1 neurons. *Science*. 260:1661-1664.
- Fruhbeis, C., D. Frohlich, and E.M. Kramer-Albers. 2012. Emerging roles of exosomes in neuron-glia communication. *Front Physiol*. 3:119.
- Fukushi, J., I.T. Makagiansar, and W.B. Stallcup. 2004. NG2 proteoglycan promotes endothelial cell motility and angiogenesis via engagement of galectin-3 and alpha3beta1 integrin. *Mol Biol Cell*. 15:3580-3590.
- Funfschilling, U., L.M. Supplie, D. Mahad, S. Boretius, A.S. Saab, J. Edgar, B.G. Brinkmann, C.M. Kassmann, I.D. Tzvetanova, W. Mobius, F. Diaz, D. Meijer, U. Suter, B. Hamprecht, M.W. Sereda, C.T. Moraes, J. Frahm, S. Goebbels, and K.A. Nave. 2012. Glycolytic oligodendrocytes maintain myelin and long-term axonal integrity. *Nature*. 485:517-521.
- Gallo, V., J.M. Mangin, M. Kukley, and D. Dietrich. 2008. Synapses on NG2-expressing progenitors in the brain: multiple functions? *J Physiol*. 586:3767-3781.
- Ge, W.P., X.J. Yang, Z. Zhang, H.K. Wang, W. Shen, Q.D. Deng, and S. Duan. 2006. Long-term potentiation of neuron-glia synapses mediated by Ca<sup>2+</sup>-permeable AMPA receptors. *Science*. 312:1533-1537.
- Ge, W.P., W. Zhou, Q. Luo, L.Y. Jan, and Y.N. Jan. 2009. Dividing glial cells maintain differentiated properties including complex morphology and functional synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106:328-333.
- Goretzki, L., M.A. Burg, K.A. Grako, and W.B. Stallcup. 1999. High-affinity binding of basic fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor-AA to the core protein of the NG2 proteoglycan. *J Biol Chem*. 274:16831-16837.
- Gveric, D., R. Hanemaaijer, J. Newcombe, N.A. van Lent, C.F. Sier, and M.L. Cuzner. 2001. Plasminogen activators in multiple sclerosis lesions: implications for the inflammatory response and axonal damage. *Brain*. 124:1978-1988.
- Haberlandt, C., A. Derouiche, A. Wyczynski, J. Haseleu, J. Pohle, K. Karram, J. Trotter, G. Seifert, M. Frotscher, C. Steinhauser, and R. Jabs. 2011. Gray matter NG2 cells display multiple Ca<sup>2+</sup>-signaling pathways and highly motile processes. *PLoS One*. 6:e17575.
- Hamilton, N., S. Vayro, R. Wigley, and A.M. Butt. 2010. Axons and astrocytes release ATP and glutamate to evoke calcium signals in NG2-glia. *Glia*. 58:66-79.
- Herbert, S., H. Soares, C. Zimmer, and R. Henriques. 2012. Single-molecule localization super-resolution microscopy: deeper and faster. *Microsc Microanal*. 18:1419-1429.
- Hoogenraad, C.C., I. Popa, K. Futai, E. Martinez-Sanchez, P.S. Wulf, T. van Vlijmen, B.R. Dortland, V. Oorschot, R. Govers, M. Monti, A.J. Heck, M. Sheng, J. Klumperman, H. Rehmann, D. Jaarsma, L.C. Kapitein, and P. van der Sluijs. 2010. Neuron specific Rab4 effector GRASP-1 coordinates membrane specialization and maturation of recycling endosomes. *PLoS Biol*. 8:e1000283.
- Huang, Z.L., Y. Urade, and O. Hayaishi. 2007. Prostaglandins and adenosine in the regulation of sleep and wakefulness. *Curr Opin Pharmacol*. 7:33-38.
- Hughes, E.G., S.H. Kang, M. Fukaya, and D.E. Bergles. 2013. Oligodendrocyte progenitors balance growth with self-repulsion to achieve homeostasis in the adult brain. *Nat Neurosci*.
- Hunanyan, A.S., G. Garcia-Alias, V. Alessi, J.M. Levine, J.W. Fawcett, L.M. Mendell, and V.L. Arvanian. 2010. Role of chondroitin sulfate proteoglycans in axonal conduction in Mammalian spinal cord. *J Neurosci*. 30:7761-7769.

- Ichikawa, N., S. Kasai, N. Suzuki, N. Nishi, S. Oishi, N. Fujii, Y. Kadoya, K. Hatori, Y. Mizuno, M. Nomizu, and E. Arikawa-Hirasawa. 2005. Identification of neurite outgrowth active sites on the laminin alpha4 chain G domain. *Biochemistry*. 44:5755-5762.
- Iida, J., A.M. Meijne, R.C. Spiro, E. Roos, L.T. Furcht, and J.B. McCarthy. 1995. Spreading and focal contact formation of human melanoma cells in response to the stimulation of both melanoma-associated proteoglycan (NG2) and alpha 4 beta 1 integrin. *Cancer Res*. 55:2177-2185.
- Jabs, R., T. Pivneva, K. Huttmann, A. Wyczynski, C. Nolte, H. Kettenmann, and C. Steinhauser. 2005. Synaptic transmission onto hippocampal glial cells with hGFAP promoter activity. *J Cell Sci*. 118:3791-3803.
- Jones, L.L., Y. Yamaguchi, W.B. Stallcup, and M.H. Tuszynski. 2002. NG2 is a major chondroitin sulfate proteoglycan produced after spinal cord injury and is expressed by macrophages and oligodendrocyte progenitors. *J Neurosci*. 22:2792-2803.
- Jung, M., E. Kramer, M. Grzenkowski, K. Tang, W. Blakemore, A. Aguzzi, K. Khazaie, K. Chlichlia, G. von Blankenfeld, H. Kettenmann, and et al. 1995. Lines of murine oligodendroglial precursor cells immortalized by an activated neu tyrosine kinase show distinct degrees of interaction with axons in vitro and in vivo. *Eur J Neurosci*. 7:1245-1265.
- Kagitani-Shimono, K., I. Mohri, H. Oda, K. Ozono, K. Suzuki, Y. Urade, and M. Taniike. 2006. Lipocalin-type prostaglandin D synthase (beta-trace) is upregulated in the alphaB-crystallin-positive oligodendrocytes and astrocytes in the chronic multiple sclerosis. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 32:64-73.
- Kamboj, S.K., G.T. Swanson, and S.G. Cull-Candy. 1995. Intracellular spermine confers rectification on rat calcium-permeable AMPA and kainate receptors. *J Physiol*. 486 ( Pt 2):297-303.
- Karadottir, R., N.B. Hamilton, Y. Bakiri, and D. Attwell. 2008. Spiking and nonspiking classes of oligodendrocyte precursor glia in CNS white matter. *Nat Neurosci*. 11:450-456.
- Karram, K., S. Goebbels, M. Schwab, K. Jennissen, G. Seifert, C. Steinhauser, K.A. Nave, and J. Trotter. 2008. NG2-expressing cells in the nervous system revealed by the NG2-EYFP-knockin mouse. *Genesis*. 46:743-757.
- Kettenmann, H., F. Kirchhoff, and A. Verkhratsky. 2013. Microglia: new roles for the synaptic stripper. *Neuron*. 77:10-18.
- Kim, J.H., S.K. Lee, Y.C. Yoo, N.H. Park, D.B. Park, J.S. Yoo, H.J. An, Y.M. Park, and K.G. Cho. 2012. Proteome analysis of human cerebrospinal fluid as a diagnostic biomarker in patients with meningioma. *Med Sci Monit*. 18:BR450-460.
- Kohutek, Z.A., C.G. diPierro, G.T. Redpath, and I.M. Hussaini. 2009. ADAM-10-mediated N-cadherin cleavage is protein kinase C-alpha dependent and promotes glioblastoma cell migration. *J Neurosci*. 29:4605-4615.
- Kramer, E.M., T. Koch, A. Niehaus, and J. Trotter. 1997. Oligodendrocytes direct glycosyl phosphatidylinositol-anchored proteins to the myelin sheath in glycosphingolipid-rich complexes. *J Biol Chem*. 272:8937-8945.
- Kukley, M., E. Capetillo-Zarate, and D. Dietrich. 2007. Vesicular glutamate release from axons in white matter. *Nat Neurosci*. 10:311-320.
- Kukley, M., M. Kiladze, R. Tognatta, M. Hans, D. Swandulla, J. Schramm, and D. Dietrich. 2008. Glial cells are born with synapses. *Faseb J*. 22:2957-2969.

- Kwok, J.C., F. Afshari, G. Garcia-Alias, and J.W. Fawcett. 2008. Proteoglycans in the central nervous system: plasticity, regeneration and their stimulation with chondroitinase ABC. *Restor Neurol Neurosci.* 26:131-145.
- Lahiri, D.K., G.J. Kotwal, M.R. Farlow, A. Sima, W. Kupsky, F.H. Sarkar, and K. Sambamurti. 2002. The role of the carboxyl-terminal fragments of amyloid precursor protein in Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci.* 973:334-339.
- Lammich, S., E. Kojro, R. Postina, S. Gilbert, R. Pfeiffer, M. Jasionowski, C. Haass, and F. Fahrenholz. 1999. Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:3922-3927.
- Larsen, P.H., J.E. Wells, W.B. Stallcup, G. Opdenakker, and V.W. Yong. 2003. Matrix metalloproteinase-9 facilitates remyelination in part by processing the inhibitory NG2 proteoglycan. *J Neurosci.* 23:11127-11135.
- Levenson, J.M., K.J. O'Riordan, K.D. Brown, M.A. Trinh, D.L. Molfese, and J.D. Sweatt. 2004. Regulation of histone acetylation during memory formation in the hippocampus. *J Biol Chem.* 279:40545-40559.
- Levine, J.M., and A. Nishiyama. 1996. The NG2 chondroitin sulfate proteoglycan: a multifunctional proteoglycan associated with immature cells. *Perspect Dev Neurobiol.* 3:245-259.
- Lieber, T., S. Kidd, and M.W. Young. 2002. kuzbanian-mediated cleavage of Drosophila Notch. *Genes Dev.* 16:209-221.
- Lin, S.C., and D.E. Bergles. 2004. Synaptic signaling between GABAergic interneurons and oligodendrocyte precursor cells in the hippocampus. *Nat Neurosci.* 7:24-32.
- Lin, S.C., J.H. Huck, J.D. Roberts, W.B. Macklin, P. Somogyi, and D.E. Bergles. 2005. Climbing fiber innervation of NG2-expressing glia in the mammalian cerebellum. *Neuron.* 46:773-785.
- Liu, C., J.C. Sage, M.R. Miller, R.G. Verhaak, S. Hippenmeyer, H. Vogel, O. Foreman, R.T. Bronson, A. Nishiyama, L. Luo, and H. Zong. 2011. Mosaic analysis with double markers reveals tumor cell of origin in glioma. *Cell.* 146:209-221.
- Ludwig, A., C. Hundhausen, M.H. Lambert, N. Broadway, R.C. Andrews, D.M. Bickett, M.A. Leesnitzer, and J.D. Becherer. 2005. Metalloproteinase inhibitors for the disintegrin-like metalloproteinases ADAM10 and ADAM17 that differentially block constitutive and phorbol ester-inducible shedding of cell surface molecules. *Comb Chem High Throughput Screen.* 8:161-171.
- Makagiansar, I.T., S. Williams, K. Dahlin-Huppe, J. Fukushi, T. Mustelin, and W.B. Stallcup. 2004. Phosphorylation of NG2 proteoglycan by protein kinase C-alpha regulates polarized membrane distribution and cell motility. *J Biol Chem.* 279:55262-55270.
- Makagiansar, I.T., S. Williams, T. Mustelin, and W.B. Stallcup. 2007. Differential phosphorylation of NG2 proteoglycan by ERK and PKCalpha helps balance cell proliferation and migration. *J Cell Biol.* 178:155-165.
- Malinverno, M., M. Carta, R. Epis, E. Marcello, C. Verpelli, F. Cattabeni, C. Sala, C. Mulle, M. Di Luca, and F. Gardoni. 2010. Synaptic localization and activity of ADAM10 regulate excitatory synapses through N-cadherin cleavage. *J Neurosci.* 30:16343-16355.
- Mangin, J.M., P. Li, J. Scafidi, and V. Gallo. 2012. Experience-dependent regulation of NG2 progenitors in the developing barrel cortex. *Nat Neurosci.* 15:1192-1194.
- Marin-Mendez, J.J., A. Patino-Garcia, V. Segura, F. Ortuno, M.D. Galvez, and C.A. Soutullo. 2012. Differential expression of prostaglandin D2 synthase (PTGDS) in patients with

- attention deficit-hyperactivity disorder and bipolar disorder. *J Affect Disord.* 138:479-484.
- Mikami, T., and H. Kitagawa. 2013. Biosynthesis and function of chondroitin sulfate. *Biochim Biophys Acta.* 1830:4719-4733.
- Minopoli, G., P. de Candia, A. Bonetti, R. Faraonio, N. Zambrano, and T. Russo. 2001. The beta-amyloid precursor protein functions as a cytosolic anchoring site that prevents Fe65 nuclear translocation. *J Biol Chem.* 276:6545-6550.
- Niehaus, A., J. Stegmuller, M. Diers-Fenger, and J. Trotter. 1999. Cell-surface glycoprotein of oligodendrocyte progenitors involved in migration. *J Neurosci.* 19:4948-4961.
- Nishiyama, A. 2007. Polydendrocytes: NG2 cells with many roles in development and repair of the CNS. *Neuroscientist.* 13:62-76.
- Nishiyama, A., M. Komitova, R. Suzuki, and X. Zhu. 2009. Polydendrocytes (NG2 cells): multifunctional cells with lineage plasticity. *Nat Rev Neurosci.* 10:9-22.
- Nishiyama, A., X.H. Lin, N. Giese, C.H. Heldin, and W.B. Stallcup. 1996. Interaction between NG2 proteoglycan and PDGF alpha-receptor on O2A progenitor cells is required for optimal response to PDGF. *J Neurosci Res.* 43:315-330.
- Nishiyama, A., X.H. Lin, and W.B. Stallcup. 1995. Generation of truncated forms of the NG2 proteoglycan by cell surface proteolysis. *Mol Biol Cell.* 6:1819-1832.
- Novotna, I., L. Slovinska, I. Vanicky, M. Cizek, J. Radonak, and D. Cizkova. 2011. IT delivery of ChABC modulates NG2 and promotes GAP-43 axonal regrowth after spinal cord injury. *Cell Mol Neurobiol.* 31:1129-1139.
- O'Brien, E.R., C. Howarth, and N.R. Sibson. 2013. The role of astrocytes in CNS tumors: pre-clinical models and novel imaging approaches. *Front Cell Neurosci.* 7:40.
- O'Brien, R., D. Xu, R. Mi, X. Tang, C. Hopf, and P. Worley. 2002. Synaptically targeted narp plays an essential role in the aggregation of AMPA receptors at excitatory synapses in cultured spinal neurons. *J Neurosci.* 22:4487-4498.
- Ozerdem, U., E. Monosov, and W.B. Stallcup. 2002. NG2 proteoglycan expression by pericytes in pathological microvasculature. *Microvasc Res.* 63:129-134.
- Pan, D., and G.M. Rubin. 1997. Kuzbanian controls proteolytic processing of Notch and mediates lateral inhibition during Drosophila and vertebrate neurogenesis. *Cell.* 90:271-280.
- Peixoto, R.T., P.A. Kunz, H. Kwon, A.M. Mabb, B.L. Sabatini, B.D. Philpot, and M.D. Ehlers. 2012. Transsynaptic signaling by activity-dependent cleavage of neuroligin-1. *Neuron.* 76:396-409.
- Pellegrini-Giampietro, D.E. 2003. An activity-dependent spermine-mediated mechanism that modulates glutamate transmission. *Trends Neurosci.* 26:9-11.
- Prox, J., A. Rittger, and P. Saftig. 2012. Physiological functions of the amyloid precursor protein secretases ADAM10, BACE1, and presenilin. *Exp Brain Res.* 217:331-341.
- Rajendran, L., M. Honsho, T.R. Zahn, P. Keller, K.D. Geiger, P. Verkade, and K. Simons. 2006. Alzheimer's disease beta-amyloid peptides are released in association with exosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:11172-11177.
- Richardson, W.D., K.M. Young, R.B. Tripathi, and I. McKenzie. 2011. NG2-glia as multipotent neural stem cells: fact or fantasy? *Neuron.* 70:661-673.
- Riedle, S., H. Kiefel, D. Gast, S. Bondong, S. Wolterink, P. Gutwein, and P. Altevogt. 2009. Nuclear translocation and signalling of L1-CAM in human carcinoma cells requires ADAM10 and presenilin/gamma-secretase activity. *Biochem J.* 420:391-402.
- Rooke, J., D. Pan, T. Xu, and G.M. Rubin. 1996. KUZ, a conserved metalloprotease-disintegrin protein with two roles in Drosophila neurogenesis. *Science.* 273:1227-1231.

- Rudenko, G., E. Hohenester, and Y.A. Muller. 2001. LG/LNS domains: multiple functions -- one business end? *Trends Biochem Sci.* 26:363-368.
- Saftig, P., and K. Reiss. 2011. The "A Disintegrin And Metalloproteases" ADAM10 and ADAM17: novel drug targets with therapeutic potential? *Eur J Cell Biol.* 90:527-535.
- Sakry, D., K. Karram, and J. Trotter. 2011. Synapses between NG2 glia and neurons. *J Anat.* 219:2-7.
- Schafer, D.P., E.K. Lehrman, and B. Stevens. 2013. The "quad-partite" synapse: Microglia-synapse interactions in the developing and mature CNS. *Glia.* 61:24-36.
- Schnorrer, F., I. Kalchauer, and B.J. Dickson. 2007. The transmembrane protein Kon-tiki couples to Dgrip to mediate myotube targeting in *Drosophila*. *Dev Cell.* 12:751-766.
- Simon, C., M. Gotz, and L. Dimou. 2011. Progenitors in the adult cerebral cortex: cell cycle properties and regulation by physiological stimuli and injury. *Glia.* 59:869-881.
- Stallcup, W.B. 1977. Nerve and glial-specific antigens on cloned neural cell lines. *Prog Clin Biol Res.* 15:165-178.
- Stegmuller, J., H. Werner, K.A. Nave, and J. Trotter. 2003. The proteoglycan NG2 is complexed with alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptors by the PDZ glutamate receptor interaction protein (GRIP) in glial progenitor cells. Implications for glial-neuronal signaling. *J Biol Chem.* 278:3590-3598.
- Sudol, M., K. Sliwa, and T. Russo. 2001. Functions of WW domains in the nucleus. *FEBS Lett.* 490:190-195.
- Sugiarto, S., A.I. Persson, E.G. Munoz, M. Waldhuber, C. Lamagna, N. Andor, P. Hanecker, J. Ayers-Ringler, J. Phillips, J. Siu, D.A. Lim, S. Vandenberg, W. Stallcup, M.S. Berger, G. Bergers, W.A. Weiss, and C. Petritsch. 2011. Asymmetry-defective oligodendrocyte progenitors are glioma precursors. *Cancer Cell.* 20:328-340.
- Sugimoto, Y., M. Taniguchi, T. Yagi, Y. Akagi, Y. Nojyo, and N. Tamamaki. 2001. Guidance of glial precursor cell migration by secreted cues in the developing optic nerve. *Development.* 128:3321-3330.
- Suzuki, K., Y. Hayashi, S. Nakahara, H. Kumazaki, J. Prox, K. Horiuchi, M. Zeng, S. Tanimura, Y. Nishiyama, S. Osawa, A. Sehara-Fujisawa, P. Saftig, S. Yokoshima, T. Fukuyama, N. Matsuki, R. Koyama, T. Tomita, and T. Iwatsubo. 2012. Activity-dependent proteolytic cleavage of neuroligin-1. *Neuron.* 76:410-422.
- Tai, C.Y., S.A. Kim, and E.M. Schuman. 2008. Cadherins and synaptic plasticity. *Curr Opin Cell Biol.* 20:567-575.
- Tan, A.M., W. Zhang, and J.M. Levine. 2005. NG2: a component of the glial scar that inhibits axon growth. *J Anat.* 207:717-725.
- Tillet, E., F. Ruggiero, A. Nishiyama, and W.B. Stallcup. 1997. The membrane-spanning proteoglycan NG2 binds to collagens V and VI through the central nonglobular domain of its core protein. *J Biol Chem.* 272:10769-10776.
- Tisi, D., J.F. Talts, R. Timpl, and E. Hohenester. 2000. Structure of the C-terminal laminin G-like domain pair of the laminin alpha2 chain harbouring binding sites for alpha-dystroglycan and heparin. *Embo J.* 19:1432-1440.
- Tolia, A., and B. De Strooper. 2009. Structure and function of gamma-secretase. *Semin Cell Dev Biol.* 20:211-218.
- Tomita, S., Y. Kirino, and T. Suzuki. 1998. Cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein (APP) by secretases occurs after O-glycosylation of APP in the protein secretory pathway. Identification of intracellular compartments in which APP cleavage occurs without using toxic agents that interfere with protein metabolism. *J Biol Chem.* 273:6277-6284.

- Trotter, J. 2005. NG2-positive cells in CNS function and the pathological role of antibodies against NG2 in demyelinating diseases. *J Neurol Sci.* 233:37-42.
- Trotter, J., K. Karram, and A. Nishiyama. 2010. NG2 cells: Properties, progeny and origin. *Brain Res Rev.* 63:72-82.
- Urade, Y., K. Kitahama, H. Ohishi, T. Kaneko, N. Mizuno, and O. Hayaishi. 1993. Dominant expression of mRNA for prostaglandin D synthase in leptomeninges, choroid plexus, and oligodendrocytes of the adult rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90:9070-9074.
- Wake, H., P.R. Lee, and R.D. Fields. 2011. Control of local protein synthesis and initial events in myelination by action potentials. *Science.* 333:1647-1651.
- Wang, H., R. Li, and Y. Shen. 2013. beta-Secretase: its biology as a therapeutic target in diseases. *Trends Pharmacol Sci.* 34:215-225.
- Watkins, T.A., B. Emery, S. Mulinyawe, and B.A. Barres. 2008. Distinct stages of myelination regulated by gamma-secretase and astrocytes in a rapidly myelinating CNS coculture system. *Neuron.* 60:555-569.
- Wen, C., M.M. Metzstein, and I. Greenwald. 1997. SUP-17, a *Caenorhabditis elegans* ADAM protein related to *Drosophila* KUZBANIAN, and its role in LIN-12/NOTCH signalling. *Development.* 124:4759-4767.
- Zhu, X., D.E. Bergles, and A. Nishiyama. 2008. NG2 cells generate both oligodendrocytes and gray matter astrocytes. *Development.* 135:145-157.
- Ziskin, J.L., A. Nishiyama, M. Rubio, M. Fukaya, and D.E. Bergles. 2007. Vesicular release of glutamate from unmyelinated axons in white matter. *Nat Neurosci.* 10:321-330.
- Zolkiewska, A. 2008. ADAM proteases: ligand processing and modulation of the Notch pathway. *Cell Mol Life Sci.* 65:2056-2068.