

**Fyn-vermittelte Translationskontrolle
und neue Funktion von MOB1
in Oligodendrozyten**

Dissertation
zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften

Am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg- Universität Mainz

Isabelle Schäfer

geboren am 23. November 1985 in Bensheim

Mainz, Februar 2016

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatterin:

Tag der mündlichen Prüfung: 24.03.2016

1 Inhaltsverzeichnis

1	INHALTSVERZEICHNIS	2
2	EINLEITUNG	7
2.1	DAS NERVENSYSTEM	7
2.1.1	Zelltypen des ZNS	8
2.1.1.1	Neurone	9
2.1.1.2	Gliazellen	10
2.1.1.2.1	Mikroglia	11
2.1.1.2.2	Makroglia	11
2.1.1.2.2.1	Astrozyten	11
2.1.1.2.2.2	NG2 positive Zellen	12
2.1.1.2.2.3	Oligodendrozyten und Schwann- Zellen	12
2.2	ZNS MYELINISIERUNG	13
2.2.1	Entwicklung von Oligodendrozyten	13
2.2.2	Aufbau und Funktion der Myelinmembran	17
2.2.3	Myelinisierungsproteine und – Lipide	21
2.2.3.1	Myelin basisches Protein (MBP).....	22
2.2.3.2	Myelin- assoziiertes Oligodendrozyten basisches Protein (MOBP).....	24
2.3	MRNA TRANSPORT IN OLIGODENDROZYTEN	26
2.3.1	A2- Signalweg.....	28
2.3.2	Aktivierung der Translation durch die Src- Kinase Fyn	31
2.3.2.1	Struktur der Fyn- Kinase	31
2.3.2.2	Aktivierung der Fyn- Kinase	32
2.3.2.3	Rolle der Fyn- Kinase in Oligodendrozyten	33
2.4	ZIELSETZUNG	35
3	MATERIAL UND METHODE	36
3.1	GERÄTE, REAGENZIEN UND MATERIALIEN	36
3.1.1	Geräte.....	36
3.1.2	Reagenzien.....	38
3.1.3	Materialien	39
3.2	LÖSUNGEN, PUFFER UND MEDIEN.....	39
3.3	ANTIKÖRPER	41
3.3.1	Primärantikörper	41
3.3.1.1	Gewinnung polyklonaler Antikörper gegen ein synthetisches Peptid.....	41
3.3.2	Sekundärantikörper	42
3.4	PLASMIDE, PRIMER, SIRNA	43
3.5	RNA- ANALYSE	46

3.5.1	RNA- Extraktion	46
3.5.1.1	Phenol- Chloroform Extraktion	46
3.5.1.2	miRNeasy Mini Kit (Qiagen)	46
3.5.2	Reverse Transkription der mRNA.....	47
3.6	DNA- ANALYSE	47
3.6.1	DNA- Extraktion	47
3.6.1.1	Lyse von Schwanzbiopsien	47
3.6.1.2	Extraktion viraler DNA zur Titerbestimmung.....	47
3.6.2	Polymerase- Ketten- Reaktion (PCR).....	48
3.6.2.1	PCR auf Gesamthirn- cDNA	48
3.6.2.1.1	Herstellung der ffluziMOBP-3'UTR Reporterkonstrukte.....	48
3.6.2.1.2	Herstellung der MOBP- ORF Expressionsvektoren	48
3.6.2.2	PCR auf ein Plasmid.....	49
3.6.2.2.1	Herstellung der mbpMOBP- ORF Expressionsvektoren	49
3.6.2.2.2	Zielgerichtete Mutagenese.....	50
3.6.2.3	Genotypisierung	51
3.6.3	Realtime- PCR.....	52
3.6.3.1	Relative Quantifizierung nach der $\Delta\Delta C_t$ - Methode	53
3.6.3.1.1	Auswertung der qPCR über Agarose-Gelelektrophorese.....	54
3.6.3.2	Titerbestimmung viraler DNA: relative Quantifizierung mittels Standardkurve.....	54
3.6.4	Herstellung eines Expressionsvektors	54
3.6.4.1	ffluziMOBP 3'UTR- Reporterkonstrukte.....	54
3.6.4.2	MOBP-ORF Expressionsvektoren.....	55
3.6.4.3	mbpMOBP-ORF Expressionsvektoren.....	55
3.6.4.4	DNA- Restriktionsverdau	55
3.6.4.5	Agarose- Gelelektrophorese	56
3.6.4.5.1	Auftrennung der DNA- Fragmente.....	56
3.6.4.5.2	DNA- Extraktion aus einem Agarose- Gel	56
3.6.4.6	DNA- Aufreinigung der PCR- Produkte	56
3.6.4.7	Dephosphorylierung des Vektors	56
3.6.4.8	DNA- Ligation	57
3.6.4.9	Kompetente Bakterien und Transformation.....	57
3.6.4.9.1	Kompetente Bakterien und Transformation: Zur Herstellung der ffluziMOBP3'UTR Reporterkonstrukte und MOBP-ORF Expressionsvektoren	57
3.6.4.9.2	Kompetente Bakterien und Transformation: Zur Herstellung des mutagenen ffluziMOBP99mut Vektors	57
3.6.4.10	Plasmid- Präparation aus Bakterienzellen	58
3.6.4.10.1	Mini- Präparation.....	58
3.6.4.10.2	Maxi- Präparation.....	58
3.7	ZELLKULTUR.....	59
3.7.1	Kultivierung von Oli- <i>neu</i> Zellen.....	59
3.7.2	Präparation und Kultivierung von primären Oligodendrozyten.....	59

3.7.3	Bestimmung der Zellzahl pro Milliliter	60
3.7.4	Präparation und Kultivierung muriner kortikaler Hirnschnitte	60
3.8	TRANSFEKTION UND TRANSDUKTION	61
3.8.1	Plasmid- Transfektion in Oli- <i>neu</i> Zellen	61
3.8.2	siRNA- Transfektion in primären murinen Oligodendrozyten	61
3.8.2.1	MOBP siRNA	61
3.8.2.1.1	fluorimetrischer TUNEL Versuch	62
3.8.2.2	Fyn siRNA.....	63
3.8.3	AAV- Transduktion.....	63
3.8.3.1	AAV-Transduktion in primären murinen Oligodendrozyten.....	63
3.8.3.2	AAV Transduktion in murinen kortikalen Hirnschnitten	64
3.8.4	Inhibition der proteasomalen Degradation	64
3.9	PROTEIN- ANALYSE.....	64
3.9.1	Herstellung von Lysaten	64
3.9.1.1	Lysate aus Oli- <i>neu</i> Zellen und murinen primären Oligodendrozyten	64
3.9.1.1.1	Lyse primärer Oligodendrozyten zur Erstellung eines Polysomenprofils	65
3.9.1.2	Lysate aus murinen kortikalen Hirnschnitten	65
3.9.1.3	Lysate aus dem murinen <i>wildtyp</i> oder <i>shiverer</i> Gesamthirn	65
3.9.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	66
3.9.3	SDS PAGE	66
3.9.4	Western Blot	66
3.9.5	Immunpräzipitation aus primären murinen Oligodendrozyten.....	67
3.9.6	Immunzytochemie, Mikroskopie und Bildanalyse.....	67
3.9.6.1	Immunzytochemie in Oli- <i>neu</i> Zellen und primären Oligodendrozyten	67
3.9.6.2	verwendete Mikroskope	68
3.9.6.3	Fiji Software zur Bildanalyse	68
3.9.7	<i>In vitro</i> Assay zur Bestimmung translationeller Regulation: Luziferase- Assay	69
3.9.8	Erstellung eines Polysomenprofils zur Überprüfung translationeller Aktivität in differenzierenden Oligodendrozyten	70
4	ERGEBNISSE.....	71
4.1	EXPRESSION UND TRANSLATIONELLE REGULATION VON MOBP IN OLIGODENDROZYTEN	71
4.1.1	MOBP Expression in Oligodendrozyten	71
4.1.1.1	Der Startpunkt der <i>Mobp</i> mRNA Expression und Proteinsynthese differiert in primären Oligodendrozyten	71
4.1.1.2	MOBP kann im Zytoplasma und in den primären Zellfortsätzen muriner Oligodendrozyten nachgewiesen werden	74
4.1.2	Translationelle Regulation von MOBP in Oligodendrozyten	75
4.1.2.1	<i>Mobp</i> mRNA unterliegt einer translationellen Repression in den Anfangsstadien der Oligodendrozytendifferenzierung	75
4.1.2.1.1	<i>Mobp</i> mRNA und hnRNP A2 interagieren in primären Oligodendrozyten	76

4.1.2.1.2	MOBP Protein wird nicht über proteasomale Degradation in frühen Differenzierungsstadien primärer Oligodendrozyten abgebaut.....	78
4.1.2.1.3	Mobp mRNA- Polysomen Assoziation in differenzierenden Oligodendrozyten	79
4.1.2.2	Fyn- vermittelte translationelle Regulation von MOBP	80
4.1.2.2.1	Abhängigkeit der MOBP Proteinmenge vom Aktivitätszustand der Fyn- Kinase	80
4.1.2.2.1.1	Fyn- Kinase Knockdown.....	81
4.1.2.2.1.2	Fyn- Kinase Inhibition.....	83
4.1.2.2.1.3	Fyn- Kinase Überexpression.....	86
4.1.2.2.2	A2RE- abhängige translationelle Regulation der ffluziMOBP-3'UTR Reporterkonstrukte durch Fyn	89
4.1.2.2.2.1	Generierte ffluziMOBP-3'UTR Reporterkonstrukte	89
4.1.2.2.2.2	Luziferase Assay	89
4.2	AUSWIRKUNG ALTERIERENDER MOBP MENGEN AUF DIE OLIGODENDROGLIALE MORPHOLOGIE .	94
4.2.1	Überprüfung des MOBP Knockdown.....	94
4.2.2	Überprüfung der MOBP Überexpression	96
4.2.2.1	Überprüfung der MOBP Überexpression in murinen kortikalen Hirnschnitten.....	97
4.2.3	Differenzierungseffekt von MOBP auf oligodendrogliale Zellen.....	98
4.2.3.1	Alterierende MOBP Mengen beeinflussen die Zelloberfläche primärer <i>wildtyp</i> Oligodendrozyten.....	98
4.2.3.2	Erhöhte MOBP Mengen resultieren in der gesteigerten Formierung Myelin-ähnlicher Membranen und in einer gesteigerten Fortsatzverzweigung in Oligodendrozyten	100
4.2.3.3	Erhöhte MOBP Proteinmengen induzieren eine Differenzierung in der oligodendroglialen Zelllinie <i>Oli-neu</i>	105
4.2.4	Der Differenzierungseffekt von MOBP wird nicht durch eine Interaktion der beiden basischen Myelinproteine vermittelt	108
4.2.5	Potentieller Zytoskelett- vermittelter Wirkmechanismus von MOBP auf die oligodendrogliale Morphologie.....	112
5	DISKUSSION.....	116
5.1	FYN- VERMITTELTE TRANSLATIONELLE REGULATION VON A2RE ENTHALTENDEN <i>MOBP</i> MRNAS	116
5.2	MOBP UND DESSEN FUNKTION IN DER OLIGODENDROGLIALEN MORPHOLOGISCHEN DIFFERENZIERUNG.....	120
5.3	AUSBLICK	125
6	ZUSAMMENFASSUNG	130
7	SUMMARY.....	131
8	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	132
9	REFERENZEN.....	134
10	DANKSAGUNG	149

11 ERKLÄRUNG	150
11.1 EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG.....	150
12 LEBENSLAUF	151
12.1 PERSÖNLICHE DATEN	151
12.2 BILDUNGSWEG.....	151
12.3 PRÄSENTATIONEN.....	152
12.4 AUSZEICHNUNGEN	152
12.5 PUBLIKATIONEN	153

2 Einleitung

2.1 Das Nervensystem

Das Nervensystem der Vertebraten und höheren Invertebraten lässt sich in zwei Abschnitte unterteilen, welche man als zentrales Nervensystem (ZNS) und peripheres Nervensystem (PNS) bezeichnet.

Das PNS kann entsprechend seiner Funktion weiter unterteilt werden. Das somatische Nervensystem setzt sich aus den sensorischen und motorischen Nerven zusammen und ist somit in der Lage bewusst Reize wahrzunehmen und darauf zu reagieren. Das vegetative Nervensystem dagegen, entzieht sich der unmittelbaren Kontrolle und wird daher auch als autonomes Nervensystem, was sich aus Parasympathikus, Sympathikus und dem enterischen Nervensystem zusammensetzt, bezeichnet.

Auch das ZNS lässt sich in zwei Bestandteile untergliedern. Es setzt sich zum einen aus dem Gehirn und zum anderen aus dem Rückenmark zusammen.

Das Gehirn eines erwachsenen Menschen hat ein mittleres Gewicht von 1350g und füllt, umgeben von den Hirnhäuten, die knöcherne Schädelkapsel aus. Nach entwicklungsgeschichtlichen Gesichtspunkten können die nachfolgend aufgeführten Hirnabschnitte unterschieden werden. Das *Rhombencephalon* (Rautenhirn) mit verlängertem Mark (*Medulla oblongata*), Brücke (*Pons*) und Kleinhirn (*Cerebellum*), das *Mesencephalon* (Mittelhirn), sowie das *Prosencephalon* (Vorderhirn) mit Zwischenhirn (*Diencephalon*) und Endhirn (*Telencephalon*) (Mutschler et al., 2007).

Das Rückenmark (*Medulla spinalis*) des erwachsenen Menschen ist ein ca. 40-45cm langer Strang aus Nervengewebe (Mutschler et al., 2007). Es besteht aus der zentral liegenden schmetterlingsförmigen grauen Substanz (*Substantia grisea*), welche hauptsächlich aus Nervenzellkörpern mit ihren Zellkernen besteht, und der weißen Substanz (*Substantia alba*), in welcher die Nervenfasern, sowie die auf- und absteigenden Leitungsbahnen (afferente- und efferente Axone), verlaufen. Das Rückenmark fungiert als eine Art Vermittler zwischen dem zuvor beschriebenen Gehirn und dem PNS. Zu seinen Aufgaben zählt die Übertragung sensorischer Informationen aus dem PNS zum Gehirn, aber auch die Übertragung aus dem Gehirn stammender motorischer Informationen zu den entsprechenden Effektororganen, wie

Muskeln oder Drüsen. Afferente sensorische Nervenfasern ziehen hierbei durch die Hinterwurzeln zu den sensorischen Neuronen im Hinterhorn der grauen Substanz, wohingegen die efferenten motorischen Nervenfasern von den Motoneuronen im Vorderhorn der grauen Substanz durch die Vorderwurzeln zur Skelettmuskulatur verlaufen (Mutschler et al., 2007).

Zusammen funktionieren ZNS und PNS, indem aus der Umwelt aufgenommene Reize als sensorische Information über afferente Nervenfasern zum Gehirn geleitet und dort integriert werden, um schließlich eine adäquate motorische Reaktion über die efferenten Nervenfasern an den Effektororganen ausüben zu können. Das Gehirn ist somit in der Lage hoch differenziert verschiedene Sinneseindrücke zu verarbeiten sowie komplexe Verhaltensweisen zu koordinieren und stellt somit den Hauptintegrationsort komplexer Informationen dar.

2.1.1 Zelltypen des ZNS

Neurone und Gliazellen stellen die zwei Zelltypen des ZNS dar. Die Gliazellen lassen sich wiederum in Mikroglia und Makroglia untergliedern. In nachfolgender Abbildung 1 sind die Zelltypen des ZNS schematisch dargestellt und werden in den nachfolgenden Abschnitten 2.1.1.1 und 2.1.1.2 im Detail beschrieben.

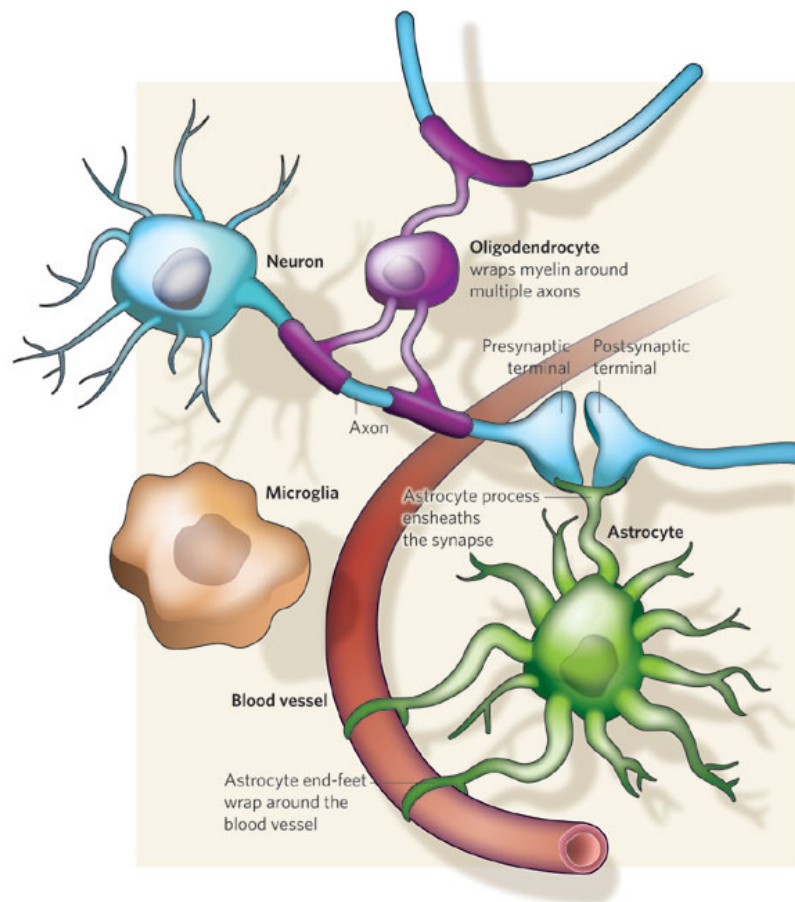


Abbildung 1: Zelltypen des zentralen Nervensystems. Verschiedene Gliazellen interagieren mit Neuronen (blau) und lagern sich um Blutgefäße (rot). Oligodendrozyten (lila) umwickeln Axone, um die neuronale Transmission zu beschleunigen. Astrozyten (grün) stehen mit Synapsen und Blutgefäßen in Kontakt. Mikroglia (braun) schützen das Gehirn vor Schäden und Infektionen. (Abbildung modifiziert nach (Allen and Barres, 2009)). Details siehe Text.

Neurone und die glialen Zellen des ZNS teilen den gleichen Ursprung, denn sie werden alle aus Vorläuferzellen, die sich aus dem Neuroektoderm ableiten lassen, gebildet (Allen and Barres, 2009).

2.1.1.1 Neurone

Neurone zeichnen sich dadurch aus, dass sie elektrische Signale schnell entlang eines gerichteten Membranpotentials über weite Strecken leiten können. Sie sind in Netzwerken organisiert und in der Lage über spezialisierte interzelluläre Kontakt- und Umschaltstellen, den sogenannten Synapsen, zu kommunizieren. Das menschliche Gehirn besitzt ca. 86 Milliarden Neurone, wobei jedes dieser Neurone in der Lage ist im Mittel 10^3 synaptische Kontakte zu anderen Neuronen auszubilden, wodurch schließlich ein sehr komplexes Netzwerk elektrisch erregbarer Zellen entsteht (Azevedo et al., 2009). Die Übertragung

neuronaler Signale setzt sich aus der Weiterleitung eines Aktionspotentials entlang des axonalen Fortsatzes bis hin zur präsynaptischen Endigung und der darauffolgenden Depolarisation der Kollateralen mit einhergehender Freisetzung neuronaler Transmitter zusammen. Die Bindung freigesetzter Neurotransmitter an den postsynaptischen Rezeptoren eines weiteren Neurons resultiert schließlich in der Depolarisation des zweiten Neurons zur Weiterleitung des Signals (Allen and Barres, 2009). Anhand ihrer Funktion lassen sich Neurone in sensorische-, Moto- und Interneurone gliedern. Der grundlegende Aufbau ist allerdings gleichartig.

Ein Neuron (siehe Abbildung 1, in blau visualisiert) lässt sich generell in drei Abschnitte unterteilen. Es besteht aus einem Zellkörper (Soma/ Perikaryon), den Dendriten und dem Axon. Das Perikaryon umfasst den Zellkern, das Endoplasmatische Retikulum (ER) und die übrigen Organellen der Zelle. Die Bezeichnung Dendrit lässt sich aus dem Griechischen *dendron* für „Baum“ ableiten, was auf ihre Gestalt schließen lässt. Je nach Nervenzelle können die Dendriten unverzweigt oder baumartig verästelt aufgebaut sein. Die meist kurzen, zahlreichen Dendriten treten über die zuvor erwähnten Synapsen mit anderen Neuronen in Verbindung und leiten die Eingangssignale, die sie über die postsynaptische Membran aufgenommen haben, zum Perikaryon. Vom Perikaryon einer Nervenzelle geht ein weiterer Typ von Zellausläufern ab, das Axon, welches sich am Ende in so genannte Kollateralen aufzweigt. Hier werden schließlich die Informationen, welche vom Perikaryon stammen, über die präsynaptische Endigung auf weitere Neurone übertragen. Die Leitungsgeschwindigkeit ist hierbei abhängig vom Durchmesser des leitenden Axons. Je größer der Axondurchmesser eines unmyelinisierten Axons ist, desto schneller ist die Leitungsgeschwindigkeit des Reizes (Hartline and Colman, 2007).

Das Neuron stellt somit als spezialisierte, signalübertragende Zelle die funktionelle Grundeinheit des Gehirns dar.

2.1.1.2 Gliazellen

Der Begriff der Gliazelle wurde Mitte des 19. Jahrhunderts von Rudolf Virchow geprägt und leitet sich von dem griechischen Wort *glia* für „Leim“ ab, da man diesem Zelltyp eine reine Stütz- und Haltefunktion zwischen den Nervenzellen zuschrieb. Nach heutigen Erkenntnissen üben die Gliazellen allerdings nicht nur eine Stützfunktion aus, vielmehr arbeiten die Zelltypen des ZNS eng zusammen. Zum einen umkleiden Gliazellen Synapsen

(tripartite Synapse) und Axone, beseitigen Zelltrümmer sowie Fremdpartikel. Zum anderen versorgen Gliazellen Neurone mit Nährstoffen und sind an der Aufrechterhaltung des für die Aktivität der Neurone erforderlichen Ionenmilieus beteiligt. Somit sind Gliazellen auch maßgeblich in Mechanismen zur Aufrechterhaltung der Homöostase im Gehirn involviert (Allen and Barres, 2009).

Bei den Säugetieren sind die Gliazellen hinsichtlich ihrer Größe in Mikroglia und Makroglia klassifiziert, auf welche in den folgenden Abschnitten eingegangen werden soll.

2.1.1.2.1 Mikroglia

Mikroglia (siehe Abbildung 1, in braun visualisiert) stellen die Immunzellen des Nervensystems dar. Sie schützen das Gehirn vor Schäden sowie Infektionen und sorgen durch Bildung sowie Abgabe proinflammatorischer Faktoren für die Entfernung und Verwertung vorliegender Zelltrümmer. Zudem wird ihnen eine Funktion in der Umgestaltung bereits ausgebildeter Synapsen im Zuge der Entwicklung zugeschrieben (Allen and Barres, 2009; Paolicelli et al., 2011).

2.1.1.2.2 Makroglia

Die Makroglia setzen sich wiederum aus Astrozyten, NG2 positiven-Zellen und den Oligodendrozyten (und Schwann- Zellen im PNS) zusammen.

2.1.1.2.2.1 Astrozyten

Astrozyten (siehe Abbildung 1, in grün visualisiert) verdanken ihren Namen ihrer sternartigen Form. Sie sind für die Aufrechterhaltung der Homöostase im Gehirn verantwortlich, indem sie Neurone mit Energie und Substraten für die Neurotransmission versorgen. Dabei fungieren sie als so genannte physikalische Barriere zwischen den synaptischen Verbindungen zweier benachbarter Neurone und kontrollieren die extrazelluläre Neurotransmitterkonzentration, wodurch eine diskrete und präzise Kodierung synaptischer Signale gewährleistet wird (tripartite Synapse) (Miller, 2002). Obwohl Astrozyten zu dem Typ Gliazellen zählen, die spannungsabhängige Ionenkanäle in ihren Zellmembranen besitzen, sind sie nicht in der Lage Aktionspotentiale zu generieren. Vielmehr liefern sie einen entscheidenden Beitrag zur Regulation der Kalium-Ionen Konzentration und des pH-Wertes im neuronalen extrazellulären Raum, indem ihre Membran eine hohe Permeabilität für K^+ -Ionen aufweist.

Ein rascher Anstieg dieser Ionen im Zuge neuronaler Aktivität kann vermieden werden, da die extrazelluläre Aufnahme und *gap junction* vermittelte Umverteilung der Kalium-Ionen zwischen benachbarten Astrozyten möglich ist. Sie gewährleisten zudem den direkten Austausch von Nährstoffen, wie Glukose und Sauerstoff, zwischen Blutgefäß und ZNS, was in Abbildung 1 durch die Ummantelung des Blutgefäßes durch einen Astrozyten schematisch dargestellt ist (Ballabh et al., 2004). Um eine ungerichtete Diffusion von Stoffen in die Hirnareale zu vermeiden, sind die Blutkapillaren ummantelnden Perizyten für die Bildung der Blut-Hirn-Schranke essentiell (Obermeier et al., 2013). Da Astrozyten nur in Bereichen der Ranvier'schen Schnürringe in Kontakt mit den axonalen Segmenten treten, könnten die kleinen Stoffwechselprodukte über *gap junction* vermittelte Kopplung der Astrozyten und Oligodendrozyten von der Bluthirnschranke hin zum Myelin transportiert werden, was in einer Konditionierung des extrazellulären Milieus der myelinisierten Axone resultiert (Nave, 2010a).

2.1.1.2.2.2 NG2 positive Zellen

In den letzten Jahren neurobiologischer Forschung, konnte ein weiterer glialer Zelltyp des zentralen Nervensystems identifiziert werden, welche als NG2- positive Zellen bekannt sind. Den zunächst als Oligodendrozytenvorläuferzellen deklarierten Zellen wurde nun eine wichtige Funktion in der Aufrechterhaltung synaptischer Kontakte zugeschrieben. Daher kann eine Integration in das neuronale Netzwerk vermutet werden (Nishiyama et al., 2009; Sakry et al., 2011).

2.1.1.2.2.3 Oligodendrozyten und Schwann- Zellen

Oligodendrozyten (siehe Abbildung 1, in lila visualisiert) und Schwann-Zellen sind bei den Vertebraten essentiell für die schnelle Kommunikation zwischen Neuronen und ihren Zielorganen. Oligodendrozyten sind die myelinisierenden Zellen des ZNS, wohingegen die Schwann-Zellen die myelinisierenden Zellen des PNS darstellen. Beide jedoch produzieren eine lipidreiche Membran, welche als Myelin bezeichnet wird und der Isolierung von Nervenzellen dient. Ein einzelner Oligodendrozyt kann bis zu einhundert axonale Segmente myelinisieren (Bjartmar et al., 1994), wohingegen eine Schwann-Zelle immer nur ein Axon umhüllt (Salzer, 2003).

Die Entwicklung der Oligodendrozyten bis hin zum Stadium der reifen myelinisierenden Zelle, der Aufbau der Myelinmembran sowie deren spezifische Zusammensetzung an

Proteinen und Lipiden werden in den nachfolgenden Abschnitten 2.2.1, 2.2.2, 2.2.3 im Detail beschrieben.

2.2 ZNS Myelinisierung

2.2.1 Entwicklung von Oligodendrozyten

Die Entstehung von Oligodendrozyten wird mit der Bildung von Oligodendrozytenvorläuferzellen (*oligodendrocyte precursor cells*, OPC) aus multipotenten neuronalen Stammzellen des Neuralrohrs in den dorsalen sowie ventralen Arealen des Gehirns und des Rückenmarks eingeleitet (Cai et al., 2005). Die Generierung der OPCs erfolgt im Rückenmark und im Großhirn zunächst in den ventralen Arealen (Cai et al., 2005; Kessarlis et al., 2006; Lu et al., 2000; Olivier et al., 2001; Pringle et al., 1996; Rowitch and Kriegstein, 2010; Spassky et al., 2002) und ist von einer darauffolgenden Migration aus den ventralen sowie dorsalen Bereichen in unterschiedliche Hirnregionen gekennzeichnet, wo sie schließlich zu reifen myelinisierenden Oligodendrozyten differenzieren (Richardson et al., 2006).

Beide Faktoren, die Bildung sowie die Migration oligodendroglialer Vorläuferzellen, werden von einer Vielzahl extrazellulärer und intrazellulärer Signale reguliert. Anhand verschiedener zell- und entwicklungspezifischer Marker können die unterschiedlichen Differenzierungsgrade im Laufe der oligodendroglialen Entwicklung, begonnen bei der multipotenten neuronalen Stammzelle bis hin zu den reifen Oligodendrozyten, nachverfolgt werden. Die Expressionszeitpunkte der spezifischen Lipide und Proteine im Zuge der verschiedenen Differenzierungsgrade sind in der nachfolgenden Abbildung 2 zusammengefasst.

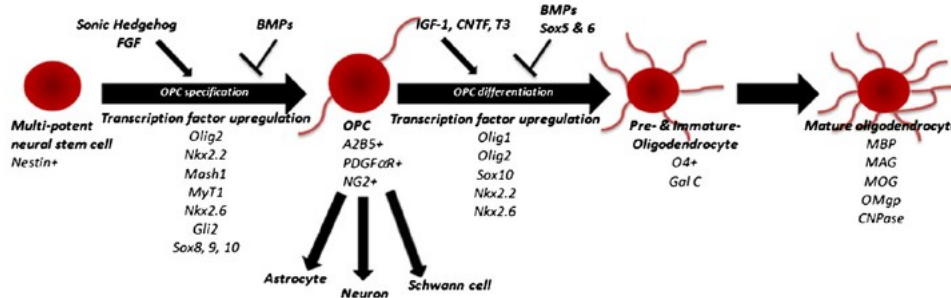


Abbildung 2: Die Stadien der Oligodendrozytendifferenzierung. Die Entwicklung von Oligodendrozyten beginnt mit einer multipotenten neuronalen Stammzelle. Die Differenzierung zur migrierenden sowie proliferierenden Oligodendrozytenvorläuferzelle und letztlich hin zum reifen myelinisierenden Oligodendrozyten wird durch eine Reihe von Signalkaskaden, Transkriptionsfaktoren und weitem intrinsischen sowie extrinsischen Signalen reguliert. Diese zell- und entwicklungspezifischen Moleküle dienen als Marker der Oligodendrozytenreifung (modifiziert nach (Miron et al., 2010)). Details siehe Text.

Anhand der Abbildung 2 wird deutlich, dass die Entwicklung oligodendroglialer Zellen einer präzisen zeitlichen Regulation unterliegt. Dabei hemmen Signale, die die Differenzierung der Zellen fördern, in der Regel gleichzeitig die Proliferation und umgekehrt hemmen Signale, die die Proliferation fördern schließlich die Differenzierung (Wang et al., 2007).

Die multipotenten neuronalen Stammzellen können sich durch Einwirkung der Morphogene Sonic Hedgehog (SHH) und des Fibroblasten- Wachstumsfaktor (*fibroblast growth factor*, FGF) in Oligodendrozytenvorläuferzellen spezifizieren. Die Transkriptionsfaktoren Olig2, Nkx2.2, Mash1, MyT1, Nkx2.6, Gli2 und Sox8/9/10 sind ebenfalls in die Spezifizierung hin zu OPCs involviert (Miron et al., 2010). SHH scheint eine entscheidende Rolle bei der Bildung von OPCs in den ventralen Regionen zu spielen. Dessen Sezernierung vom Notochord und Aktivierung, durch Bindung an den Notch1-Rezeptor, resultiert beispielsweise in der Bildung des zuvor erwähnten Transkriptionsfaktors Olig2, welcher schließlich ausschlaggebend an der Generation oligodendroglialer Vorläuferzellen in den ventralen Arealen beteiligt ist (Orentas et al., 1999; Pringle et al., 1996). Um zu diesem Zeitpunkt der embryonalen Entwicklung die durch SHH induzierten Effekte in den dorsal gelegenen Arealen zu antagonisieren, werden das Knochenmorphogenetische- Protein (*bone morphogenic protein*, BMP) sowie Wnt/ β Caterin exprimiert, was ebenfalls in der Aktivierung spezifischer Transkriptionsfaktoren resultiert (Miron et al., 2010). Bei der Generierung dorsaler Oligodendrozytenvorläuferzellen zu einem späteren Zeitpunkt embryonaler Entwicklung scheint weniger SHH eine Rolle zu spielen, vielmehr rückt hier FGF in den Vordergrund (Chandran et al., 2003; Kessarlis et al., 2004). Obwohl die OPCs in unterschiedlichen Arealen gebildet werden, weisen sie keine funktionellen Unterschiede auf. Durch gezielte Knockout- Studien konnte gezeigt werden, dass durch ein Fehlen von OPCs in einer

Hirnregion das Versuchstier dennoch eine Normalverteilung von Oligodendrozyten aufweist und somit auch unter keinen kognitiven Defiziten leidet. Daraus kann abgeleitet werden, dass ein Fehlen eines OPC- Bildungsareals hinsichtlich der Funktion durch die intakte Hirnregion übernommen werden kann (Kessarlis et al., 2004; Richardson et al., 2006). Da die OPCs unter anderem positiv für das Zelloberflächenantigen A2B5, das Proteoglykan NG2 sowie den auf der Zelloberfläche exprimierten PDGFR α (*platelet-derived growth factor receptor alpha*) sind, können diese Markergene zur Charakterisierung dieses Reifegrades genutzt werden. Um das Überleben der Zelle zu sichern nehmen extrazelluläre Mitogene, die die Proliferation begünstigen, eine entscheidende Rolle ein. Hierzu zählen unter anderem PDGF-A (*platelet-derived growth factor A*), der durch Bindung an den PDGFR α seine Wirkung entfaltet (Noble et al., 1988) und Neuregulin-1, welches an ErbB Rezeptoren der oligodendroglialen Membran bindet (Flores et al., 2000). Adhäsion- und Kontakt-vermittelte Faktoren, welche in der Extrazellulären Matrix (*extracellular matrix*, ECM) sowie auf der Oberfläche der umliegenden Zellen exprimiert werden, unterstützen die Migration der Zellen. Hierzu werden die Laminine, Merosine, Fibronectine, Tenascin-C sowie Anosmin-1 gezählt. Darunter stimulieren PSA-NCAM (*polysialylated neural cell adhesion molecule*), Ephrine, α v β 1 Integrine, Claudin 11, AN2/NG2 und N-Cadherine die Migration der Zellen (Bribián et al., 2008; Chun et al., 2003; Garcion et al., 2001; Hu et al., 2009; Relucio et al., 2012). Chemotaktische Stoffe wie Chemokine (Lockstoff) und Semaphorine (Abwehrstoff) sind für die korrekte Migration der OPCs unerlässlich (Armendáriz et al., 2012; Dziembowska et al., 2005). Unter dem Einfluss von intrinsischen Faktoren, wie Transkriptionsfaktoren und microRNAs (miRNAs) sowie extrinsischen Faktoren, stellen die Zellen die Migration ein und werden postmitotisch, was schließlich in der Ausbildung verzweigter Fortsätze resultiert (Dugas et al., 2010; Wegner, 2008). Die proliferierenden OPCs können andererseits aber auch im Stadium der proliferationsfähigen Vorläuferzellen verweilen. Diese als NG2-positive bezeichneten Makroglia sind während des gesamten Lebens im Gehirn nachzuweisen und besitzen die Fähigkeit in Antwort auf bisher unbekannte Signale in myelinbildende Oligodendrozyten zu differenzieren (Nishiyama et al., 2009).

Oligodendrozytenvorläuferzellen können nun zu Astrozyten, Neuronen, Schwannzellen oder Oligodendrozyten differenzieren. Eine Differenzierung entlang der oligodendroglialen Abstammungslinie in unreife beziehungsweise Prä-Oligodendrozyten (*pre-/ immature-oligodendrocyte*) wird beispielsweise durch den Wachstumsfaktor IGF1 (*insulin like growth factor*, IGF), durch das Zytokin CNTF sowie das Thyroidhormon T3 begünstigt (Barres et al., 1994; Carson et al., 1993; Miron et al., 2010). Eine Hochregulation der

Transkriptionsfaktoren Olig1/2, Sox10 und Nkx2.2/2.6 ist ebenfalls essentiell für die Differenzierung der Oligodendrozytenvorläuferzellen hin zu den Prä-Oligodendrozyten, was durch eine Expression der BMPs sowie Sox5/6 antagonisiert wird (Miron et al., 2010). Neben der reinen Aktivierung von Transkriptionsfaktoren kann auch deren posttranslationelle Modifikation, wie Phosphorylierung oder Acetylierung, entscheidend zu deren subzellulärer Lokalisation sowie Interaktion mit beispielsweise dem Chromatin oder anderer Proteine beitragen. In einer neuen Studie konnte für den Transkriptionsfaktor Olig1 gezeigt werden, dass Acetylierung an Lysin K150 mittels Histon-Acetyltransferase (HAT) CBP beziehungsweise Deacetylierung mittels Deacetylase HDAC1, wichtige Regularien darstellen, mit deren Hilfe eine Assoziation mit dem Chromatin kontrolliert werden kann. Im Falle des OPC Stadiums liegt Olig1 in seiner deacetylierten Form vor und assoziiert mit Histon3 des Chromatins sowie mit dem Transkriptionsfaktor Sox10, was die Proliferation dieser Zellen begünstigt. Im Zuge der Entwicklung kommt es schließlich zur Acetylierung von K150 durch CBP und somit zu einer Dissoziation vom Chromatin, was für die Morphogenese neu formierter Oligodendrozyten eine ausschlaggebende Rolle spielt. In primären Oligodendrozyten-Kulturen, welche aus der Olig1^{-/-} Maus gewonnen wurden, führt eine Überexpression des Olig1 Proteins in seiner *wildtyp* oder konstitutiv acetylierten Form zur Aufhebung der Differenzierungsblockade, gekennzeichnet durch ein erhöhtes Vorhandensein O4 positiver Zellen sowie Myelin-ähnlicher Membranen, was seine Wichtigkeit in der Zelllinien- Progression sowie morphologischen Differenzierung untermauert (Dai et al., 2015).

Nach der erfolgreichen Migration kommt es nun zu einer Interaktion des Prä-myelinisierenden Oligodendrozyten mit dem zu myelinisierenden Axon. Dabei vermitteln Zelladhäsionsmoleküle wie PSA-NCAM, Contactin/F3, MAG und der Notch Rezeptor die Zellerkennung (Popko, 2003). Durch den ersten Kontakt werden eine Vielzahl von molekularen Mechanismen in Gang gesetzt, unter anderem die Assoziation der Src-Kinase Fyn mit lipidreichen Mikrodomänen (Krämer-Albers et al., 2011), sowie die lokale Anreicherung von Phosphoinositolen wie PIP₂ und PIP₃, welche wiederum weitere Signalkaskaden aktivieren (Goebbels et al., 2010; Snaidero et al., 2014). Im Zuge der oligodendroglialen Differenzierung nimmt die Aktivierung der Fyn-Kinase eine entscheidende Rolle ein. Zu den inhibitorischen axonalen Signalen oligodendroglialer Differenzierung gehören PSA-NCAM, Jagged-1 und das neuronal sowie oligodendroglial exprimierte Transmembranprotein Lingo1 (*leucine-rich repeated immunoglobulin domain-containing-1*), welche die Aktivität der oligodendroglialen Tyrosin-Kinase Fyn reduzieren (Emery, 2010).

Das axonale Zelladhäsionsmolekül L1-CAM, der Axondurchmesser sowie das extrazelluläre Matrixprotein Laminin $\alpha 2$, welches über die Bindung an $\beta 1$ Integrine die Tyrosinkinase Fyn aktiviert, zählen zu den myelinisierungsfördernden Signalen (Hu et al., 2009; Liang et al., 2004). Auch die Bindung von neuronalem L1-CAM an oligodendrogliales F3/Contactin resultiert schließlich in einer gesteigerten Fyn-Kinase Aktivität (Laursen et al., 2009; White et al., 2008). Neuronale Aktivität erhöht zudem die Expression von L1-CAM, wodurch die Phosphorylierung der Fyn-Kinase gefördert wird (Wake et al., 2011) und somit der Zeitpunkt der Myelinisierung durch das Axon selbst beeinflusst werden kann (Nave et al. 2010). Dies resultiert schließlich in der lokalen Translation von Myelinproteinen, wie dem Myelin basischen Protein (MBP) (Müller et al., 2013). Auch die Abgabe neuronaler Signalmoleküle wie eine Adenosin- beziehungsweise ATP- Ausschüttung im Zuge neuronaler Aktivität kann durch Bindung an oligodendrogliale Oberflächenrezeptoren die Myelinisierung begünstigen (Emery, 2010). Aber auch der oligodendrogliale Oberflächenrezeptor Notch nimmt eine essentielle Rolle innerhalb der Differenzierung von Oligodendrozyten ein. Bindet er den neuronal exprimierten extrazellulären Liganden Jagged-1, wird die Differenzierung inhibiert. Die Jagged-Expression ist entwicklungsabhängig reguliert und wird parallel zur Myelinisierung reduziert. Daraufhin tritt Notch schließlich in Kontakt mit dem neuronal im paranodalen Bereich angehäuften Liganden F3/Contactin und fördert so die Differenzierung unter anderem durch gesteigerte Expression des Myelin- assoziierten Glykoproteins (*Myelin-associated glycoprotein*, MAG) (Hu et al., 2003). Somit geht eine Differenzierung hin zu reifen Oligodendrozyten mit der Bildung Myelin-verwandter Proteine, wie beispielsweise MBP und MAG einher, was im folgenden Abschnitt im Zuge des Aufbaus der Myelinmembran genauer betrachtet werden soll.

2.2.2 Aufbau und Funktion der Myelinmembran

Nach der dynamischen Erkennung zu myelinisierender axonaler Segmente, wickelt ein reifer Oligodendrozyt letztlich seine Ausläufer spiralig um die entsprechenden Zielaxone, wobei es zu lateralen und radialen Membranexpansionen kommt und die neu gebildete Myelinschicht sich unter die bereits vorhandene schiebt (Snaidero et al., 2014) (siehe Abbildung 3A). Im Modellorganismus Zebrafisch konnte gezeigt werden, dass Oligodendrozyten in der Lage sind, innerhalb von fünf Stunden neue Myelinschichten zu generieren (Czopka et al., 2013). Pro Tag konnte ein Wachstum der Myelinmembran von etwa $5000\mu\text{m}^2$ ausgemacht werden (Pfeiffer et al., 1993), wobei bis zu 160 Myelinschichten um ein einziges axonales Segment gebildet werden können (Hildebrand et al., 1993; Snaidero et al., 2014). In einer neueren

Studie, die sich die hochauflösende 3D-Rekonstruktion zu Nutze macht, konnten allerdings nur 11 das Axon ummantelnde Myelinschichten nachgewiesen werden (Snaidero et al., 2014). Erlebnisse können zudem Einfluss auf die Plastizität der Myelinisierung nehmen (Scholz et al., 2009), was durch eine Differenzierung bereits vorhandener Oligodendrozyten vermittelt wird (Yeung et al., 2014). Nachdem die Umwicklung des Axons erfolgreich abgeschlossen ist, schließt sich ein Kompaktierungsvorgang an (siehe Abbildung 3). Das Zytoplasma zieht sich aus den Ausläufern zurück und die gegenüber liegenden Membranen verdichten sich zunehmend auf der zytoplasmatischen Seite, bis sie letztlich zu einer kompakten multilamellaren Einheit, dem Myelin, verschmelzen.

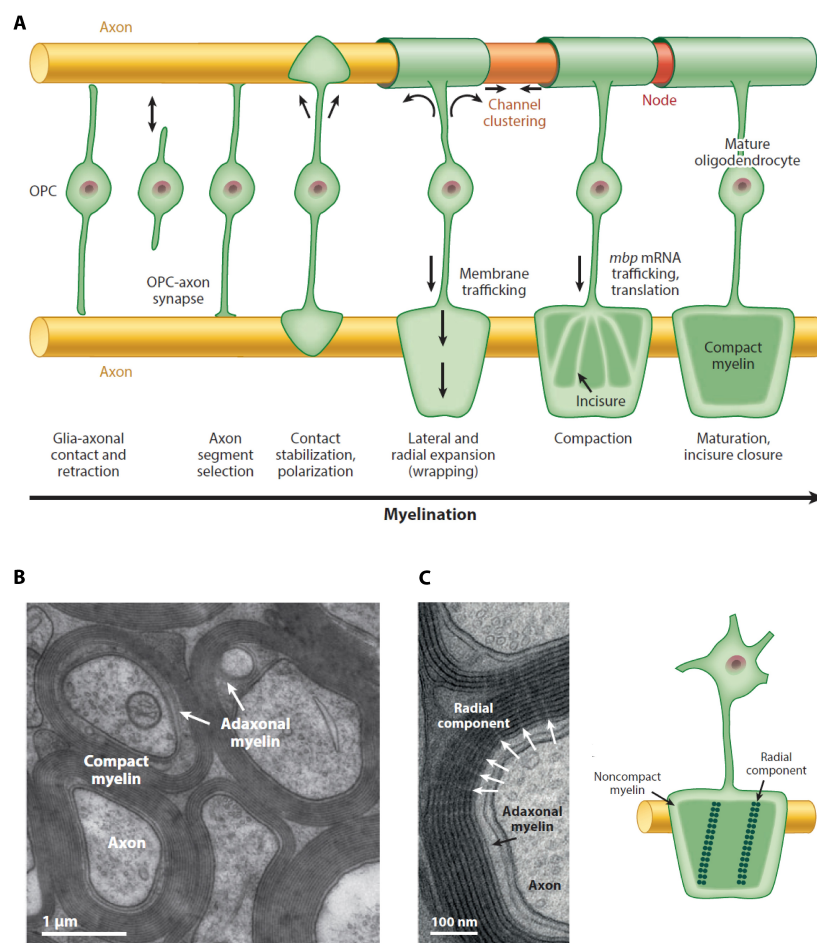


Abbildung 3: Prozess der Myelinisierung und Aufbau der Myelinmembran. **A**, Schematische Darstellung der Myelinisierung durch Oligodendrozyten. Ein OPC tritt in Kontakt mit einem selektierten axonalen Segment, was in einer Expansion der Ausläufer resultiert. Mittels lateraler und radialer Expansion der Myelinmembran kommt es zur Ummantelung des axonalen Segments (wrapping), was mit einem Kompaktierungsvorgang der Membran abgeschlossen wird. **B**, Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Querschnitts durch den optischen Nerv. Zu erkennen ist die Struktur des Myelins, mit der weniger elektronendichten *Intraperiod Line* (IPL), dem Bereich der Extrazellulären Membranen im kompakten Myelin und der elektronendichteren *Major Dense Line* (MDL), dem Bereich der intrazellulären Membranen im kompakten Myelin. Der zytoplasmatisch gefüllte adaxonale Bereich ist mit Pfeilen markiert. **C**, Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Querschnitts durch den optischen Nerv. Die radiale Komponente (Zytoplasma- gefüllte Kanäle) ist mittels heller Pfeile gekennzeichnet. In der schematischen Darstellung wird die Lokalisation der radialen Komponente in Bereichen der kompakten Myelinschicht illustriert. (modifiziert nach (Nave and Werner, 2014)). Details siehe Text.

Die Myelinmembran weist eine typische Ultrastruktur auf. Das im Elektronenmikroskop sichtbare Bandenmuster der querschnittenen Myelinscheide ist in Abbildung 3B dargestellt. Durch Verschmelzung der zytoplasmatischen Membranoberflächen entsteht die *Major Dense Line (MDL)*, welche im elektronenmikroskopischen Bild elektronendicht und damit dunkel erscheint. Die sogenannte *Intraperiod Line (IPL)* wird dahingegen aus den aneinander liegenden extrazellulären Membranoberflächen gebildet und erscheint aufgrund der geringeren Elektronendichte in der elektronenmikroskopischen Aufnahme im Vergleich zur MDL heller. Der dem Axon am nächsten anliegende Bereich des Myelins, wird als adaxonales Myelin, wohingegen der am äußeren Rand liegende Bereich des Myelins, als abaxonales Myelin bezeichnet wird (Nave, 2010a). In elektronenmikroskopischen Aufnahmen können zudem radial verlaufende, mit Zytoplasma gefüllte lamellare Kanäle, bekannt als radiale Komponente, detektiert werden, welchen eine aufrechterhaltende sowie stabilisierende Funktion gegenüber der gebildeten Myelinschicht zugeschrieben wird, (Nave and Werner, 2014).

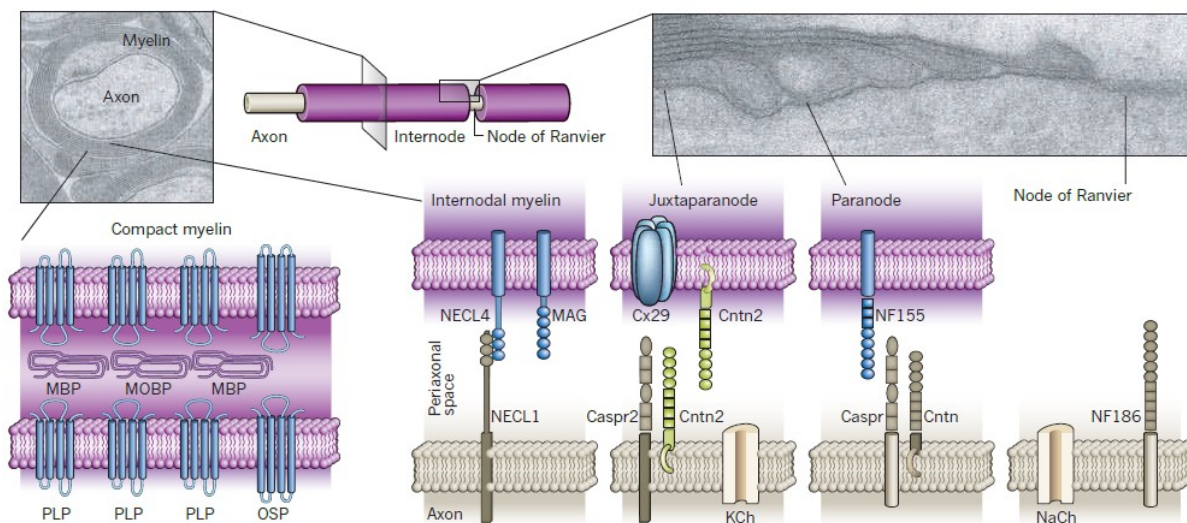


Abbildung 4: Aufbau und Struktur der Myelinmembran. Elektronenmikroskopische Aufnahme und schematische Illustration des durch mehrfache Umhüllung eines axonalen Segments durch oligodendrogliale Zellfortsätze entsandenen kompakten Myelins (**links**). Diese myelinisierten Bereiche (Internodien) werden von unmyelinisierten Bereichen (Nodien/ Ranvier'sche Schnürringe) unterbrochen. Durch die Akkumulation von Na⁺-Kanälen (NaCh) in den Schnürringen und der Akkumulation von K⁺-Kanälen (KCh) in den Juxtaparanodien wird die schnelle saltatorische Erregungsleitung ermöglicht (**schematische Illustration, rechts**). Im Paranodium endet die Myelinmembran in Form von Zytoplasma-gefüllten, hintereinanderliegenden Schleifen (**Elektronenmikroskopische Aufnahme, rechts**). Die verschiedenen Regionen entlang des Axons unterscheiden sich durch die Lokalisation verschiedener Zelladhäsionsmoleküle. Caspr, Contactin-assoziiertes Protein; Cntn, Contactin; Cx29, Connexin 29 kDa; KCh, K⁺-Kanal; NaCh, Na⁺-Kanal; MAG, Myelin-Associated Glycoprotein; MBP, Myelin Basic Protein; MOBP, Myelin-associated Oligodendrocytic Basic Protein; NECL, Nectin-like Protein/ SynCAM; NF155/186, Neurofascin 155 kDa/186 kDa; OSP, Oligodendrocyte-Specific Protein; PLP, Proteolipid Protein (modifiziert nach (Nave, 2010b)).

Entlang eines Axons wechseln sich myelinisierte Abschnitte (Internodien) mit unmyelinisierten Abschnitten (Nodien) ab, was in Abbildung 4 dargestellt ist. Diese spezialisierten Bereiche, an denen die Myelinisierung unterbrochen ist, werden als Ranvier'sche Schnürringe bezeichnet. Spezifische Signale stoppen letztlich die laterale Ausbreitung der Myelinschicht entlang des Axons und bedingen so die Ausbildung der Nodien (Susuki et al., 2013). An den Ranvier'schen Schnürringen befinden sich viele spannungsabhängige Natriumkanäle, wodurch das Axon ausschließlich an diesen Stellen depolarisiert werden kann und ermöglicht so die schnellere und energieeffizientere saltatorische Erregungsweiterleitung von Schnürring zu Schnürring (Aggarwal et al., 2011a; Poliak and Peles, 2003). Die Geschwindigkeit der Reizweiterleitung hängt zudem von dem Durchmesser des Axons ab. Je größer der Durchmesser des Axons ist, desto schneller ist die Reizweiterleitung. Damit ein unmyelinisiertes Axon mit gleicher Geschwindigkeit leiten kann, müsste es bis zu hundert Mal so dick sein wie ein myelinisiertes Axon (Hartline and Colman, 2007). Somit verstärkt die Myelinisierung die Erregungsweiterleitung um ein Vielfaches, wodurch sich bei Vertebraten im Zuge der Evolution eine schnellere Weiterleitung elektrischer Signale bei Axonen mit geringem Durchmesser etablieren konnte. Aufgrund der Ummantelung axonaler Segmente mit der lipidreichen Membran, kommt es zur Erhöhung des transversalen Widerstands und damit werden Leckströme verhindert, wodurch schließlich die Stärke der Erregungsweiterleitung über die gesamte Länge des Internodiums erhalten bleibt (Hartline and Colman, 2007). Durch die Kombination der beiden Strategien, elektrische Isolation und saltatorische Erregungsleitung, konnte die Leitungsgeschwindigkeit im Axon stark erhöht werden.

Oligodendrozyten übernehmen nicht nur die Rolle der Isolation von Axonen, sondern sie stellen dem Axon auch trophische Faktoren zur Verfügung und üben eine neuroprotektive Funktion aus (Fünfschilling et al., 2012; Nave, 2010a). Durch Deaktivierung von Myelinproteinen, wie beispielsweise CNP oder PLP, im Mausmodell, konnten hinsichtlich der Myelinschicht nur sehr geringe morphologische Defekte beobachtet werden, wohingegen die ummantelten Axone Degenerationserscheinungen aufwiesen (Griffiths et al., 1998; Lappe-Siefke et al., 2003). Zudem scheinen oligodendrogliale Peroxisomen einem Degenerieren von Axonen und entzündlichen Demyelinisierungen entgegenzuwirken (Kassmann et al., 2007). Während der axo-glialen Kommunikation könnten Exosomen, beziehungsweise endosomal-abgeleitete Mikrovesikel, die den Transfer von Proteinen, RNAs und miRNAs von einer Zelle zur anderen ermöglichen (Denzer et al., 2000; Frühbeis et al., 2013), im Zuge der neuroprotektiven Rolle oligodendroglialer Zellen eine wichtige Rolle spielen. Ihnen wird

spezifisch in oligodendroglialen Zellen im Zuge einer oxidativen Stresssituation eine Neuronen schützende Rolle zugeschrieben. Zudem sind sie in der Lage *in vitro* die neuronale Aktivität zu modulieren und somit einen Einfluss auf die Ausbildung des neuronalen Netzwerks zu nehmen (Fröhlich et al., 2014).

2.2.3 Myelinisierungsproteine und – Lipide

Im Gegensatz zu den meisten biologischen Membranen zeichnet sich die Myelinmembran durch eine einzigartige Lipid- und Proteinzusammensetzung aus, was in der nachfolgenden Abbildung 5 schematisch verdeutlicht wird.

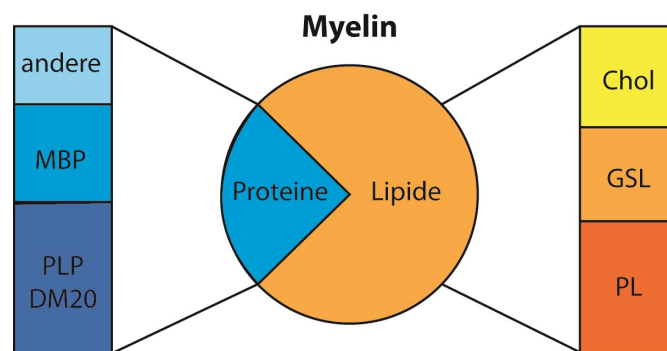


Abbildung 5: Zusammensetzung der Myelinschicht. Die Myelinschicht besteht zu 70-75% aus Lipiden und zu 25-30% aus Proteinen. Die beiden Hauptmyelinproteine sind das Myelin basische Protein (MBP) und Proteolipid Protein (PLP). Die Lipide setzen sich aus Cholesterin (Chol), Glykosphingolipiden (GSL) und Phospholipiden (PL) zusammen (modifiziert nach (Lazzarini, 2004).

Die Myelinmembran setzt sich zu 70%-75% aus Lipiden zusammen, was eine elektrische Isolation der Axone erst möglich macht (Quarles et al., 2006). Die Lipidfraktion besteht, wie in Abbildung 5 deutlich wird, aus drei Hauptbestandteilen, Glykosphingolipiden, Cholesterin und Phospholipiden (Norton, 1984). Cholesterin scheint durch Bildung Cholesterin-reicher Mikrodomänen an der Aktivierung der Signalkaskaden zur Myelinisierung der Axone ausgelöst durch den axo-gliale Kontakt beteiligt zu sein (White and Krämer-Albers, 2014).

Aus Abbildung 5 wird deutlich, dass das Proteolipid-Protein (*Proteolipoprotein*, PLP) mit 17% des Gesamtproteins das am häufigsten vorkommende Myelinprotein ist. PLP ist ein 25 kDa großes, integrales Membranprotein, welches vier Transmembrandomänen aufweist (Popot, 1991). Eine weitere Spleißvariante des PLP Gentranskripts ist das ca. 20 kDa große DM20 und zusammen bilden diese beiden Isoformen einen wichtigen Bestandteil des kompakten Myelins (Nave et al., 1987). Mengenmäßig schließen sich daran mit 8% der Gesamtproteinmenge das Myelin basische Protein (*Myelin basic protein*, MBP) (Baumann

and Pham-dinh, 2001), die 2', 3'- zyklische Nukleotid 3'Phosphodiesterase (2', 3'- *cyclic nucleotide 3'phosphodiesterase*, CNP; 4% der Gesamtproteinmenge) sowie das Myelin-assoziierte Oligodendrozyten basische Protein (*Myelin- associated oligodendrocytic basic protein*, MOBP) an. Mit jeweils einem Prozent der Gesamtproteinmenge sind zudem das Myelin- assoziierte Glykoprotein (*Myelin- associated glykoprotein*, MAG) sowie das Myelin-Oligodendrozyten Glykoprotein (*Myelin oligodendrocyte glykoprotein*, MOG) Bestandteil der Myelinprotein- Fraktion (Jahn et al., 2009; Nave and Werner, 2014).

Die Generierung der Myelinmembran fordert enorme biosynthetische Leistungen an die Oligodendrozyten. Um schließlich die mengenmäßige Expression der Myelinproteine und - Lipide, sowie deren Transport an den entsprechenden Zielort im Zuge der Oligodendrozytenentwicklung gewährleisten zu können, existieren hoch spezifische lokale sowie temporale Regularien, was im Folgenden am Beispiel des Myelin basischen Proteins (MBP) erläutert werden soll.

2.2.3.1 Myelin basisches Protein (MBP)

Das prozentual zweithäufigste Myelinprotein, MBP, weist im Menschen vier Isoformen (17.2 kDa, 18.5 kDa, 20.2 kDa und 21.5 kDa) und in der Maus sechs Isoformen (14-21.5 kDa) auf, welche sich durch alternatives Spleißen beziehungsweise durch Kombination von sieben Exons des *Golli*-Gens (*Genes of Oligodendrocyte Lineage*) ergeben (Harauz, G., and Boggs, 2013; Kamholz et al., 1988). Auf dem *Golli*- Gen können drei unterschiedliche Transkriptionsstartpunkte unterschieden werden. Dies führt zur lokal und temporal regulierten Transkription beziehungsweise Expression der klassischen MBP und *Golli*- Proteine (Harauz et al., 2009).

Golli- Proteine werden im Gegensatz zu den MBP Isoformen nicht ausschließlich in myelinisierenden Zellen exprimiert. Auch in Neuronen und Zellen des Immunsystems sind sie nachzuweisen (Fulton et al., 2010). *Golli*- Proteine werden vorwiegend während der oligodendroglialen Differenzierung synthetisiert und weisen eine nukleäre sowie somatische Lokalisierung auf. Ihnen wird zudem eine aufrechterhaltende Funktion bezüglich der oligodendroglialen Homöostase zugeschrieben, da sie in den frühen Differenzierungsstadien des Oligodendrozyten den Einstrom von Kalziumionen fördern (Paez et al., 2007).

MBP weist, wie sein Name vermuten lässt, einen basischen Charakter auf. Bei zellulärem pH-Wert liegt es somit positiv geladen vor und ist dadurch in der Lage mit den negativ geladenen Phospholipiden der Membran zu interagieren (Boggs, 2006), wodurch gegenüberliegende Membranen von der zytoplasmatischen Seite her einander angenähert werden können, was in einer Kompaktierung der Myelinmembran und in der Bildung der MDL resultiert (Martini et al., 1995; Wood et al., 1984). Es kommt zur Interaktion von MBP mit Phosphatidylinositol-(4,5)- Bisphosphat (PI(4,5)P₂) an der zytosolischen Seite der Membran. MBP kann auch mit sich selbst assoziieren, wodurch eine Art molekulares Sieb gebildet wird, was eine Barriere zwischen kompaktem und nicht-kompaktem Myelin bildet. Es stellt eine Diffusionsbarriere dar, was es Molekülen mit großen zytoplasmatischen Domänen, wie CNP, nicht ermöglicht in Bereiche des kompakten Myelins einzudringen (siehe Abbildung 4; (Aggarwal et al., 2013, 2011b)). Dass MBP ein essentielles Protein der Myelinisierung darstellt, wird durch die natürlich vorkommende Maus-Mutante *shiverer* untermauert, in der ein Großteil des MBP Gens deletiert ist. Durch diesen Gendefekt kann kein funktionelles MBP gebildet werden und es kommt zu schwerwiegenden funktionalen Störungen der Myelinisierung (Nave, 1984), was phänotypisch in der Ausbildung eines generalisierten Tremors resultiert. *Shiverer* Oligodendrozyten sind im ZNS nicht in der Lage, kompaktes Myelin auszubilden, was eine Hypomyelinisierung der Axone nach sich zieht. Dem entgegen scheint die ausbleibende MBP Bildung keinen offensichtlichen Effekt auf die Myelinisierung im PNS auszuüben (Gould, 1995).

Als essentielles Protein der Myelinisierung, muss MBP nun vom Perikaryon hin zur Peripherie der Oligodendrozyten gelangen. Da seine mRNA bereits mindestens einen Tag vor Beginn der Proteinsynthese detektiert werden kann, gehört es zu den mRNAs, welche räumlich und zeitlich durch translationale Repression hinsichtlich ihrer Synthese kontrolliert werden (Besse and Ephrussi, 2008; Colello et al., 1995). Die *Mbp* mRNA wird in einem translational inhibierten Zustand in hnRNP A2- abhängigen RNA- Granulas (siehe 2.3.1) zusammen mit einer Reihe RNA-bindender Proteine, Komponenten der Translationsmaschinerie sowie der kleinen nicht-kodierenden RNA 715 (*small non-coding RNA715*, *sncRNA715*) und Ago2, Inhibitoren der MBP-Translation (Bauer et al., 2012; Müller et al., 2015, 2013) in Abhängigkeit einer in allen MBP-Isoformen vorkommenden RNA-Transportsequenz (RTS), dem *A2 response element* (A2RE) (Munro et al., 1999), hin zur axo-glialen Kontaktstelle transportiert und dort lokal translatiert (Müller et al., 2013).

2.2.3.2 Myelin- assoziiertes Oligodendrozyten basisches Protein (MOBP)

Neben *Mbp*, wurde auch für andere A2RE- enthaltende mRNAs vermutet, dass sie mit hnRNP A2- abhängigen RNA- Granulas assoziiert sind. Hierzu zählen CamKIIalpha, Neurogranin, Arc sowie das Myelin-assoziierte Oligodendrozyten basische Protein (MOBP). (Barbarese et al., 1999; Gao et al., 2008).

Das MOBP Gen, welches in der Maus auf Chromosom 9 lokalisiert ist (Mccallion et al., 1996), wird erst zu einem späteren Zeitpunkt innerhalb der ZNS Entwicklung exprimiert und setzt sich aus 8 Exons, welche sich auf eine genomische Region mit einer Größe von 15 kb verteilen (Mccallion et al., 1996), zusammen. Alternatives Spleißen der *prä-Mobp* mRNA, hervorgegangen aus dieser komplex aufgebauten Transkriptionseinheit, führt zur Synthese von sechs Isoformen in der Maus (Mccallion et al., 1996; Montague et al., 1997) und sieben in der Ratte (Holz et al., 1996; Yamamoto et al., 1994). Gemeinsam sind den Isoformen die 68 N-terminalen Aminosäurereste, welche von Exon 3 kodiert werden (Mc Callion 1999). Zwischen Mensch, Maus und Ratte konnte gezeigt werden, dass dieser N-terminale Bereich hoch konserviert vorliegt. Eine Sequenzidentität von 94% konnte zwischen Maus und Mensch evaluiert werden, wohingegen zwischen Maus und Ratte sogar nur ein Aminosäureunterschied nachgewiesen werden konnte (Montague et al., 2005). Charakteristischerweise setzt sich dieser konservierte Teil des Aminoterminus zu 19% aus Prolin, 12% aus Lysin, 11% aus Arginin sowie Serin zusammen (Yoshikawa, 2001). Die funktionelle Diversität der einzelnen Isoformen ist somit vermutlich auf die individuelle Ausbildung des C-Terminus einer jeden Isoform zurückzuführen. Zum einen differieren sie in der Länge (Montague et al., 2005), weisen aber alle eine Anhäufung positiv geladener Reste auf (Yoshikawa, 2001).

Die einzelnen *Mobp* mRNAs kodieren für eine Gruppe hoch basischer und kleiner Polypeptide (10-20 kDa), vergleichbar mit der MBP Familie. MOBP ist genau wie MBP in der MDL kompakten Myelins lokalisiert (Yamamoto et al., 1994) und kann als mRNA in den so genannten *myelin sheath assembly sites* (MSAS) nachgewiesen werden (Gould et al., 1999). Vier Isoformen (MOBP71, 81A, 99, 169) zeichnen sich durch das Vorhandensein eines gemeinsamen Exon, dem Exon 8b, aus, welches eine Nukleotidsequenz gleich der RNA-Transportsequenz von MBP aufweist (A2RE) (Yoshikawa, 2001). Es wird vermutet, dass diese RTS die mRNAs zu den Orten der Myelinisierung, der axo-glialen Kontaktstelle, dirigiert (Gould et al., 2000). Die anderen drei Isoformen (MOBP69, 81B, 170) missen dieses

Exon (Gould et al., 1999) und zeigen daher in ihrer subzellulären Verteilung eine hohe somatische Anreicherung (Yoshikawa, 2001).

Die MOBP Expression hinsichtlich kompakt myelinisierter Bereiche erreicht in Ratte und Maus ihren Höhepunkt am postnatalen Tag 15 (P15) (Holz and Schwab, 1997). In früheren postnatalen Stadien konnte die *Mobp* mRNA in oligodendroglialen Fortsätzen ausgemacht werden. Zusammenfassend bleibt zu sagen, dass die MOBP Genexpression mit der Periode aktivster Myelinformierung im Rückenmark und Gehirn zusammenfällt (Montague et al., 1997).

Auf Grundlage mehrerer Gemeinsamkeiten zwischen den beiden basischen Myelin-Proteinfamilien, wie dem Vorhandensein derselben RTS, einem identischen Expressionsmuster, einer vermuteten Assoziation von MOBP81A mit dem Mikrotubulinetzwerk (Montague et al., 1998) und der Anhäufung positiv geladener Aminosäurereste im Carboxylterminus, wurde zunächst angenommen, dass MOBP, genau wie MBP, an der Kompaktierung der Myelinmembran und somit an der Formierung der MDL beteiligt seien (Gould et al., 2000; Montague et al., 2006). Unterstützt wurde diese Hypothese durch herunterregulierte MOBP Proteinmengen in MBP- defizientem Myelin der homozygoten *shiverer* Maus (Montague et al., 1999). Allerdings könnte auch eine abnormal ausgebildete MDL die Einlagerung von MOBP in das Myelin gefährden, denn unter den demyelinisierenden Bedingungen in den PLP Mausmutanten *jimpy* und *rumpshaker*, welche eine abnormale Ausbildung der IPL aufweisen, konnte kein Effekt bezüglich der synthetisierten MOBP Proteinmenge verzeichnet werden (Griffiths et al., 1995; Montague et al., 1999). Zudem ist die Vermutung, MOBP sei an der Kompaktierung der Myelinmembran beteiligt, widersprüchlich zu den Beobachtungen, die man bezüglich der beiden generierten *Mobp* Knockout Mäuse erheben konnte. Auch unter *Mobp*- defizienten Bedingungen, waren diese beiden Maus-Stämme in der Lage sich normal zu entwickeln und bildeten im Gegensatz zur *shiverer* Maus (siehe 2.2.3.1) keinen erkennbaren demyelinisierenden Phänotyp aus (Yamamoto et al., 1999; Yool et al., 2002). Es wird allerdings vermutet, dass MOBP direkter Bestandteil der radialen Komponente innerhalb der MDL ist und somit zur Ausbildung des in einem Zick-Zack-Muster angeordneten diffusen Modells ist. Diesem *tight-junction* ähnlichen Komplex wird eine Myelin- aufrechterhaltende Rolle zugeschrieben, indem er die Permeabilität kleiner Moleküle zwischen den einzelnen Myelinschichten kontrolliert. In MOBP-defizienten Mäusen kommt es zur Ausbildung eines phylogenetisch simpleren, in Amphibien bekannten Modells der radialen Komponente, welches als kondensiert bezeichnet

wird und vermutlich eine geringere Resistenz hinsichtlich toxischer Stimuli aufweist (Yamamoto et al., 1999). MOBP scheint somit weniger essentiell für die Formierung des kompakten Myelin zu sein, vielmehr wird ihm eine Rolle in der Aufrechterhaltung der Myelinintegrität und der Stabilisierung der radialen Komponente im ZNS zugeschrieben.

Auf zellulärer Ebene allerdings konnte MOBP noch keine Funktion zugeschrieben werden. Seine funktionelle Diversität wird allerdings dadurch verdeutlicht, dass MOBP zum einen Komponente der MDL des kompakten Myelins im ZNS ist, zum anderen konnte es auch im Nukleus nachgewiesen werden (Montague et al., 1998). Im Falle einer kürzlich entdeckten, noch nicht weiter charakterisierten Isoform, MOBP155, konnte eine Assoziation mit den Mitochondrien beobachtet werden (Montague et al., 2005). Auch andere Myelinproteine zeigten bereits, dass sie neben dem Myelin auch andere Zielstrukturen haben. So zeigt auch MBP eine nukleäre- (siehe 2.2.3.1) und CNP eine mitochondriale Lokalisation (Mcferran and Burgoyne, 1997). MOBP scheint somit ein entscheidender Bestandteil für Oligodendrozyten zu sein, was durch seine hohe Expression und komplexe subzelluläre Verteilung verdeutlicht wird.

2.3 mRNA Transport in Oligodendrozyten

Eukaryotische Zellen weisen verschiedene Transportwege auf, um zu gewährleisten, dass die mRNA beziehungsweise das Protein seinen Zielort erreicht.

Proteine können zum einen an freien Ribosomen im Zytoplasma synthetisiert werden. Um den Proteintransport zum entsprechenden Zielorganell zu ermöglichen, weisen sie spezifische Signalsequenzen auf. Des Weiteren können Proteine des sekretorischen Transportweges zunächst an freien zytosolischen Ribosomen synthetisiert und schließlich über das endoplasmatische Retikulum (ER) und den Golgi-Apparat fertig gestellt werden. Die hier entstandenen Proteine werden schließlich vesikulär zur Plasmamembran transportiert und dort integriert oder aus der Zelle sezerniert. Im dritten Transportweg werden mRNAs direkt nach dem Export aus dem Zellkern in sogenannte Granulas verpackt und zu dem entsprechenden Zielort transportiert, wo sie schließlich lokal zu Proteinen translatiert und teilweise mit der Zielstruktur vereinigt werden (Dahme et al., 1997).

Diese Form der lokalen Translation weist verschiedene Vorteile für die eukaryotische Zelle auf. Zum einen wird sie davor geschützt, dass das Protein an Stellen gelangt, an denen es

Schaden anrichten könnte (Smith, 2004) und zum anderen kann die Translation sehr zeit- und energieeffizient ablaufen, da die Aktivität des Proteins keiner Regulation bedarf und die lokale Proteinkonzentration der Nachfrage angepasst werden kann.

Innerhalb der RNA- Granulas assoziieren lokalisierte mRNAs mit ribosomalen Untereinheiten und anderen Translationskomponenten und deren Transport erfolgt mikrotubulibasierend entlang des Zytoskeletts (Carson et al., 1997), was in der nachfolgenden Abbildung 6 schematisch dargestellt ist.

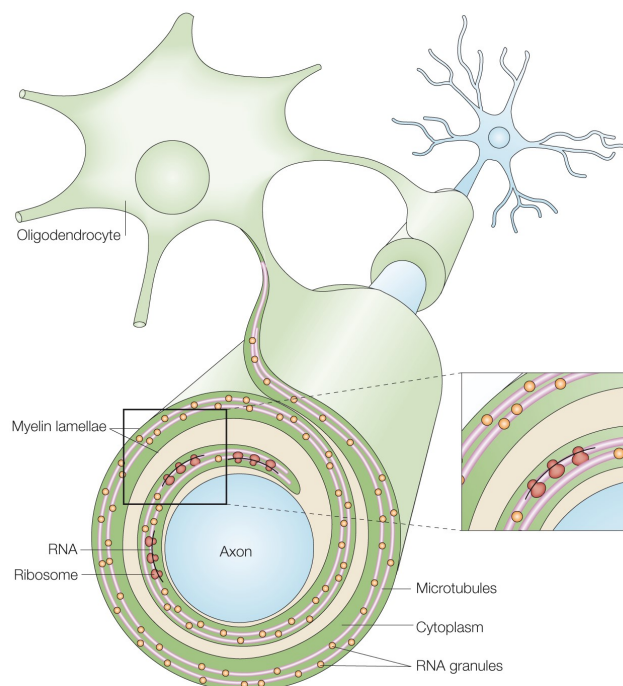


Abbildung 6: mRNA Transport in RNA Granulas. Ein Oligodendrozyt ummantelt benachbarte Zielaxone und der Myelinisierungsprozess erfordert eine distinkte Protein und Lipid Zusammensetzung. Die Synthese einiger Myelinproteine erfolgt an der axo-glialen Kontaktstelle. Dies resultiert aus einem mikrotubulibasierenden Transport von RNA Granulas (orange Kreise), welche mRNA (blaue Linien) und Ribosomen (rote Kreise) beinhalten (modifiziert nach (Sherman and Brophy, 2005)).

Generell kann die Lokalisation von mRNAs in vier Schritte untergliedert werden. Zunächst muss die mRNA im Kern zur Lokalisation markiert werden, was von einer speziellen Sequenz in der 3'UTR der RNA, der sogenannten RTS (*RNA transport sequence*), übernommen wird und als *cis-acting* Element bezeichnet wird. Diese RTS kann schließlich von RNA-bindenden Proteinen erkannt werden, welche daher als *trans-acting* Faktoren bezeichnet werden. Durch Bindung des *trans-acting* Faktors wird die mRNA schließlich zur Lokalisation markiert und nachfolgend aus dem Kern transportiert, womit der zweite Schritt der mRNA- Lokalisation eingeleitet werden kann. Die mRNA wird zusammen mit den

gebundenen Faktoren, wie RNA-Bindemolekülen, ribosomalen Untereinheiten, Translationsinitiationsfaktoren sowie Adapterproteinen, in die RNA-Transport-Granula verpackt, die man als transportablen Ribonukleoprotein Partikel (RNP) (Carson et al., 2001; Czaplinski and Singer, 2006) bezeichnet. Schließlich kommt es zur Assoziation des RNP mit molekularen Motoren wie Dynein und Kinesin, wodurch ein Transport entlang der Mikrotubuli bis hin zur Zielstruktur ermöglicht wird. Temporal durch spezifische Signale reguliert, kommt es letztlich zur lokalen Translation der mRNA.

Der Mechanismus der Translationshemmung zur lokalen und temporalen Regulation der Translation soll im Folgenden anhand des A2- Signalwegs, welcher die Lokalisation der *Mbp* mRNA in Oligodendrozyten beschreibt, detaillierter erläutert werden.

2.3.1 A2- Signalweg

Da *Mbp* mRNA im Gegensatz zu anderen Myelin mRNAs wie *Plp* in Myelinfraktionen nachgewiesen werden konnte (Colman et al., 1982), liegt ein Transport hin zur axo-glialen Kontaktstelle in RNA-Granulas, welche entlang des Zytoskeletts transportiert werden, nahe (Ainger et al., 1997; Brophy et al., 1993). Zum einen wird dadurch vermieden, dass das basische MBP intrazelluläre Membranen kompaktieren kann (Staugaitis et al., 1990). Zum anderen kann MBP dadurch innerhalb von Minuten in das Myelin eingelagert werden, da es an freien Polyribosomen an den *myelin sheath assembly sites* generiert wird (Gould et al., 1999). Integrale Membranproteine wie PLP hingegen werden am rauhen ER und Golgi-Apparat des Zytoplasmas synthetisiert sowie prozessiert und schließlich erst nach ca. 30 Minuten in das Myelin eingebaut (Trapp et al., 1987).

Die Lokalisierung der *Mbp* mRNA beruht auf der hoch konservierten elf Nukleotide langen Sequenz innerhalb der 3'UTR, dem sogenannten A2 Response Element (A2RE) (Munro et al., 1999). Innerhalb des Zellkerns bindet dieses *cis-acting* Element den in Abbildung 7 in Rot dargestellten *trans-acting* Faktor, heterogenes nukleäres Ribonukleoprotein A2 (hnRNP A2), wodurch der Export der markierten mRNA eingeleitet werden kann (Carson and Barbarese, 2005).

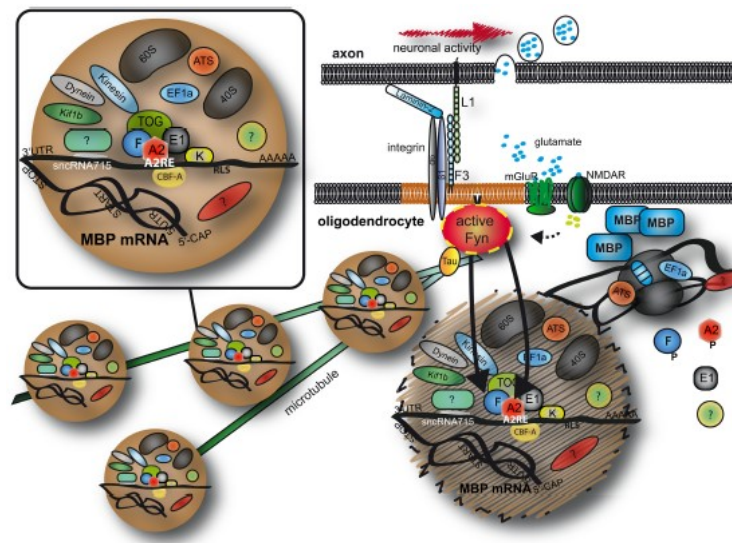


Abbildung 7: Transport und lokale Translation von MBP. Schematische Darstellung des hnRNP-A2 Transportweges, worüber die *Mbp* mRNA in RNA-Granulas zur axo-glialen Kontaktstelle transportiert und dort in Antwort auf axonale Signale lokal translatiert wird. In den RNA- Granulas wird die *Mbp* mRNA zusammen mit verschiedenen RNA- binde Proteinen, Motorproteinen sowie Bestandteilen der Translationsmaschinerie transportiert, wobei die Inhibition der Translation vermutlich über die sncRNA715 und Argonaut Proteine vermittelt wird (modifiziert nach (Müller et al., 2013)). Details siehe Text.

Insgesamt sind vier Isoformen des hnRNP A2 Proteins bekannt (B1, B1b, A2, A2b). Hierbei scheint hnRNP A2b hauptsächlich an der Lokalisierung der *Mbp* mRNA beteiligt zu sein (Han et al., 2010). Im Zytoplasma angekommen kommt es zur Anlagerung weiterer RNA-bindender Proteine an die mRNA, wie dem *Tumor overexpressed Gene* (TOG), CBF-A sowie hnRNP F, E1 und K (Kosturko et al., 2006, 2005; Laursen et al., 2009; Raju et al., 2008; White et al., 2012), wodurch der transportable RNP beziehungsweise RNA-Granula gebildet wird. Anschließend wird dieser entlang der oligodendroglialen Fortsätze hin zur axo-glialen Kontaktstelle in die Peripherie transportiert, wobei das Kinesin- Motorprotein Kif1b eine essentielle Rolle übernimmt (Czapinski and Singer, 2006; Lyons et al., 2009). Im RNA-Granula konnten zudem Komponenten der Translationsmaschinerie nachgewiesen werden, um eine schnelle Translation in Abhängigkeit spezifischer Signale zu gewährleisten. Zu diesen Komponenten zählen der Elongationsfaktor 1a (EF1a), die Aminoacyl-tRNA Synthetase (ATS) sowie ribosomale RNA (Barbarese et al., 1995). Die translationelle Inhibition der *Mbp* mRNA während des Transportes innerhalb des RNA- Granulas wird durch die sncRNA 715 (Bauer et al., 2012) und vermutlich auch durch hnRNP E1 (Kosturko et al., 2006) vermittelt. Eine Regulation der Proteinsynthese in Phasen oligodendroglialer Entwicklung wird häufig durch kleine RNAs umgesetzt (Dugas and Notterpek, 2011; Dugas et al., 2010; Zhao et al., 2010; Zheng et al., 2012). Bei der sncRNA 715 handelt es sich um eine 21 Nukleotide lange regulatorische RNA, welche eine starke Expression in

Oligodendrozytenvorläuferzellen aufweist und in anderen Zelltypen des ZNS, wie Astrozyten, Neuronen und Mikroglia, nur in sehr geringen Mengen nachzuweisen ist (Bauer et al., 2012). Sie bindet spezifisch innerhalb der 3'UTR der *Mbp* mRNA wodurch die Translation unterdrückt wird und ist somit für das Konzept der lokalen Translation hinsichtlich temporal gesteuerter Signale unerlässlich. In Überexpressions- und Knockdown Versuchen konnte gezeigt werden, dass zwischen der MBP Synthese und der sncRNA 715 Expression eine negative Korrelation besteht. So führt die Überexpression einer synthetischen sncRNA 715 in primären Oligodendrozyten zu einer verringerten MBP Synthese und die Inhibierung der endogen exprimierten sncRNA 715 zu einer gesteigerten MBP Synthese. Diese negative Korrelation hinsichtlich der sncRNA 715 Expression konnte zudem auf chronischen Läsionen aus humanen Proben von Multiple Sklerose Patienten übertragen werden. Diese weisen im Vergleich zur normal erscheinenden weißen Substanz normale Mengen an *Mbp* mRNA, jedoch kein MBP Protein auf, was mit einer hohen Expression der sncRNA 715 einhergeht (Bauer et al., 2012). Im Zuge einer aktuellen Studie konnte eine weitere Komponente der hnRNP A2- abhängigen RNA- Transportgranula ausgemacht werden. Ago2 ist in der Lage mit hnRNP A2, der *Mbp* mRNA, der sncRNA715 und mit der Src-Kinase Fyn zu interagieren (Müller et al., 2015). Argonaut- Proteine sind Schlüsselkomponenten des sogenannten miRISC (*microRNA-induced silencing complex*), einem Proteinkomplex, in welchem sie die translationale Regulation von mRNAs über beispielsweise kleine nicht-kodierende RNAs vermitteln. Hierbei bindet das Ago- Protein die sncRNA an dem weniger stabilen 5'Ende, was durch Hitzeschockproteine sowie Hydrolyse von ATP gewährleistet wird (Johnston et al., 2010). Weisen die sncRNA und die Ziel mRNA nun keine komplette Komplementarität auf, kommt es schließlich zu einer translationalen Hemmung (Meister, 2013). Neben den Ago-Proteinen sind unter anderem die GW182-Proteine Bestandteil des miRISC. Sie sind für die Hemmung von Ribosomen verantwortlich und somit für die Vermittlung der translationellen Repression essentiell (Eulalio et al., 2008). Angekommen an der axo-glialen Kontaktstelle, kommt es durch Bindung von axonalem L1 an oligodendrogliales F3/Contactin, das sich in einem Komplex mit $\alpha 6$ - $\beta 1$ Integrin befindetet, zur Aktivierung der Src-Kinase Fyn, welche wiederum durch Phosphorylierung verschiedener Granula- Komponenten wie hnRNP A2 und F sowie Ago zu dessen Dissoziation führt. Die Ablösung des miRISC von der *Mbp* mRNA könnte die Translation reaktivieren und somit die Myelinisierung einleiten (Müller et al., 2015, 2013; White et al., 2012, 2008).

2.3.2 Aktivierung der Translation durch die Src- Kinase Fyn

Bei der nicht-Rezeptor Tyrosinkinase Fyn handelt es sich um ein 59 kDa großes Enzym. Durch alternatives Spleißen werden zwei Isoformen generiert, die sich hinsichtlich ihres Expressionsmusters voneinander unterscheiden - das in T-Zellen exprimierte FynT und das in allen anderen Geweben sowie im Gehirn exprimierte FynB (Resh, 1998).

2.3.2.1 Struktur der Fyn- Kinase

In Oligodendrozyten werden die Src-Kinasen Fyn, Lyn und Src exprimiert, wobei Fyn hierbei die stärkste Expression aufweist (Cognato et al., 2004; Krämer-Albers et al., 2011). Alle der bisher bekannten Kinasen der Src-Familie zeichnen sich durch den gleichen in Abbildung 8 dargestellten molekularen Aufbau aus.

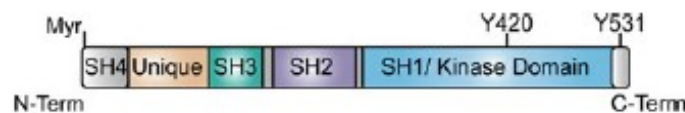


Abbildung 8: Schematische Darstellung des strukturellen Aufbaus der Fyn-Kinase. (modifiziert nach (Krämer-Albers et al., 2011)). Details siehe Text.

Sie weisen alle eine N-terminale Src-homologe 4 Domäne (*Src-homology 4*, SH4) mit einer Acetylierungsstelle und eine individuellen (*unique*) Domäne auf. Am N-Terminus findet sich zudem ein Glycin- beziehungsweise Cystein- Rest, welcher myristoyliert (Myr) werden kann, was zu einer Verankerung der Kinase innerhalb von *Lipid Rafts* der Membran führt. *Lipid Rafts* stellen spezialisierte, dynamische Mikrodomänen dar, welche reich an Cholesterin und Sphingolipiden sind und als eine Art Signalplattform zur Kommunikation zwischen Axon und Oligodendrozyt fungieren (Krämer et al., 1999). Der individuellen Domäne schließen sich zwei Proteinbinde Domänen an. Die Src-homologe 3 Domäne (*Src-homology 3*, SH3) stellt eine Protein- Protein Interaktionsstelle dar, welche nicht nur in Proteinen der Src- Familie verbreitet ist (Mayer, 2001). Dagegen zeichnet sich die Src-homologe 2 Domäne (*Src-homology 2*, SH2) durch Bindung phosphorylierter Tyrosin- Reste aus. Daran schließt sich nun die Src-homologe 1 Domäne (*Src-homology 1*, SH1) beziehungsweise Kinase- Domäne an, welche sich strukturell erneut in eine kleinere N-terminale Domäne und eine größere C-terminale Domäne unterteilen lässt. Entsprechend des Konformationszustandes der Kinase-Domäne kann eine Regulation des Aktivitätszustandes erfolgen.

2.3.2.2 Aktivierung der Fyn- Kinase

Die Fyn-Kinase kann in zwei Aktivitätszuständen, reguliert durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung, vorliegen. In der nachfolgenden Abbildung 9 sind die beiden Zustandsformen dieses Enzyms schematisch dargestellt.

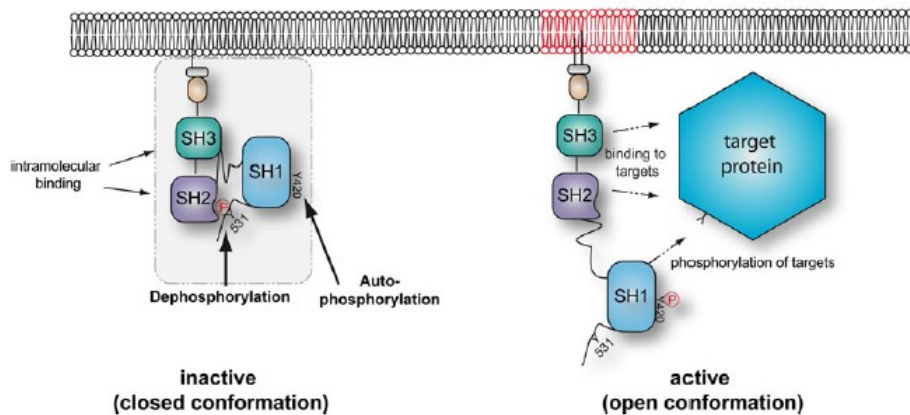


Abbildung 9: Regulation des Aktivitätszustandes der Fyn-Kinase. Im inaktiven Zustand der Fyn- Kinase weist diese eine geschlossene Konformation auf, welche durch Ausbildung einer intramolekularen Bindung zwischen der SH2- Domäne und einem phosphorylierten Tyrosin an der Position 531 (Y531) sowie durch Ausbildung einer Bindung zwischen SH3-Domäne und der Linker Region der SH2 Domäne bedingt wird. Durch Dephosphorylierung und Auto-Phosphorylierung (Y420) wird die Kinase aktiviert und kann Zielproteine phosphorylieren. Detail siehe Text (modifiziert nach (Krämer-Albers et al., 2011). Details siehe Text.

In der inaktiven Konformation liegt das Enzym in einer geschlossenen Form vor, wobei der C- terminale konservierte regulatorische Tyrosinrest an Position 531 (Y531) phosphoryliert ist und dadurch eine intramolekulare Bindung mit der SH2 Domäne ausbilden kann. Durch Ausbildung einer intramolekularen Bindung zwischen der SH3 Domäne und der so genannten Linker Region der SH2 Domäne wird die geschlossene beziehungsweise inaktive Konformation des Enzyms stabilisiert. Es wird vermutet, dass die Phosphorylierung durch andere Kinasen, wie beispielsweise der C-terminalen Src Kinase (Csk), ausgeführt werden könnte (Nada et al., 1993). Eine Dephosphorylierung des Y531 durch Phosphatasen, wie beispielsweise die transmembrane Protein Phosphatase (PTP) alpha, epsilon und lambda oder durch Shp1 und Shp2 (Roskoski, 2005), resultiert in einer Aufhebung der intramolekularen Bindung zur SH2 Domäne, wodurch die Fyn- Kinase ihre offene Konformation einnimmt. Dadurch werden zum einen die Proteinbinde- Domänen zugänglich und zum anderen wird eine intermolekulare Autophosphorylierung des Tyrosinrestes an Position 420 (Y420) der SH1 Domäne ermöglicht, was in einer Stabilisierung des aktiven Zentrums resultiert (Roskoski, 2004). Nun können über die SH2/SH3 Domäne schließlich Zielproteine gebunden und phosphoryliert werden.

2.3.2.3 Rolle der Fyn- Kinase in Oligodendrozyten

Der Höhepunkt der Fyn- Kinase Aktivität geht in Oligodendrozyten mit der Initiation der Myelinisierung einher (Krämer et al., 1999). Sie übernimmt eine entscheidende Rolle bei der Integration neuronaler Signale, um die morphologische Differenzierung der Oligodendrozyten voran zu treiben, was durch Fyn-defiziente Mäuse untermauert wird. Diese weisen neben einer Hypomyelinisierung im ZNS auch eine abnormale Oligodendrozyten- Entwicklung auf, was zum Beispiel durch ein vermindertes Auswachsen oligodendroglialer Ausläufer gekennzeichnet ist (White and Krämer-Albers, 2014).

Vom Axon stammende, lösliche oder membrangebundene Faktoren aktivieren schließlich die in *Lipid Rafts* verankerte Fyn- Kinase, was in einer Aktivierung dreier spezifischer Signalkaskaden resultiert (White and Krämer-Albers, 2014), was schematisch in der nachfolgenden Abbildung 10 visualisiert wird.

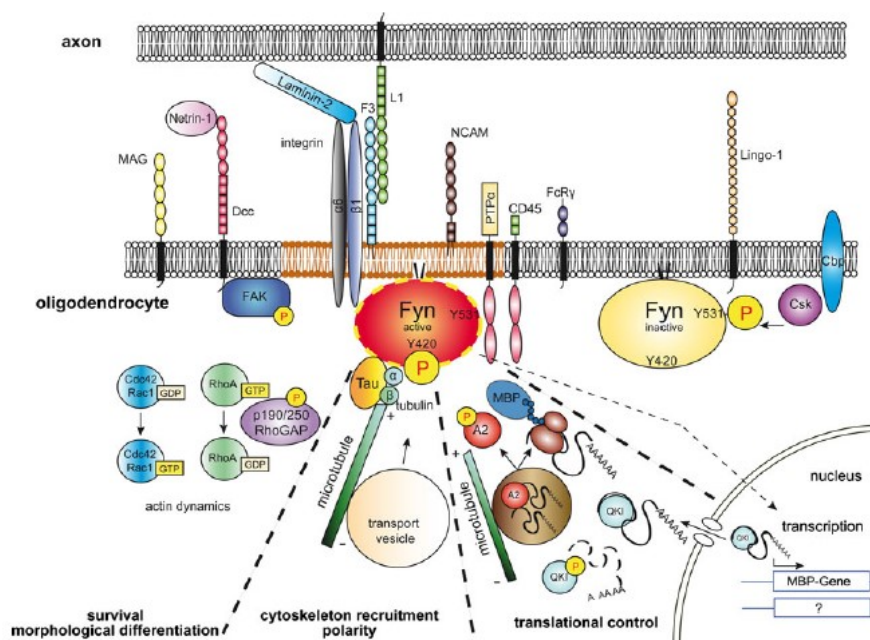


Abbildung 10: Funktion der Fyn-Kinase in Oligodendrozyten. Vom Axon stammende Signale werden von oligodendroglialen Rezeptoren detektiert und resultieren in der Aktivierung der in spezialisierten Membranbereichen, den *Lipid Rafts*, lokalisierten Fyn- Kinase. Diese reguliert innerhalb des Oligodendrozyten drei Hauptwege. Die Aktivierung der morphologischen Differenzierung durch den RhoA-abhängigen Signalweg (links); die Rekrutierung sowie Stabilisierung des mikrotubulären Zytoskeletts mittels Tau- Interaktion (Mitte); die Aktivierung der lokalen Translation von MBP vermittelt durch eine Phosphorylierung verschiedener Komponenten des RNA-Transportgranula (rechts). (modifiziert nach (Krämer-Albers et al., 2011). Details siehe Text.

Über die Aktivierung der RhoA-GTPase wird die Aktin- Zytoskelett- Dynamik moduliert, das Zellüberleben vermittelt sowie die morphologische Differenzierung der Oligodendrozyten

aktiviert. Des Weiteren wird durch Bindung des Tubulin-assoziierten Proteins Tau an die Fyn- Kinase die Rekrutierung und Stabilisierung von mikrotubulären Zytoskelettelementen gestartet, was dem Oligodendrozyten eine Polarität verleiht. Letztlich wird wie zuvor bereits beschrieben (siehe 2.3.1) die lokale Translation des Myelin basischen Proteins initiiert (Klein et al., 2002; Liang et al., 2004; White et al., 2008). In Abhängigkeit axonaler Signale induziert die Fyn-Kinase somit Signalwege die essentiell an der Umsetzung einer lokal- und temporal regulierten Myelinformierung beteiligt sind (Krämer-Albers et al., 2011).

2.4 Zielsetzung

Oligodendrozyten sind die myelinisierenden glialen Zellen des zentralen Nervensystems (ZNS). Die multilamellare Myelinschicht wird durch eine umfangreiche Umwicklung axonaler Segmente mit den oligodendroglialen Fortsätzen gewährleistet. Dadurch werden die axonalen Segmente der Nervenzellen zum einen elektrisch isoliert, was in einer schnellen saltatorischen Erregungsleitung resultiert und zum anderen trägt sie maßgeblich zur Aufrechterhaltung neuronaler Funktionalität durch ihre neuroprotektiven Eigenschaften bei. Innerhalb der Oligodendrozyten fungiert die nicht-Rezeptor Tyrosin-Kinase Fyn als wichtiges Signalmolekül. Neben der Regulation morphologischer Differenzierung in Oligodendrozyten, ist sie im Wesentlichen ein Integrator axo-glialer Signalkaskaden, welche die lokale Synthese des Myelin basischen Proteins (MBP) induzieren und damit essentiell für die Formierung der Myelinschicht ist. Das Myelin-assoziierte Oligodendrozyten basische Protein (MOBP) gleicht MBP hinsichtlich mehrerer Aspekte, weshalb im Zuge der vorliegenden Arbeit zum einen anhand verschiedener experimenteller Ansätze in kultivierten primären Oligodendrozyten geklärt werden soll, ob die oligodendrogliale exprimierte MOBP- Proteinfamilie ebenfalls einer lokal sowie temporal regulierten Translation unterliegt und welche Signalmoleküle für die Initiation der Translation verantwortlich sind. Da die zelluläre Funktion der abundanten Proteinfamilie bisher ungeklärt ist, sollte zum anderen untersucht werden, welchen Effekt erhöhte sowie erniedrigte MOBP Proteinmengen in kultivierten primären Oligodendrozyten zur Folge haben, um neue Erkenntnisse auf funktioneller Ebene zu erlangen.

3 Material und Methode

3.1 Geräte, Reagenzien und Materialien

3.1.1 Geräte

Tabelle 1: Verwendete Geräte

	Hersteller	Bezeichnung
Gel-Laufkammer	Biorad	Mini-Protean Tetra System
	Invitrogen	Novex Mini cell
	VWR	Mini Gel II
Heizblock	Techne	DRI- Block DB2D
Imager	Biorad	Chemidoc XRS
Inkubator	Stuart	Orbital Incubator SI50
	Heraeus	Hera Cell 240
Mikroskop	Leica	LEITZ DMIRB
	Olympus	IX81 Mikroskop
		20x Objektiv UPlanFLN (NA=0.50)
		40x Objektiv UPlanFLN (NA=0.75)
		Fluoreszenz CCD-Kamera XM10
Netzteil	Biorad	PowerPac™ HC
	Consort	E802
PCR Gerät	Eppendorf	Mastercycler Personal
Pumpe	Integra	Vacusip

RT-PCR Gerät	Roche Applied Science	Light Cycler 1.5
	Life technologies	StepOnePlus™
Schüttler	Heidolph	Duomax 1030
Software	Adobe	Illustrator CS4
		Photoshop CS4
	Biorad	Image Lab 2.0
	ImageJ	FijiSurfTool
	Life technologies	StepOne Software V2.3
	Microsoft	Excel
	Pfaffl, Horgan, Vainstein, Avery	REST- gene regulation
Spektrophotometer	PeqLab	Nano Drop 2000
Sterilbank	Kojair	Biowizard
Vortexer	Phoenix Instruments	RS-VA10
Waage	Labotec Wiesbaden	Scaltec SBA 52
		Scaltec SBA 31
Zell-Dissozierung	Miltenyi Biotec	MACS Multi Stand
		quadro MACS
		MACS Mix
Zentrifugen	Eppendorf	Centrifuge 5415R
	Heraeus	Labofuge 6000
	Roth	Micro centrifuge

3.1.2 Reagenzien

Tabelle 2: Verwendete Reagenzien

Hersteller	Reagenz
Biozym	SieveGP Agarose
Life technologies	NuPAGE LDS Sample Buffer (4x)
	PureLink™ HiPure Plasmid Maxiprep Kit
	RNAiMax
Millipore	Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP Substrate
Miltenyi Biotec	Anti-AN2 MicroBeads
	MACS NeuroBrew-21
	Neural Tissue Dissociation Kit (P)
Promega	PureYield™ Miniprep Kit
Qiagen	DNase
	miRNeasy-Mini Kit
Roche Applied Sciene	Phosphatase- Inhibitor
	Protease- Inhibitor
Roth	Milchpulver
	RNAse Zap
	Roti Histofix (PFA)
	Agarose NEEO Ultra-Qualität
Sigma	Tween20

3.1.3 Materialien

Die verwendeten Falcons sowie die sterilen Plastikwaren für die Zellkultur wurden von der Firma Greiner sowie Nunc bezogen. Die Glaswaren wurden von der Firma Schott und Gibco verwendet.

3.2 Lösungen, Puffer und Medien

Tabelle 3: Verwendete Lösungen, Puffer und Medien

Allgemeine Lösungen und Puffer	
PBS	150mM NaCl; 8mM Na ₂ HPO ₄ ; 1,7mM NaH ₂ PO ₄ ; pH 7,2
TBS	150mM NaCl; 50mM Tris; pH 7,2
TBST	TBS + 0,1% (v/v) Tween20
Allgemeine Medien	
LB Medium	20g Trypton; 20g NaCl; 10g Hefeextrakt; mit H ₂ O auf 2L auffüllen; autoklavieren
LB Agar	160ml LB Medium; 2,4g Agar-Agar; autoklavieren
Molekularbiologie	
1% Agarosegel	1% NEEO Ultra Qualität; in 1xTAE aufkochen
4% Agarosegel	3% Sieve GP Agarose; 1% NEEO Ultra Qualität; in 1xTAE aufkochen
50x TAE Puffer	242g Tris (2M); 100ml 0,5M EDTA pH 8,0 (50mM); 57,1ml Essigsäure; auf 1L mit ddH ₂ O auffüllen

Proteinbiochemie	
Blockierlösung	4% (w/v) Milchpulver in TBST
Lyse Puffer	50mM Tris; 150mM NaCl; 1mM EDTA; 1% (v/v) Triton X-100
SDS- Laufpuffer	10x Rotiphorese von Roth 1:10 oder 20x MOPS von Life technologies 1:20 mit ddH ₂ O verdünnen
Western-Blot Stripping Puffer	1 M Glycin auf pH 2,0 einstellen
Western Blot Transferpuffer	24mM Tris; 192mM Glycine; 20% Ethanol abs.; in ddH ₂ O
Zellkultur	
10x Poly-L-Lysine (PLL)	1g Poly-L-Lysine wird in 1L sterile dH ₂ O gelöst
Trypsin/EDTA (TE)	0,01% Trypsin, 0,02% EDTA in HBSS (1x)
DMEM 1%/10% HS	DMEM + 1%/10% HS
Sato Medium (Oli- <i>neu</i>)	DMEM + 10µg/ml Transferrin, 100µM Putrescine, 200nM Progesteron, 500nM TIT, 220nM Natriumselenit, 520nM L-Thyroxin, 25µg/ml Gentamycin, 2% (v/v) HS
MACS Kultivierungsmedium (primäre Oligodendrozyten)	MACS Neuro-Medium; 2mM L-Glutamine; 100 U/ml Pen/Strep; 2% (v/v) MACS NeuroBrew-21
Proliferationsmedium (primäre Oligodendrozyten)	MACS Kultivierungsmedium + 4,2mg/ml Forskolin, 10µg/ml CNTF, 10µg/ml PDGF, 1µg/ml NT-3
Differenzierungsmedium (primäre Oligodendrozyten)	MACS Kultivierungsmedium + 4,2mg/ml Forskolin, 10µg/ml CNTF, 4µg/ml T3
Mowiol	7,2g Mowiol 4-88; 18g Glycerol; 18ml H ₂ O; 36ml 0,2M Tris

3.3 Antikörper

3.3.1 Primärantikörper

Tabelle 4: Verwendete Primärantikörper

Antigen	Spezies	Verdünnung	Hersteller
AN2	Ratte	1:100 IZC	J. Trotter, Mainz
CNP	Maus	1:500 WB; 1:50 IZC	Sigma-Aldrich
Fyn	Kaninchen	1:250 WB	BD
GAPDH	Kaninchen	1:5000 WB	Bethyl
MBP	Ratte	1:500 WB; 1:50 IZC	AbD Serotec
MOBP	Kaninchen	1:20 000 WB; 1:10 000 IZC	Pineda
MOG	Maus	1:1000 WB	C.Linington, Glasgow
Myc (9E10)	Maus	1:50 IZC	C. Pietrzik, Mainz
PLP aa3	Ratte	1:10 WB	J. Trotter, Mainz
Src P418	Kaninchen	1:1000 WB	Invitrogen
Tubulin	Maus	1:5000 WB	Sigma-Aldrich

WB= Western Blot; IZC= Immunzytochemie

3.3.1.1 Gewinnung polyklonaler Antikörper gegen ein synthetisches Peptid

Zur Gewinnung eines polyklonalen Antikörpers gegen alle MOBP Isoformen durch den Antikörper-Service Pineda, wurde zunächst eine Epitopenalyse der kleinsten Isoform MOBP69 durchgeführt, da die 68 N-terminalen Aminosäurereste in allen Isoformen identisch sind. Die durchgeführte Analyse der Sekundärstruktur des Proteins zur Ermittlung passender Epitope beruht auf der Erstellung eines Oberflächenprofils anhand von Algorithmen bezüglich des zu analysierenden Proteins (Parker et al., 1986). Unter Berücksichtigung aller

Parameter wurde die in der nachfolgenden Tabelle 5 dargestellte Peptidsequenz des Proteins MOBP69 zur Antikörpergewinnung ausgewählt.

Tabelle 5: Peptidsequenz zur MOBP- Antikörpergewinnung

Bezeichnung	Aminosäuresequenz
MOBP69-Nterm	NH2- SQKVAKEGPRLSKNQKFC –CONH2

Die N- beziehungsweise C-terminal hinzugefügten Lysin- oder Cysteinreste dienen der kovalenten Kopplung des synthetisierten Peptids an die Carrierproteine [Keyhole limpet haemocyanin (KLH)] zur Erhöhung der Immunogenität. Da die Peptidsequenz der angegebenen MOBP Isoform in Ratte und Maus identisch ist (siehe Uniprot Identifier Q63327-3), sollte der MOBP69-Nterm Antikörper in beiden Organismen gut funktionieren. Als Versuchstier zur Herstellung des polyklonalen Antikörpers wurden drei Kaninchen genutzt. Nach Austesten der Antikörper haben sich die in Tabelle 4 angeben Verdünnungen in Western Blot und Immunzytochemie als gut erwiesen.

3.3.2 Sekundärantikörper

Tabelle 6: Verwendete Sekundärantikörper

Spenderspezies	Zielspezies	Konjugation	Verdünnung	Hersteller
Ziege	Ratte	HRP	1:10 000 WB	Dianova
Ziege	Kaninchen	HRP	1:10 000 WB	Dianova
Esel	Maus	HRP	1:10 000 WB	Dianova
Ziege	Kaninchen	DL488	1:100 IZC	Dianova
Ziege	Kaninchen	Cy3	1:150 IZC	Dianova
Ziege	Maus	Alexa568	1:400 IZC	Dianova
Ziege	Maus	DL488	1:100 IZC	Dianova
Ziege	Ratte	Cy3	1:300 IZC	Dianova
Ziege	Ratte	Cy5	1:300 IZC	Dianova

WB= Western Blot; IZC= Immunzytochemie; HRP= horseradish peroxidase

3.4 Plasmide, Primer, siRNA

Die verwendeten Plasmide, welche kommerziell erworben oder nicht selbst kloniert wurden, sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

Tabelle 7: verwendete Plasmide

Plasmid	Hersteller
pEGFP- C3	Clontech
<i>Renilla</i> Luziferase Reporter	Promega
pcDNA_FynBWT	Constantin Gonsior
pcDNA_FynB-	Constantin Gonsior
pAM_MBP_FynBWT_MycHis	Christina Müller
pAM_MBP_FynB-_MycHis	Christina Müller
pAM_MBP_eGFP	M. Klugmann

Zusätzlich wurden mittels standardisierter Klonierungstechniken die ffluziMOBP-3'UTR Reporterkonstrukte 81a, 99, 170, die MOBP-ORF Expressionsvektoren 71, 169, 170 sowie die mbpMOBP-ORF Expressionsvektoren 81, 169, 170 hergestellt (siehe 3.6.2.1.1, 3.6.2.1.2, 3.6.2.2.1). Mit dem *QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis* Kit wurde des Weiteren ein *Firefly* Luziferase Reporter Konstrukt mit mutiertem A2RE in der MOBP99 3'UTR hergestellt (siehe 3.6.2.2.2).

Die in der Polymerasekettenreaktion (PCR) zur Herstellung der ffluziMOBP-3'UTR Reporterkonstrukte, der MOBP-ORF Expressionsvektoren sowie der mbpMOBP-ORF Expressionvektoren verwendeten entsalzten Primer sind in der nachfolgenden Tabelle (alle in 5'-3'Orientierung) zusammengefasst. Die von Invitrogen bezogenen Primer für die zielgerichtete Mutagene zur Herstellung des ffluziMOBP99mut Reporters wurden zudem HPLC- aufgereinigt.

Tabelle 8: Verwendete PCR Primer zur Amplifikation der MOBP- 3'UTRs oder MOBP- ORFs

Name		Primer Sequenz
MOBP81A 3'UTR	left	GCCTCGAATTC CCG GAGAAGGGACTTCTCGTG
	right	C GGG CCCTTTT GAT CCATCCCCAGGTT
MOBP99 3'UTR	left	GCCTCGAATTC CAAT GCAATAGAATTTAAAAATG
	right	GCCATCTAGAAATTTAGTAGTTTCTGGTTATTCCCAT
MOBP99 3'UTR mut	left	CCCTCCACGCCGTCATGTCCCGGGTTCATGCTCGCATTAAACC
	right	GGTTAATGCGAGCATGAACCCGGGACATGACGGCGTGGAGGG
MOBP170 3'UTR	left	GCCTCGAATTC ACC CATCTCTTGC
	right	GCCATCTAGACAAACAGAGGGGGTTTAATG
MOBP71 ORF	left	GCCTCGAATTCATGAGTCAAAAAGTGG
	right	TATTTT GCGGCCG CTTATCTGGTCTTCTG
MOBP169 ORF	left	GCCTCGAATTCATGAGTCAAAAAGTGG
	right	TATTTT GCGGCCG CTCAGAACCTAGGAG
MOBP170 ORF	left	GCCTCGAATTCATGAGTCAAAAAGTGG
	right	TATTTT GCGGCCG CTTACCAGAACCTAGG
mbpMOBP-ORF	left	GCGAATTCATGAGTCAAAAAGTGG
mbpMOBP81-ORF	right	TATTTT GCGGCCG CTCACTTTTTTCTTGG
mbpMOBP169-ORF	right	TATTTT GCGGCCG CTCAGAACCTAGGAG
mbpMOBP170-ORF	right	TATTTT GCGGCCG CTTACCAGAACCTAGG

Die entsalzten Primer für die Bestimmung des Genotyps der *shiverer* Mäuse sind in der nachfolgenden Tabelle dargestellt:

Tabelle 9: verwendete Primer für die Genotypisierung der *shiverer* Mäuse

Name		Primer Sequenz
MBP	left	AGCTCTGGTCTTTCTTGCAAG
	right	CCCCGTGGTAGGAATATTACATAAC
shi	left	CAGGGGATGGGGAGTCAGAAAGTGAG
	right	AGTTATGTGTGTGTGTGCTTATCTAGTGTA

Die Realtime-PCR (qPCR) Primer und die jeweils adäquate Sonde (Roche Applied Science) sind in der folgenden Tabelle 10 aufgeführt und wurden mit Hilfe des Universal ProbeLibrary Assay Design Center (Roche Applied Science) entworfen. Für die 18S ribosomale RNA (Rn18S) wurde dahingegen der TaqMan Assay Mm03928990_g1 von Applied Biosystems genutzt.

Tabelle 10: Verwendete Primer und zugehörige Sonden in der Realtime- PCR

Primer		Sequenz	UPL Sonde
MOBP	left	GGCTCTCCAAGAACCAGAAG	#74
	right	GCTTGGAGTTGAGGAAGGTG	
MBP	left	AACATTGTGACACCTCGAACA	#58
	right	TGTCTCTTCCTCCCCAGCTA	
Firefly	left	TGAGTACTTCGAAATGTCCGTTT	#29
	right	GTATTCAGCCCATATCGTTTCAT	
Renilla	left	GGAGAATAACTTCTTCGTGGAAAC	#145
	right	GCTGCAAATTCTTCTGGTTCTAA	
Actin	left	TGACAGGATGCAGAAGGAGA	#106
	right	CGCTCAGGAGGAGCAATG	
G6PDH	left	GAAAGCAGAGTGAGCCCTTC	#78
	right	CATAGGAATTACGGGCAAAGA	
WPRE	left	ATCCAGCGGATCTTCCTT	#74
	right	ACTCGTCTGAGGGCGAAG	

Alle verwendeten PCR- sowie qPCR Primer (siehe Tabelle 8, Tabelle 9, Tabelle 10) wurden von der Firma Invitrogen bezogen und in einer Konzentration von 20µM eingesetzt.

Die verwendeten siRNAs, die von der Firma Dharmacon bezogen wurden, sind in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt. Zusätzlich wurde für die MOBP knockdown Versuche (siehe 3.8.2.1, 4.2.1) die Kontroll-siRNA *AllStars Negative Control* der Firma Qiagen verwendet.

Tabelle 11: verwendete siRNAs für die Herunterregulierung der Fyn- und MOBP- Mengen in primären Oligodendrozyten

Bezeichnung	Target	Sequenz	Hersteller
	MOBP	GUGAGAUCGUGGACCGCAAUU	Dharmacon
ON-TARGET plus SMARTpool siRNA	Fyn	GGUGCGAAGUUUCCCAUUA	
		GCACGUGACUCGUUGUUUC	
		UAACUGUGGUUUCAUCAAG	
		CCACGUCAAACAUAUAAA	
ON-TARGET plus Non-targeting pool	negative control	UGGUUUACAUGUCGACUAA	
		UGGUUUACAUGUUGUGUGA	
		UGGUUUACAUGUUUUCUGA	
		UGGUUUACAUGUUUCCUA	

3.5 RNA- Analyse

3.5.1 RNA- Extraktion

3.5.1.1 Phenol- Chloroform Extraktion

Die zu untersuchenden mRNAs der 3'UTRs von MOBP81a, 99, 170, sowie die *open reading frames* (ORF) von MOBP71,81,169,170 wurden aus dem Gesamthirn der Ratte extrahiert und anschließend mithilfe des RNeasy-Mini-Kit (Qiagen) aufgereinigt. Dabei wurde ein DNase-Verdau durchgeführt (Qiagen). Die Elution erfolgte in 50µl RNase-freiem Wasser (siehe (Schäfer, 2012)).

3.5.1.2 miRNeasy Mini Kit (Qiagen)

Die zu untersuchenden mRNAs aus primären Oligodendrozyten, aus Polysomenfraktionen primärer Oligodendrozyten, sowie aus dem Gesamthirn der *wildtyp* und *shiverer* Mäuse wurden mit dem miRNeasy Mini Kit von Qiagen nach Angaben des Herstellers extrahiert. Um

einer Verunreinigung mit genomischer DNA vorzubeugen, wurde ein DNase Verdau mit DNase I (Qiagen) durchgeführt und abschließend erfolgte die Elution der RNA in 30µl DEPC.

Die primären Oligodendrozyten wurden mit Hilfe eines Zellschabers in 700µl Qiazol vom Kultivierungsgefäß abgelöst und in die RNA Extraktion eingesetzt, wohingegen die Gewebeproben der *wildtyp* und *shiverer* Mäuse mit Hilfe eines TissueRuptor (Qiagen) in 700µl Qiazol homogenisiert wurden.

3.5.2 Reverse Transkription der mRNA

Die extrahierte mRNA wurde mit dem Transkriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche Applied Science) mit Random hexameren Primern in cDNA nach Angaben des Herstellers umgeschrieben.

3.6 DNA- Analyse

3.6.1 DNA- Extraktion

3.6.1.1 Lyse von Schwanzbiopsien

Um den Genotyp der *shiverer* Mäuse zu bestimmen, wurden die vom ZVTE gelieferten Schwanzbiopsien zunächst lysiert. Die Gewebeproben wurden dafür in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt und anschließend 40min bei 95°C und 500rpm im Thermomixer mit 15µl LysereagenzA (siehe Tabelle 3) inkubiert. Danach wurden 15µl LysereagenzB (siehe Tabelle 3) hinzupipettiert und das Gewebe mit einer Pipettenspitze zerdrückt und anschließend gevortext.

Anschließend erfolgte die Amplifikation der aufgeschlossenen DNA mittels PCR mit spezifischen Primern gegen das *MBP* Gen und das *shiverer* Gen (siehe Tabelle 9).

3.6.1.2 Extraktion viraler DNA zur Titerbestimmung

Um die Konzentration der von R. Jelinek (AG Prof. Dr. B. Lutz, Institut für Physiologische Chemie, Mainz) hergestellten AAV-Vektoren (adeno-assoziiertes Virus, AAV) zu bestimmen, musste zunächst die virale DNA extrahiert werden.

Hierfür wurden in Duplikaten 2µl Virus mit 46µl sterilem Wasser und 50µl 2xABI Puffer (siehe Tabelle 3) gemischt. Anschließend wurde der Ansatz nach Zupipettieren von 1µl DNase TypIV für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Um die DNase wieder zu inaktivieren, wurde der Versuchsansatz 10 Minuten bei 75°C inkubiert. Nachfolgend wurde 1µg ProteinaseK für eine Stunde bei 50°C hinzugegeben und abschließend wurde diese wiederum für 20 Minuten bei 95°C inaktiviert.

3.6.2 Polymerase- Ketten- Reaktion (PCR)

3.6.2.1 PCR auf Gesamthirn- cDNA

3.6.2.1.1 Herstellung der ffluziMOBP-3'UTR Reporterkonstrukte

Die zu untersuchenden Bereiche in der cDNA (3'UTR) von MOBP81A, MOBP99 und MOBP170, die das A2-Response Element beinhalten (MOBP81A, MOBP99) oder kein A2-Response Element beinhalten (MOBP170), wurden mithilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion amplifiziert, wobei die Reaktionsbedingungen analog zu den Angaben in der Benutzeranleitung für die High Fidelity Phusion Polymerase (NEB) gewählt wurden (Isabelle Schäfer, Diplomarbeit Februar 2012).

3.6.2.1.2 Herstellung der MOBP- ORF Expressionsvektoren

Die kodierenden Bereiche (ORF) von MOBP71, MOBP169 und MOBP170 in der Ratten Gesamthirn cDNA wurden mit Hilfe der Polymerase- Ketten- Reaktion amplifiziert. Die Anlagerungsstellen der Primer wurden so gewählt, dass im weiteren Versuchsablauf die beiden Restriktionsenzyme EcoRI und XhoI an den Enden der amplifizierten DNA-Fragmente schneiden können und dadurch sticky ends entstehen (siehe Tabelle 8). Die Reaktionsbedingungen wurden analog zu den Angaben in der Benutzeranleitung für die High Fidelity Phusion Polymerase (NEB) gewählt. Die Annealing-Temperatur im PCR-Programm musste anhand der Schmelztemperaturen (T_m-5) der einzelnen Primer ausgetestet werden. Es ergaben sich somit für die drei zu amplifizierenden DNA-Fragmente folgende Programme im Thermo-Cycler.

Tabelle 12: PCR- Programm zur Amplifikation des MOBP71 ORF aus der Ratten- Gesamthirn cDNA

	Temperatur [°C]	Zeit [min]	
Initiale Denaturierung	98	1	
Denaturierung	98	0,45	Schritte 2- 4 wurden 35 mal wiederholt
Primer- Anlagerung	51	0,45	
Elongation	72	2	
Finale Elongation	72	10	

Tabelle 13: PCR- Programm zur Amplifikation des MOBP169/170 ORF aus der Ratten- Gesamthirn cDNA

	Temperatur [°C]	Zeit [min]	
Initiale Denaturierung	98	1	
Denaturierung	98	0,45	Schritte 2- 4 wurden 35 mal wiederholt
Primer- Anlagerung	50	0,45	
Elongation	72	2	
Finale Elongation	72	10	

3.6.2.2 PCR auf ein Plasmid

3.6.2.2.1 Herstellung der mbpMOBP- ORF Expressionsvektoren

Amplifiziert wurde der *open reading frame* (ORF) der MOBP-Isoformen 71, 81, 169, 170 mittels einer PCR auf die einzelnen zuvor hergestellten MOBP-ORF Expressionsvektoren (siehe 3.6.2.1.2). Bei dieser Reaktion wurden die Anlagerungsstellen der Primer so gewählt, dass die Enden der amplifizierten Fragmente durch die Restriktionsenzyme EcoRI und NotI (NEB) geschnitten werden können und *sticky ends* entstehen (siehe Tabelle 8). Für diese PCR wurde die High Fidelity Phusion Polymerase entsprechend der Benutzeranleitung von NEB verwendet. Als Konzentration für das Template wurden jeweils 500ng eingesetzt. Die Annealing-Temperatur im PCR-Programm musste anhand der Schmelztemperaturen (T_m -5) der einzelnen Primer ausgetestet werden. Es ergaben sich somit für die drei zu amplifizierenden DNA-Fragmente folgende Programme im Thermo-Cycler.

Tabelle 14: PCR- Programm zur Amplifikation des MOBP81 ORF aus dem zuvor klonierten MOBP81 Expressionsvektor

	Temperatur [°C]	Zeit [min]	
Initiale Denaturierung	98	1	
Denaturierung	98	0,45	Schritte 2- 4 wurden 30 mal wiederholt
Primer- Anlagerung	48,1	0,45	
Elongation	72	0,30	
Finale Elongation	72	10	

Tabelle 15: PCR- Programm zur Amplifikation des MOBP169/170 ORF aus den zuvor klonierten MOBP169- und MOBP170- Expressionsvektors

	Temperatur [°C]	Zeit [min]	
Initiale Denaturierung	98	1	
Denaturierung	98	0,45	Schritte 2- 4 wurden 30 mal wiederholt
Primer- Anlagerung	48,1	0,45	
Elongation	72	0,45	
Finale Elongation	72	10	

3.6.2.2.2 Zielgerichtete Mutagenese

Zur Mutation des kompletten A2RE des zuvor erstellten ffluziMOBP99 Reporterkonstruktes (siehe 3.6.2.1.1, 3.6.4.1, 3.6.4.9.1) wurde das *QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis* Kit von Stratagene verwendet. Hierzu wurden zunächst zwei komplementäre Primer entworfen, die die Sequenz des A2RE durch eine zufällige Kombination an Aminosäuren ersetzen sollte (siehe Tabelle 8). Die Sequenz der erstellten Primer wurde so gewählt, dass zusätzlich eine Restriktionsschnittstelle für SmaI integriert wurde. In der nachfolgenden Tabelle sind die benötigten Reagenzien zur Synthese des mutagenen Plasmids zusammengefasst.

Tabelle 16: PCR- Versuchsansatz zur Erstellung des mutagenen ffluziMOBP99mut Plasmids

Reagenz		Menge
ffluciMOBP99 Reporterkonstrukt		38ng
Mutation Primer	left	125ng
	right	
dNTP Mix		1µl
QuikSolution reagent		1,5µl
QuikChange Lightning Enzyme		1µl
ddH ₂ O		ad 50µl

Der Reaktionsansatz wurde anschließend mit dem folgenden Programm im PCR-Cycler amplifiziert.

Tabelle 17: PCR- Programm für die *zielgerichtete Mutagenese* im A2RE des ffluziMOBP99 Reporterkonstrukt

	Temperatur [°C]	Zeit [sek]	
Präinkubation (Denaturierung)	95	120	Schritte 2- 4 wurden 18 mal wiederholt
Denaturierung	95	20	
Primer- Anlagerung	60	110	
Elongation	68	240	
Finale Elongation	68	5	

Die amplifizierten Proben wurden abschließend noch mit 2 µl *DpnI* bei 37°C für 5 min verdaut, um spezifisch die methylierte, nicht mutierte, Ausgangs-DNA abzubauen. Die mutierte DNA wurde anschließend in superkompetente Zellen XL10-Gold (Stratagene) transformiert (siehe 3.6.4.9.2).

3.6.2.3 Genotypisierung

Um den Genotyp der *shiverer* Mäuse zu bestimmen, erfolgte nun die Amplifikation der zuvor aufgeschlossenen DNA (siehe 3.6.1.1) mittels PCR mit spezifischen Primern gegen das *MBP* Gen und das *shiverer* Gen. Hierzu wurde ein Mastermix aus den verschiedenen Reaktionskomponenten, wie in der nachfolgenden Tabelle dargestellt, angefertigt.

Tabelle 18: PCR- Versuchsansatz zur Genotypisierung der *shiverer* Mäuse

	MBP	shi
dH ₂ O	8,8 µl	8,8 µl
5x Go Taq Puffer	4 µl	4 µl
MgCl ₂ [25mM]	1 µl	1 µl
dNTP (1:5)	1 µl	1 µl
Primer MBP-wt-s [10µM]	0,5 µl	-
Primer MBP-wt-a [10µM]	0,5 µl	-
Primer shi-wt-s [10µM]	-	0,5 µl
Primer shi-wt-a [10µM]	-	0,5 µl
DMSO [100%]	1 µl	1 µl
Go Taq Polymerase	0,2 µl	0,2 µl
Gesamtvolumen	17µl	17µl

Es wurden jeweils 3µl der einzelnen Gewebelysate in je 17µl MBP- Mastermix und shi- Mastermix einpipettiert. Anschließend wurden die gewünschten DNA- Fragmente mit dem nachfolgend in Tabelle 19 dargestellten Programm im Thermo- Cycler amplifiziert.

Tabelle 19: PCR- Programm zur Genotypisierung der *shiverer* Mäus

	Temperatur [°C]	Zeit [min]	
1	95	3	
2	57	0,30	Schritte 2- 4 wurden 38 mal wiederholt
3	72	0,45	
4	95	0,30	
5	57	1	
6	72	5	

3.6.3 Realtime- PCR

Die für die Realtime-PCR benötigte cDNA wurde mittels der Reversen Transkription nach Roche aus der aus primären Oligodendrozyten, Polysomenfraktionen primärer Oligodendrozyten, sowie aus der aus dem *shiverer* Gesamthirn extrahierten RNA gewonnen, oder durch Lyse der Viren extrahiert (siehe 3.6.1.2)

Es sollte analysiert werden, ob eine Regulation auf RNA-Ebene des ffluziMOBP81a Reporterkonstruktes bei mit FynWT transfizierten Zellen gegenüber mit Fyn- transfizierten Oli-*neu* Zellen erfolgt. Zudem sollten die *Mobp*, *Mbp* und β -*Aktin* Mengen in 3DIV, 5DIV und 7DIV gegenüber 1DIV kultivierten primären Oligodendrozyten untersucht werden. Eine *Mobp*- und *Mbp*- Anreicherung in der A2-IP gegenüber Kontroll-IP und die translationelle Aktivierung von *Mobp*, *Mbp* und *Aktin* nach 6DIV im Vergleich zu 2DIV mittels Polysomenfraktionierung sollte ebenfalls evaluiert werden. Auch die Titerbestimmung der verwendeten Viren erfolgte im Zuge der qPCR- Analyse.

Die Durchführung der quantitativen Realtime-PCR (qPCR) erfolgte entweder unter Nutzung des LightCycler® TaqMan® Master Kits in einem LightCycler1.5 System (Roche Applied Science) oder nach den Benutzerhinweisen des StepOnePlus™Instrument (Applied Biosystems) mit dem zugehörigen TaqMan Fast Advanced Mastermix Kit (Applied Biosystems). Die verwendeten Sonden und Primer (siehe Tabelle 10) wurden mit Hilfe der Universal Probe Library von Roche Applied Science designed.

Zur Anwendung kamen Primer für MOBP, MBP, Fireflyluziferase sowie WPRE. Als Referenzgene wurde die Renillaluziferase, β - Actin, G6PDH oder Rn18S genutzt.

3.6.3.1 Relative Quantifizierung nach der $\Delta\Delta C_t$ - Methode

Mithilfe der $\Delta\Delta C_t$ -Methode (Livak and Schmittgen, 2001) kann die Expression eines Zielgens auf die Expression eines nicht regulierten, konstant exprimierten Referenzgens bezogen werden.

$$\begin{aligned} \Delta C_t &= C_t \text{ Zielgen} - C_t \text{ Referenzgen} \\ \Delta\Delta C_t &= \Delta C_t \text{ Unbekannt} - \Delta C_t \text{ Kontrolle} \\ \text{Ratio} &= 2^{-\Delta\Delta C_t} \end{aligned}$$

C_t entspricht dem Crossingpoint, also dem Zeitpunkt bzw. Zyklus der PCR, in dem sich das Fluoreszenzsignal gerade deutlich vom Hintergrund unterscheidet. Ein kleiner C_t -Wert bedeutet, dass sich zu Anfang der Reaktion, im Gegensatz zu einem hohen C_t -Wert, viele Kopien in der Probe befinden. Diese Methode der relativen Quantifizierung setzt eine „perfekte“ PCR voraus, also eine PCR mit einer Effizienz von 2, bei der sich in jedem Zyklus die Kopienzahl verdoppelt. Die entstehende „Ratio“ beschreibt den relativen

Expressionsunterschied zwischen dem unbekanntem Gen und dem Kontroll-Gen. Um die ermittelten Werte deutlicher in einem Graphen auftragen zu können, wird jeweils von dem Wert des Expressionsunterschieds der Logarithmus zur Basis 2 berechnet (log₂-Wert). Hierbei wird die Regulation ab einem log₂-Wert von +/-0,5 definiert.

3.6.3.1.1 Auswertung der qPCR über Agarose-Gelelektrophorese

Die qPCR Proben und ein 10 bp DNA Marker (Promega) wurden auf einem 4 %igen Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegel bei 100V in 0,5x TAE Puffer für 70 Minuten aufgetrennt und anschließend im ChemiDoc Imager (Biorad) detektiert.

3.6.3.2 Titerbestimmung viraler DNA: relative Quantifizierung mittels Standardkurve

Die Konzentration der zuvor extrahierten viralen DNA (siehe 3.6.1.2) wurde unter Verwendung einer Standardkurve ermittelt. Hierzu wurden Verdünnungen von Vergleichsplasmiden erstellt. Die Konzentrationen der verwendeten Standards betragen 10⁷; 10⁶; 10⁵; 10⁴ Kopien pro Milliliter. Unter den experimentellen Bedingungen der quantitativen Standardkurve wurden die zu analysierenden Titer der MOBP Viren mit dem in Tabelle 18 dargestellten Versuchsansatz mit Primern, die das woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element (WPRE) binden, sowie dem in Tabelle 19 dargestellten Cycling-Programm durchgeführt.

3.6.4 Herstellung eines Expressionsvektors

3.6.4.1 ffluziMOBP 3'UTR- Reporterkonstrukte

Als Ausgangsvektor wurde der Vektor pcDNA3.1(+) (Invitrogen) mit dem Gen der Fireflyluziferase, dem Gen für CaMKIIa mit einem A2RE, dem Gen für eine Ampizillinresistenz und einem CMV Promoter verwendet (ffluciferaseCaMKIIaA2RE) (Moos, 2009). Aus diesem Vektor sollten vier Reporterkonstrukte generiert werden, die hinter dem Gen der Fireflyluziferase jeweils die entsprechende 3'UTR der MOBP Isoformen mit, ohne oder mutiertem A2RE enthalten. Anhand der beiden Reporterkonstrukte, die ein A2RE in der 3'UTR besitzen (MOBP 81A, 99) und des Reporterkonstruktes, das das mutierte A2RE oder kein A2RE in der 3'UTR aufweist (MOBP99mut, MOBP170) (siehe 3.6.2.2.2, (Schäfer, 2012) sollten mögliche translationelle Einflüsse von der Tyrosinkinase Fyn untersucht werden.

3.6.4.2 MOBP-ORF Expressionsvektoren

Als Ausgangsvektor zur Herstellung der MOBP-ORF Expressionsvektoren diente der Vektor pcDNA4ATOhnRNPA2b_Myc_His (Robin White) mit dem Gen für eine Ampizillinresistenz und einem CMV Promotor, sowie einem downstream gelegenen Myc- und His- Tag. Aus diesem Vektor sollten drei Expressionsvektoren generiert werden, die über die MCS eingebracht, die jeweilige kodierende Sequenz für MOBP71, MOBP169 oder MOBP170 beinhalten, wobei das Myc- Tag (mt) zur Detektion in immunzytochemischen Analysen dienen sollte. In Überexpressionsexperimenten sollte eine Funktion des Myelin- assoziierten oligodendroglialen basischen Proteins auf die oligodendrogliale Zelllinie *Oli-neu* analysiert werden.

3.6.4.3 mbpMOBP-ORF Expressionsvektoren

Um einen noch besseren Einblick bezüglich der Funktion von MOBP auf oligodendrogliale Zellen des Nervensystems zu erlangen, wurden die MOBP Überexpressionsversuche zusätzlich in primären murinen Oligodendrozyten durchgeführt. Rekombinante Adeno-assoziierte Virus (AAV) Vektoren sind in der Biologie vielseitig verwendete Hilfsmittel für einen Gentransfer in das zentrale Nervensystem. In verschiedenen Studien in adulten Nagetieren konnte gezeigt werden, dass das Nutzen eines zellspezifischen Promotors ausreicht, um AAV- vermittelte Transgenexpression auf gliale Zellen abzielen. Um MOBP nun spezifisch in Oligodendrozyten überexprimieren zu können, wurde mittels standardisierter Klonierungstechnologien die amplifizierten kodierenden Bereiche (siehe 3.6.2.2.1) in den pAM-MBP-newMCS- Vektor (Christina Müller) für die mbpMOBP-ORF Expressionsvektoren kloniert. Dieser enthält einen MBP- Promotor, ein *woodchuck hepatitis post-transcriptional regulatory element* WPRE, sowie eine neue *multiple cloning site* (MCS), welche nach der von Addgene im September 2011 veröffentlichten Methode im Newsletter „Techniques: How to create your perfect MCS“ modifiziert wurde. Die Ausgangsvektoren zur Klonierung des pAM-MBP-newMCS- Vektors wurden freundlicherweise von der AG Lutz bereitgestellt (pAM/CBA-HA-Cre-WPRE-bGHpA; pAM/MBP-eGFP-WPRE-bgHpA).

3.6.4.4 DNA- Restriktionsverdau

Für den präparativen Restriktionsverdau der zuvor amplifizierten DNA- Fragmente (siehe 3.6.2.1.1, 3.6.2.1.2, 3.6.2.2.1) und der verwendeten Vektoren (siehe 3.6.4.1, 3.6.4.2, 3.6.4.3), sowie für den analytischen Restriktionsverdau (0,5-1,0µg DNA) zur Überprüfung der

erstellten Restriktionsvektoren, wurden Restriktionsenzyme und Reaktionspuffer von NEB nach Herstellerangaben genutzt. Die Inkubation der Ansätze erfolgte bei entsprechender Temperatur für 90min im Heizblock und die Analyse der geschnittenen DNA-Fragmente wurde mittels Agarose- Gelelektrophorese durchgeführt.

3.6.4.5 Agarose- Gelelektrophorese

3.6.4.5.1 Auftrennung der DNA- Fragmente

Die Größenauftrennung der DNA- Fragmente nach dem Restriktionsverdau erfolgte mit Hilfe der Agarose- Gelelektrophorese. Hierbei wurde 1% w/v Agar in kochendem 1x TAE-Puffer gelöst. Nach Abkühlen wurden 8µl Ethidiumbromid zugegeben und anschließend in eine horizontale Gelkammer gefüllt, in der die Elektrophorese ablief. Die DNA-Proben wurden mit 6x Loading Dye (NEB) so kombiniert, dass der Loading Dye in der aufzutragenden Probe einfach konzentriert ist und bei 100V für eine Stunde im Agarosegel in 0,5x TAE separiert.

3.6.4.5.2 DNA- Extraktion aus einem Agarose- Gel

Die DNA-Extraktion aus einem Agarose- Gel wurde mithilfe des "X- tracta Gel Extraction Tool" von Sigma- Aldrich durchgeführt. Die Grundlage bildeten die Herstellerangaben im Benutzerhandbuch.

3.6.4.6 DNA- Aufreinigung der PCR- Produkte

Die Isolierung der zuvor extrahierten DNA-Fragmente erfolgte mit dem „Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System“ (Promega) durch Entfernung der Restriktionsenzyme, sowie der DNA-Fragmente <100bp-10kb>.

3.6.4.7 Dephosphorylierung des Vektors

Um die Wahrscheinlichkeit einer Religation zu minimieren, wurde der Vektor nach der Aufreinigung mit Hilfe der Arctic Phosphatase (NEB) nach Herstellerangaben dephosphoryliert.

3.6.4.8 DNA- Ligation

Die Vektor- sowie Insert- DNA- Fragmente wurden mit verschiedenen Enzymen verdaut, anschließend aufgetrennt und aus dem Agarosegel extrahiert sowie aufgereinigt (siehe 3.6.4.4, 3.6.4.5, 3.6.4.6, 3.6.4.7). Die Ligation wurde in dem molekularen Vektor: Insert-Verhältnis 1:5 angesetzt. Als Ligase wurde die T4- DNA- Ligase von NEB verwendet. Die Inkubation erfolgte 6 Stunden bei Raumtemperatur.

3.6.4.9 Kompetente Bakterien und Transformation

3.6.4.9.1 Kompetente Bakterien und Transformation: Zur Herstellung der ffluziMOBP3'UTR Reporterkonstrukte und MOBP-ORF Expressionsvektoren

Für die Transformation der hergestellten Plasmide wurden kompetente *Escherichia coli* (*E.coli*) Zellen, DH5 α von Invitrogen, benutzt. Es wurden 50 μ l der Zellen auf Eis aufgetaut und anschließend 20 μ l des entsprechenden Ligationsansatzes zugefügt. Die Inkubation der Zellen auf Eis dauerte 30 Minuten. Der darauffolgende Hitzeschock erfolgte bei 42°C für 20 Sekunden im Heizblock. Anschließend wurden die Zellen erneut für 2 Minuten auf Eis gestellt. Jeweils 950 μ l vorgewärmtes LB- Medium wurden zugeben. Nun erfolgte eine 30-minütige Inkubation bei 37°C. Anschließend erfolgte die Ausplattierung der einzelnen Transformationsansätze auf die zuvor hergestellten LB-Agarplatten mit der entsprechenden Antibiotikaresistenz. Alle Agar- Platten inkubierten über Nacht bei 37°C. Die verwendeten Agar- Platten enthielten alle 75 μ g/ml Ampicillin.

Genotyp DH5 α :

F- ϕ 80/*lacZ* Δ M15 Δ (\square /*lacZYA-argF*)U169 *recA1 endA1 hsdR17*(r_k^- , m_k^+) *phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ^-*

3.6.4.9.2 Kompetente Bakterien und Transformation: Zur Herstellung des mutagenen ffluziMOBP99mut Vektors

Für die Transformation des hergestellten mutagenen Reporterkonstruktes wurden kompetente *Escherichia coli* (*E.coli*) Zellen, XL10-Gold ultrakompetente Zellen von Agilent, benutzt. Die Durchführung der Transformation erfolgte nach Angaben des Herstellers (Agilent).

Genotyo XL10-Gold ultrakompetente Zellen:

Tetr Δ (*mcrA*)183 Δ (*mcrCB-hsdSMR-mrr*)173 *endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte*
[F' *proAB lacIqZ Δ M15 Tn10*(Tetr) Amy Cam^r]

3.6.4.10 Plasmid- Präparation aus Bakterienzellen**3.6.4.10.1 Mini- Präparation**

Zur Überprüfung, ob die durch die Transformation erstellten Bakterienkolonien das gewünschte Plasmid enthalten, wurde eine Übernachtskultur mehrerer Kolonien pro Ansatz angesetzt. Es wurden 4ml LB-Medium (siehe Tabelle 3) mit 75 μ g/ml Ampicillin versetzt und mit den entsprechenden Kolonien angeimpft. Die Ansätze wurden ∞ N bei 37°C unter permanenter Rotation inkubiert.

Die Präparation der Plasmid- DNA aus den am vorherigen Abend angeimpften Übernachtskulturen erfolgte nach den Herstellerangaben des verwendeten PureYield™ Miniprep Kits (Promega). Die gewonnene Plasmid-DNA wurde anschließend mit den adäquaten Restriktionsenzymen (NEB) mittels analytischem Restriktionsverdau und Agarosegelelektrophorese (siehe 3.6.4.4, 3.6.4.5) auf dessen Korrektheit analysiert.

3.6.4.10.2 Maxi- Präparation

Um die Konzentration positiver Plasmid-DNA zu erhöhen, wurden die entsprechenden positiven Bakterienkolonien mittels einer 150ml- Übernachtskultur mit 75 μ g/ml Ampicillin amplifiziert. Die Ansätze wurden ebenfalls ∞ N bei 37°C unter permanenter Rotation inkubiert.

Die Präparation der Plasmid- DNA aus den Übernachtskulturen erfolgte mit Hilfe des PureLink™ HiPure Plasmid Maxiprep Kits nach Angaben des Herstellers (Life technologies).

Abschließend wurde 0,75 μ g-1 μ g der gewonnenen Plasmid-DNA mit den passenden Restriktionsenzymen (NEB) mittels analytischem Restriktionsverdau und Agarosegelelektrophorese (siehe 3.6.4.4, 3.6.4.5) auf dessen Korrektheit analysiert.

3.7 Zellkultur

3.7.1 Kultivierung von Oli-*neu* Zellen

Bei Oli- *neu* Zellen handelt es sich um eine Vorläuferzelllinie von Oligodendrozyten. Diese Zelllinie entstand durch eine Infektion von primären murinen Oligodendrozyten mit replikationsdefekten Retroviren, welche aus dem Mediumüberstand von virusproduzierenden Zellen der Zelllinie GPE- *neu* gewonnen wurden. Die Immortalisierung dieser Zelllinie erfolgte durch das Vektorkonstrukt MMLV (*moloney murine leukemia virus*), welches das Onkogen *t- neu* trug (Jungl et al., 1995).

Die Zellen wurden in Sato 2% HS Medium (Trotter and Schachner, 1989) kultiviert. Zum Passagieren der Oli-*neu*-Zellen wurden diese in Trypsin/EDTA inkubiert und damit von dem Kulturgefäß abgelöst. Die Reaktion wurde durch Zugabe von kaltem DMEM10%HS abgestoppt. Anschließend wurden die Zellen bei 900rpm und 4°C zehn Minuten abzentrifugiert. Abschließend erfolgte Resuspendierung des Zellpellets in Sato- Medium und die Zellen konnten nun in den zuvor mit 0,1% PLL-beschichteten Kultivierungsgefäßen ausplattiert werden.

3.7.2 Präparation und Kultivierung von primären Oligodendrozyten

Die primären Oligodendrozytenkulturen wurden mit Hilfe der MACS Technologie (Miltenyi Biotec) aus neun Tage alten C57BL/6J Mäusen oder C3Fe.SWV-*MBP^{shi}/J* (The Jackson Laboratory) hergestellt. Nach dem Dekaptieren der Mäuse, wurden die Gehirne steril entnommen und in einer 10cm Schale mit kaltem HBSS gelagert. Anschließend wurden die Gehirne in einem vorgewärmten Papain-Enzymmix mit Hilfe einer Pipette zerkleinert und bei 37°C inkubiert. Um eine Dissoziation des Gewebes zu erzielen, wurde der gentleMACS Dissociator genutzt. Dieser stellt optimierte Programme bereit, um einen völlig automatisierten Gewebeaufschluss innerhalb eines sterilen Systems zu erzielen. Die Zell-Separation wurde nachfolgend durch magnetische Markierung der Oligodendrozytenvorläuferzellen mit Hilfe der Anti-AN2 Microbeads beziehungsweise durch Markierung der reiferen Oligodendrozyten mit Hilfe der Anti-O4 Microbeads durchgeführt. Abschließend wurden die primären Oligodendrozyten in einem mit PLL- beschichteten Kulturgefäß in MACS Kultivierungsmedium ausplattiert und bei 37°C und 7,5% CO₂ inkubiert. Um einen höheren Anteil an Oligodendrozyten für die endogen durchgeführte hnRNP A2-Immunpräzipitation als Ausgangsmaterial aus einer Präparation zu erlangen, wurden die

Oligodendrozytenvorläuferzellen zunächst in Proliferationsmedium (siehe Tabelle 3) kultiviert, bis sie eine Konfluenz aufwiesen und dann mit Hilfe des Differenzierungsmediums (siehe Tabelle 3) *in vitro* differenziert (Emery et al., 2014). Für weitere Informationen bezüglich der MACS Technologie siehe Herstellerangaben (Miltenyi Biotec).

3.7.3 Bestimmung der Zellzahl pro Milliliter

Die Zellen wurden wie unter 3.7.1 beschrieben trypsinisiert und in definiertem Volumen Zellkulturmedium aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen mithilfe einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Hierzu wurden die vier 4x4 Quadrate ausgezählt und der Mittelwert gebildet. Mit folgender Formel kann die Zellzahl pro Milliliter bestimmt werden:

$$\text{Mittelwert gezählter Zellen} \cdot 10^4 = \text{Zellen / ml}$$

3.7.4 Präparation und Kultivierung muriner kortikaler Hirnschnitte

Nach dem Dekaptieren der drei Tage alten C57BL/6J Mäuse (The Jackson Laboratory), wurde das Gehirn steril entnommen und in eine 6cm Platte mit kaltem GHG- Medium überführt. Die nachfolgenden Arbeitsschritte erfolgten auf Eis unter Zuhilfenahme eines Binokulars. Zunächst wurden die beiden Gehirnhemisphären voneinander getrennt und das Kleinhirn entfernt. Die Meningen wurden anschließend mit Hilfe zweier Pinzetten vorsichtig, ohne Beschädigung des Gewebes, abgezogen. Die beiden Hemisphären wurden nun nacheinander auf dem Tissue Chopper so platziert, sodass der Kortex koronal mit einer Dicke von 350µm geschnitten werden kann. Die Schnitte wurden danach wieder in frisches gekühltes GHG Medium überführt und es mit Hilfe zweier Pinzetten vorsichtig voneinander getrennt.

Mindestens eine Stunde vor Ausplattierung der Hirnschnitte, wurden die für die Kultivierung benötigten 6well Platten vorbereitet. Pro Well einer 6well Platte wurden 1000µl GHG-Medium vorgelegt und ein Millicell-Insert der Firma Millipore hinzugegeben und bei 37°C und 7,5% CO₂ voräquilibriert. Pro Insert wurden schließlich drei kortikale Hirnschnitte ausplattiert und bis zu 15 DIV in Kultur gehalten. Dabei erfolgte immer an 1DIV und anschließend alle 2DIV ein Medienwechsel.

3.8 Transfektion und Transduktion

3.8.1 Plasmid- Transfektion in Oli-*neu* Zellen

Die Oli-*neu* Zellen wurden mit Fugene HD (Promega) transfiziert. Für den Luziferase Assay wurden sechs Stunden vor der Transfektion je 100 000 Zellen pro 6well ausgesät. Das gewählte Reagenz:DNA- Verhältnis war 3:2. Pro Ansatz wurden dementsprechend 3µl Fugene und 2µg DNA in 100µl DMEM gelöst. Die 2µg DNA setzten sich wie folgt zusammen:

Tabelle 20: DNA- Zusammensetzung für die Transfektion der Oli- *neu* Zellen (Luziferase Assay)

Plasmid	Menge [ng]
MOBP-Fireflyluziferase	250
Renilla	100
eGFP	1000
Fyn-/FynWT	650

Für die Oli-*neu* Transfektion hinsichtlich der morphologischen Analyse, wurden 70 000 Zellen pro Deckglas ausplattiert und ebenfalls sechs Stunden später transfiziert. Hierzu wurden 1µl Fugene und 0,75µg DNA in 25µl DMEM gelöst. Zuerst wurde DMEM vorgelegt, anschließend die DNA pipettiert und zuletzt das Fugene-Reagenz zugegeben. Nach kurzem Vortexen der Proben, erfolgte eine 15-minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Anschließend wurde der entsprechende Ansatz auf das 6well mit den 100 000 Oli-*neu* Zellen appliziert.

3.8.2 siRNA- Transfektion in primären murinen Oligodendrozyten

3.8.2.1 MOBP siRNA

NG2+ primäre Oligodendrozyten ($1,25 \times 10^5$ pro 24well; $2,5 \times 10^5$ pro 12well) wurden in 24wells oder 12wells in 600µl oder 1000µl MACS-Kultivierungsmedium (siehe Tabelle 3) ausplattiert und für sieben Tage in Kultur gehalten (7DIV; *days in vitro*). Nach 5DIV sowie 6DIV wurden 40pmol Kontroll- oder MOBP siRNA mit Hilfe des Transfektionsreagenz Lipofectamine™ RNAiMAX (Life technologies) appliziert. In den nachfolgenden Tabellen sind die entsprechenden Versuchsansätze aufgeführt.

Tabelle 21: Zusammensetzung des Mastermix 1 zur siRNA Transfektion primärer Oligodendrozyten

	24well	12well	
Reagenz	Menge [μ l]	Menge [μ l]	
DMEM	50 μ l	100 μ l	Mastermix 1
Lipofectamine™ RNAiMAX	1 μ l	2 μ l	

Zunächst wurde der Mastermix 1 für die entsprechenden Ansätze angesetzt und für 5min bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit wurde der Mastermix 2 angesetzt.

Tabelle 22: Zusammensetzung des Mastermix 2 zur siRNA Transfektion primärer Oligodendrozyten

	24well	12well	
Reagenz	Menge [μ l]	Menge [μ l]	
DMEM	50 μ l	100 μ l	Mastermix 2
siRNA (40pmol)	2 μ l	4 μ l	

Nach der fünf minütigen Inkubation wurden Mastermix 1 und 2 gemischt und schließlich für 20min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte die Applikation des Ansatzes auf die primären Oligodendrozyten. 6h nach der Transfektion wurde ein halber Medienwechsel durchgeführt und 48h nach der ersten Transfektion (an DIV7) wurden die Zellen entweder fixiert, um mittels Immunzytochemie und anschließender Oberflächenmessung (siehe 3.9.6.1, 3.9.6.3) analysiert zu werden, oder lysiert, um eine Detektion der MOBP- und Tubulin- Proteine mittels Western Blot (siehe 3.9.3, 3.9.4) durchzuführen.

3.8.2.1.1 fluorimetrischer TUNEL Versuch

Zur Bestimmung der Apoptoserate in den mit MOBP siRNA behandelten primären Oligodendrozyten, wurde der TUNEL (*terminal transferase dUTP nick end labeling*) Versuch mit dem DNA Fragmentation Imaging Kit (Roche Applied Science) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt (N. Hochaus). Diese Methode beruht darauf, dass während der Apoptose DNA- Strangbrüche entstehen, welche an den freien 3'OH-DNA Bruchenden durch eine terminale Deoxynukleotidyltransferase Fluoreszenz- markiertes dUTP- Nukleotide angefügt bekommen. Diese somit markierten Stellen innerhalb der geschädigten DNA können fluorimetrisch detektiert werden. Neben der TUNEL Reaktion quantifiziert dieser Versuch zudem die Anzahl an Zellkernen (Hoechst 33342 Färbung), wodurch die Gesamtzellzahl ermittelt werden kann.

Ein Tag *in vitro* (1DIV, *day in vitro*) kultivierte primäre O4+ Oligodendrozyten (5×10^4 Zellen pro well einer 96- well Platte) wurden mit 40pmol Kontroll- oder MOBP siRNA transfiziert. Nach 24h wurden die Zellen eines separaten Ansatzes als Positivkontrolle mit $1 \mu\text{M}$ Staurosporin behandelt. 18h später wurde schließlich die Menge an apoptotischen Zellen und die Gesamtzellzahl mit Hilfe des TUNEL Versuches in einem Mikrotiterplatten- Leser F200 (TECAN) quantifiziert.

3.8.2.2 Fyn siRNA

NG2+ primäre Oligodendrozyten ($2,5 \times 10^5$ pro 12well) wurden in 12wells in $1000 \mu\text{l}$ MACS-Kultivierungsmedium (siehe 3.7.2; 3.7.3) ausplattiert und für sieben Tage in Kultur gehalten (7DIV; *days in vitro*). Nach 5DIV wurden einmalig 40pmol Kontroll- oder Fyn siRNA mit Hilfe des Transfektionsreagenz Lipofectamine™ RNAiMAX (Life technologies) appliziert. Der Versuchsansatz und die Durchführung der Transfektion sind unter 3.8.2.1 und Tabelle 21 und Tabelle 22 beschrieben. 48h nach der Transfektion erfolgte die Lyse der mit siRNA behandelten Zellen und die Proben wurden mit Hilfe des SDS PAGE (siehe 3.9.3) und des Western Blots (siehe 3.9.4) weiter analysiert.

3.8.3 AAV- Transduktion

Für die im Zuge dieser Arbeit verwendeten Adeno-assoziierten Viren (AAV) wurde die cDNA für MOBP81, 169 und 170 (siehe 3.6.2.2.1; 3.6.4.3), sowie die cDNA der Wildtyp- Fynkinase (FynWT), der konstitutiv inaktiven Fyn-Kinase (Fyn-) und eGFP (siehe Tabelle 7) flussabwärts der verkürzten MBP-Promotor kontrollierten Expressionskassette kloniert und in die AAV- Vektoren durch R. Jelinek (AG Prof. Dr. B. Lutz, Institut für Physiologische Chemie, Mainz) verpackt (Jonquieres et al., 2013).

3.8.3.1 AAV-Transduktion in primären murinen Oligodendrozyten

Die wie unter 3.7.2 beschrieben präparierten NG2+ primären Oligodendrozyten ($1,25 \times 10^5$ pro 24well; 1×10^6 pro 6well) wurden nach 2DIV mit 2×10^9 viralem Genom (vg) pro ml Kulturmedium transduziert. Um eine verfrühte starke MOBP Expression *in vitro* zu erzielen, wurden die Zellen nach 5DIV mittels Immunzytochemie und Western Blot (siehe 3.9.6.1; 3.9.1.1; 3.9.3; 3.9.4) weiter analysiert. Im Falle der Fyn-Kinase Überexpression (FynWT oder Fyn-) wurden die Zellen erst nach 7DIV fixiert und lysiert, um anschließend mittels Western

Blot deren Effekt auf die Expression der Myelinproteine MOBP, MBP, CNP und PLP zu analysieren.

3.8.3.2 AAV Transduktion in murinen kortikalen Hirnschnitten

Die wie unter beschrieben hergestellten murinen kortikalen Schnittkulturen wurden nach 1DIV mit 2×10^9 viralem Genom (vg) pro ml Kulturmedium transduziert. Hier erfolgte die Applikation des Virus nicht ins Medium, sondern in die Mitte der drei Hirnschnitte, welche auf der Membran des Millicell- Inserts ausplattiert wurden. Um eine frühzeitige Überexpression im Vergleich zum endogenen exprimierten MOBP zu erzielen, wurden die Hirnschnitte bis DIV8 in Kultur gehalten und anschließend lysiert (siehe 3.9.1.2)

3.8.4 Inhibition der proteasomalen Degradation

Um eine Inhibition der proteasomalen Degradation in primären Oligodendrozyten zu bewirken, wurden die wie unter 3.7.2 beschrieben präparierten NG2+ primären Oligodendrozyten ($2,5 \times 10^5$ pro 12well) in frühen Stadien oligodendroglialer Differenzierung (2DIV und 3DIV) mit $100 \mu\text{M}$ N-Acetyl-L-leucyl-L-leucyl-L-norleucinal (ALLN) in Dimethylsulfoxid (DMSO) für vier Stunden vor der Lyse wie zuvor beschrieben (Krämer-Albers et al., 2006; White et al., 2012) behandelt und nachfolgend auf Proteinebene mittels Western Blot analysiert (siehe 3.9.3, 3.9.4).

3.9 Protein- Analyse

3.9.1 Herstellung von Lysaten

3.9.1.1 Lysate aus Oli-*neu* Zellen und murinen primären Oligodendrozyten

Oli-*neu* Zellen und primäre Oligodendrozyten wurden in definierten Mengen an Lyse Puffer (siehe Tabelle 3) (mit Phosphatase- und Protease- Inhibitoren) mit einem Zellschaber aufgenommen. Die Lyse erfolgte auf einem Rotationsrad bei 4°C für 45 Minuten. Um die Kernfraktion von der Zellfraktion zu trennen, wurden die Lysate abschließend bei $5000 \times g$ bei 4°C für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde entweder für die hnRNP A2-Immunpräzipitation oder für die Western Blot Analysen weiterverwendet.

3.9.1.1.1 Lyse primärer Oligodendrozyten zur Erstellung eines Polysomenprofils

Primäre Oligodendrozyten (4×10^6) wurden nach 2DIV oder 6DIV mit frischem auf 37°C vorgewärmten MACS Kultivierungsmedium (siehe Tabelle 3), welches mit 100µg/ml Cycloheximide (CHX) versetzt wurde, bei 37°C für 5 Minuten inkubiert. CHX ist ein Antibiotikum, welches von *S. griseus* produziert wird. Seine biologische Funktion ist die translationelle Inhibition in eukaryotischen Zellen und wird daher weitverbreitet zur kontrollierten Inhibition der Proteinsynthese genutzt, um somit neu synthetisierte Proteine detektieren zu können. An die fünfminütige Inkubation schlossen sich zwei Waschrritte mit eiskaltem 1xPBS, welches ebenfalls 100µg/ml CHX enthält, auf Eis an. Anschließend erfolgte die Lyse der Zellen für 2 Minuten mit einem Lysepuffer, welcher 30mM Tris pH7.4, 10mM MgCl₂, 100mM NaCl, 1% (v/v) NP-40, 30Units/ml RNAse Inhibitor, EDTA-freien Protease Inhibitor sowie 100µg/ml CHX enthält. Die Lysate wurden für 7 Minuten, bei 4°C und 16000 x g zentrifugiert und abschließend wurde der zytosolische Überstand mittels Saccharose- Dichtegradient fraktioniert (siehe 3.9.8).

3.9.1.2 Lysate aus murinen kortikalen Hirnschnitten

Die kultivierten kortikalen Hirnschnitte wurden in einer definierten Menge an Lysepuffer (mit Phosphatase- und Protease- Inhibitoren) von der Membran der Inserts abgespült und druch auf und ab pipettieren zerkleinert. Die Lyse erfolgte auf einem Rotationsrad bei 4°C für 3 Stunden. Nach vollständiger Lyse wurden die Kernfraktion bei 5000 x g bei 4°C für 5 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde für Western Blot Analysen verwendet.

3.9.1.3 Lysate aus dem murinen *wildtyp* oder *shiverer* Gesamthirn

Nach der Präparation des Gesamthirns aus wildtyp oder shiverer Mäusen (P18/P19) wurde dieses in je 5ml Lysepuffer (siehe Tabelle 3) pro ½ Gehirn aufgenommen und mittels TissueRuptor (Qiagen) homogenisiert. Die Lyse erfolgte unter Rotation bei 4°C für 3 Stunden. Abschließend wurde die Zellkernfraktion abzentrifugiert (5000 x g, 4°C, 5 Minuten) und der Überstand für Western Blot Analysen weiterverwendet.

3.9.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Der Proteintest wurde mit Hilfe des BCA- Proteintests von Pierce durchgeführt und lieferte Auskunft über die Proteinkonzentration der zuvor hergestellten Lysate. Die Grundlagen bildeten die Herstellerangaben im Benutzerhandbuch.

3.9.3 SDS PAGE

Die Proteinproben sowie die Größenstandards (Precision Plus Protein™ Dual Color Standard, Biorad/ Color Protein Standard „Broad Range“, NEB) wurden mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid- Gelelektrophorese mittels 14% SDS PAGE Gele bei 175V für 60 Minuten oder mittels kommerziell erwerblicher 4-12% NUPAGE Fertiggele (Life Technologies) bei 200V für 45 Minuten in einem Mini-Protean Tetra System mit dem Power Pac™ HC (Biorad) und SDS- Laufpuffer (siehe Tabelle 3) oder NUPAGE MOPS Puffer (siehe Tabelle 3) aufgetrennt.

3.9.4 Western Blot

Nachdem die Proteine elektrophoretisch aufgetrennt wurden, erfolgte deren Transfer auf eine PVDF Membran. Nach der Aktivierung der PVDF Membran mit Methanol wurde diese einmal mit Transferpuffer gewaschen, während die anderen Bestandteile des Blots ebenfalls in Transferpuffer getränkt wurden. Der Blot wurde nach Herstellerangaben aufgebaut und bei 120V für 90 Minuten oder bei 30V üN transferiert.

Zur Detektion der Proteine wurde die Membran zunächst in 4% Milchpulver in TBST für 30 Minuten geblockt. Die Primärantikörper wurden in den in Tabelle 4 angegebenen Konzentrationen für eine Stunde bei RT oder üN bei 4°C auf der Membran inkubiert. Es folgten drei zehnmütige Waschschrte mit TBST. Die adäquaten Sekundärantikörper (siehe Tabelle 6) wurden in einer 1:10 000 Verdünnung für 30 Minuten auf der Membran inkubiert. Danach erfolgten zwei zehnmütige Waschschrte mit TBST und ein zehnmütiger Waschschrte mit TBS, bevor die Detektion der Proteine mit Hilfe der ECL-Lösung erfolgte. Die Herstellung der ECL- Lösung erfolgte in einem 1:1 Verhältnis des Luminol- Reagenz und des Peroxid- Reagenz (Millipore). Die Detektion der Proteine erfolgte im ChemiDoc Imager (Biorad) und die darauffolgende densitometrische Auswertung wurde mit der Software Image Lab™ Version 5.0 (Biorad) durchgeführt.

3.9.5 Immunpräzipitation aus primären murinen Oligodendrozyten

Um eine Interaktion zwischen MOBP und hnRNP A2 zu überprüfen, wurde eine endogene Immunpräzipitation der hnRNP A2 Proteine aus primären Oligodendrozyten mit Hilfe des an magnetische Protein G Dynabeads konjugierten monoklonalen hnRNP A2 Antikörpers durchgeführt (Christina Müller).

6DIV kultivierte primäre Oligodendrozyten (1×10^6 Zellen pro 6well) wurden in je 100µl lysiert (siehe 3.9.1.1) und gepoolt. Nach Abnahme des Inputs wurden jeweils 500µl Zelllysat mit 3.2µg hnRNP A2 oder isotypspezifischem Kontroll- Antikörper (anti FLAG) versetzt und über Nacht unter permanenter Rotation bei 4°C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden jeweils pro Ansatz 50µl Protein G Beads zweifach mit W&B Puffer gewaschen und anschließend zum Antikörper- Lysat- Komplex gegeben. Nach zweistündiger Inkubation auf dem Rotationsrad bei 4°C erfolgten zehn Waschschriffe mit jeweils 700µl Lysispuffer. Daraufhin wurden die Beads in 1ml eiskaltem PBS aufgenommen und für die anschließende RNA-, sowie Protein- Analyse mittels qPCR und Western Blot 1:1 separiert.

3.9.6 Immunzytochemie, Mikroskopie und Bildanalyse

3.9.6.1 Immunzytochemie in Oli-*neu* Zellen und primären Oligodendrozyten

Die auf Deckgläsern ausgesäten Zellen wurden zunächst zweimal mit 1xPBS gewaschen und für 15min in 4%PFA fixiert. Durch PFA kommt es zu einer Quervernetzung der Proteine und damit wird eine Konservierung der ursprünglichen Proteinform begünstigt. Anschließend wurden die Zellen erneut zweimal mit 1xPBS gewaschen. Es folgte die Permeabilisierung durch 0,1%Triton-X100, um intrazelluläre Epitope für die Antikörper zugänglich zu machen. Um unspezifische Bindungen der Antikörper zu minimieren, wurden die Zellen nun für 15min mit Blockierlösung inkubiert. Die verwendeten Primärantikörper wurden entsprechend Tabelle 4 in Blockierlösung verdünnt und für eine Stunde bei Raumtemperatur oder bei 4°C üN inkubiert. Nach dreimaligem waschen mit 1xPBS wurden die adäquaten Zweitantikörper in der entsprechenden Verdünnung (siehe Tabelle 6) für 30min auf die Zellen gegeben. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit 1xPBS wurden zuletzt die Zellkerne noch mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes DAPI für 5min angefärbt. Abschließend wurden die Zellen zweimal mit 1xPBS und einmal mit destilliertem Wasser gewaschen bevor sie in Mowiol eingedeckt und bei 4°C im Dunkeln gelagert wurden.

3.9.6.2 verwendete Mikroskope

Die Aufnahmen der immunzytochemischen Färbungen zur morphologischen Analyse der primären Oligodendrozyten, sowie der Oli-*neu* Zellen in Abhängigkeit alterierender MOBP Mengen wurden mit Hilfe eines IX81 Mikroskopes mit einem 20x UPlanFLN (NA=0.50) oder einem 40x UPlanFLN (NA=0.75) Objektivs erstellt. Die Detektion erfolgte durch eine monochrome Fluoreszenz CCD- Kamera XM10 und die cell[^]F Software (alles Olympus).

Die Aufnahme der immunzytochemischen Färbungen zur endogenen MOBP- Verteilung und zur Ermittlung einer MOBP und α -Tubulin Kolokalisation innerhalb eines Oligodendrozyten erfolgte mit Hilfe eines TCS SP5 Konfokalen Mikroskopes mit einem 40x HCX PL APO CS 1.3 Öobjektiv oder mit einem 63x HCX PL APO CS 1.4 Öl-Objektiv angeschlossen an einen fast resonance scanner und der LAS AF 2.6.3 Software (alles Leica Microsystems CMS GmbH).

3.9.6.3 Fiji Software zur Bildanalyse

Die wie unter 3.9.6.2 erstellten Bilder wurden mittels Fiji Software (Schindelin et al., 2012) modifiziert und analysiert.

Die Zelloberflächenbestimmung [Pixel²] in primären Oligodendrozyten wurde mit Hilfe des „Fijisurf“ Makros für ImageJ, welches in Kooperation mit Jan Brocher (Biovoxxel) entwickelt wurde, durchgeführt. Die Software kann unter www.biovoxxel.de heruntergeladen werden. Für die Analyse wurden für jedes biologische Replikat (n) pro Kondition jeweils zehn primäre Oligodendrozyten mit dem „Fijisurf“ Makro gemessen. Um die Oligodendrozyten morphologisch noch detaillierter zu analysieren, wurde pro biologischem Replikat (n) der zuvor hinsichtlich der Zelloberfläche analysierten Oligodendrozyten eine repräsentative Zelle mit Hilfe des „trainable weka segmentation V2.2.1“ Plugins für ImageJ mit standardisierten Trainingseinstellungen in drei Komponenten fragmentiert: Zellkern, Zellfortsätze und Myelin-ähnliche Membranen. Zudem wurden die fragmentierten binären Bilder der Zellfortsätze mit Hilfe des Sholl-Plugin für ImageJ hinsichtlich der Verzweigung der ausgebildeten Fortsätze untersucht, um einen Einblick in deren ausgebildetes Netzwerk zu erlangen. Hierbei wurden die nachfolgenden Einstellungen genutzt: sholl method= intersections; starting radius= 10 μ m; radius step size= 10 μ m; 5 samples per radius.

Innerhalb der Oli-*neu* Experimente wurden 20-64 Zellen pro biologischem Replikate (n) analysiert. Die Bestimmung der Fortsatzlänge [μm], sowie Fortsatzbreite [μm] der MOBP überexprimierenden Oli-*neu* Zellen erfolgte nach Kalibrierung des Größenmaßstabs mit dem „freehand line“ Werkzeug in ImageJ, wobei immer der längste beziehungsweise breiteste Fortsatz einer Zellen ausgewertet wurde.

Das Ausmaß der Kolo-kalisation zwischen MOBP und α -Tubulin wurde quantitativ mit Hilfe des Mander's Korrelations Koeffizienten (*Mander's correlation coefficient*, MCC), Pearson's Korrelations Koeffizienten (*Pearson's correlation coefficient*, PCC) und Cost's Test des JACoP- Plugin in ImageJ bestimmt (Bolte, S. and Cordeliers, 2006; Manders et al., 1993; Müller et al., 2015). Die Analyse des pro biologischem Replikate (n) ausgewerteten Oligodendrozyten erfolgte innerhalb der Ebene höchster Fluoreszenz des zuvor am konfokalen Mikroskop erstellten Z-Stacks eines zufällig ausgewählten Bereiches. Die Berechnung des Mander's Koeffizienten liefert zwei Werte, M1 und M2. M1 gibt den Anteil des roten Kanals (α -Tubulin) in Regionen des grünen Kanals (MOBP) und M2 den Anteil des grünen Kanals in Regionen des roten Kanals an. Hier wurde der M1- Koeffizient zur Bestimmung der relativen Kolo-kalisation von α -Tubulin mit MOBP angewendet. Es wurden insgesamt 6 voneinander unabhängige Experimente (n) durchgeführt und schließlich der Mittelwert bestimmt. Der MCC und der PCC liefern Werte von 0 bis 1, wobei 0 keiner Kolo-kalisation und 1 einer 100%igen Kolo-kalisation entsprechen. Der Cost's Test schließlich liefert drei Werte, den $r(\text{original})$, welcher dem PCC entsprechen sollte, den $r(\text{randomized})$, welcher bei einer realen Kolo-kalisation etwa bei 0 liegen sollte, sowie den P-Wert (P-value), der bei einem Wert größer 95% die Signifikanz der ermittelten Kolo-kalisation beweist.

3.9.7 *In vitro* Assay zur Bestimmung translationeller Regulation: Luziferase- Assay

Die wie unter 3.8.1 beschrieben transfizierten Oli-*neu* Zellen wurden 48h später nach einmaligem Waschen in 1xPBS in 150 μl 1xPBS abgeschabt. Jeweils 50 μl der Zellsuspension wurde in eine weiße 96-well Platte überführt. Der Luziferaseversuch wurde mit dem *Dual-GloTM Luziferase Assay System* (Promega) nach Angaben des Herstellers in einem Mikroplatten-Leser (TECAN) durchgeführt. Zur Auswertung der translationellen Regulation der ffluziMOBP-3'UTR Reporterkonstrukte durch die Fyn- Kinase wurden pro n die gemessenen drei Replikate gemittelt und anschließend der Mittelwert der *Firefly* Luziferase Aktivität auf den Mittelwert der *Renilla* Luziferase Aktivität normalisiert.

3.9.8 Erstellung eines Polysomenprofils zur Überprüfung translationeller Aktivität in differenzierenden Oligodendrozyten

Ein Saccharose- Dichtegradient erlaubt die Fraktionierung freier mRNAs, an einzelne Ribosomen gebundene mRNAs (Monosomen) sowie an mehrere Ribosomen gebundene mRNAs (Polysomen). Der hier verwendete Dichtegradient reicht von 10-50% Saccharosegehalt. Zur Herstellung des Gradienten wurden zunächst die fünf Lösungen, welche sich aus 30mM Tris pH7,4, 10mM MgCl₂, 100mM NaCl, 10U/ml Rnasin, 1:000 Proteaseinhibitor, 10µg/ml CHX sowie den entsprechenden prozentualen Saccharoseanteilen zusammensetzten, vorbereitet. Jeweils 2,5ml der vorbereiteten 50-10% Lösungen wurden nun vorsichtig in einem RNase-freien Polyallomer Zentrifugationstube (Beckmann Coulter) überschichtet und für mindestens zwölf Stunden bei 4°C gelagert.

Die wie unter 3.9.1.1.1 hergestellten Lysate der 2DIV und 6DIV kultivierten primären Oligodendrozyten, wurden vorsichtig auf den vorbereiteten Saccharose- Dichtegradienten pipettiert und nachfolgend für 2 Stunden bei 4°C in einer Optima L-90K Zentrifuge (Beckmann) mit einem SW40-Ti Rotor bei 35000rpm separiert. Nachfolgend wurden 13 Fraktionen gleichen Volumens abgenommen und die Polysomenfraktionen mittels Absorptionsmessung bei 254nm ermittelt und anschließend gepoolt, um die Assoziation von *Mobp*, *Mbp*, *Aktin* mRNA mit Polysomen zu den angegebenen Zeitpunkten nach erfolgter RNA Extraktion (siehe 3.5.1; 3.5.1.2) mittels quantitativer Realtime PCR (siehe 3.6.3) zu analysieren.

4 Ergebnisse

4.1 Expression und translationelle Regulation von MOBP in Oligodendrozyten

4.1.1 MOBP Expression in Oligodendrozyten

Die Translation vieler mRNAs ist räumlich und zeitlich reguliert und lokalisierte mRNAs wie *Mbp* können mindestens einen Tag vor Proteinsynthese detektiert werden (Besse and Ephrussi, 2008; Colello et al., 1995). Neben *Mbp* wird auch für andere A2RE-enhaltende mRNAs, wie *CamKIIalpha*, *Neurogranin*, *Arc* und *Mobp* vermutet, dass diese in hnRNP A2-abhängigen RNA Granulas zur axo-glialen Kontaktseite transportiert werden (Barbarese et al., 1999; Gao et al., 2008). Die ein A2RE- enthaltenden *Mobp* mRNAs (*Mobp* 71,81A,99 und 169) sind wie *Mbp* in Bereichen der „*myelin sheath assembly site*“ lokalisiert und die kleinen basischen Proteine assoziieren mit der MDL im kompakten Myelin. Kompaktierung und Stabilisierung der Myelinmembran sind Funktionen, mit welchen MOBP assoziiert wurde. Auf zellulärer Ebene hingegen ist MOBP bisher noch keine Rolle zugeschrieben worden.

In den folgenden Abschnitten werden die Ergebnisse der exprimierten *Mobp* mRNA und Proteinmengen in differenzierenden primären Oligodendrozytenkulturen beschrieben.

4.1.1.1 Der Startpunkt der *Mobp* mRNA Expression und Proteinsynthese differiert in primären Oligodendrozyten

Um einen Einblick in die translationelle Regulation von MOBP zu erhalten, wurden die *Mobp* mRNA und Proteinmengen in differenzierenden Oligodendrozytenkulturen analysiert. Hierzu wurden NG2-exprimierende Oligodendrozytenvorläuferzellen aus *wildtyp* Mäusen (P9) isoliert (siehe 3.7.2) und *in vitro* differenziert. Nach 1, 3, 5 und 7 Tagen *in vitro* (*days in vitro*, DIV) erfolgte die Isolierung von RNA (siehe 3.5.1.2) und Proteinen (siehe 3.9.1.1).

Reverse Transkription (siehe 3.5.2) und PCR Amplifikation (siehe 3.6.3) mittels spezifischer Primer- Sonden Kombination (siehe Tabelle 10) ermöglichten die quantitative Analyse aller *Mobp* und *Mbp* Isoformen im Laufe der Oligodendrozytendifferenzierung, wobei β -*Aktin* als Referenzgen diente.

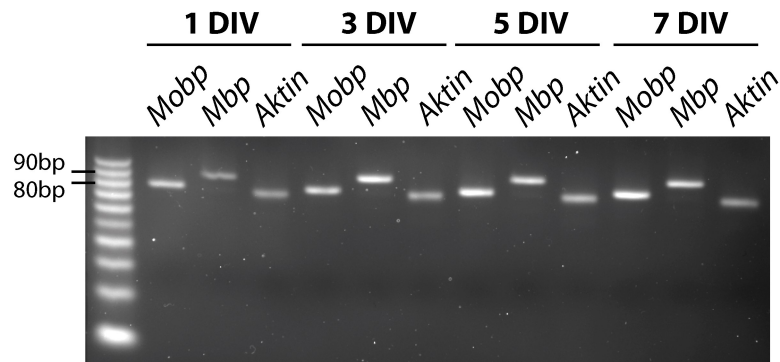
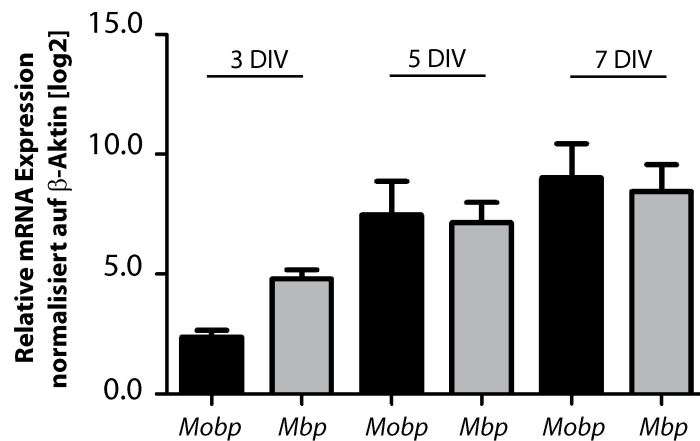
A**B**

Abbildung 11: *Mobp* mRNA Expression in differenzierenden primären Oligodendrozyten. **A**, Qualitative Analyse der *Mobp*, *Mbp* und β -*Actin* mRNA in primären murinen Oligodendrozyten mittels RT-PCR auf einem Ethidiumbromid gefärbten Agarosegel zu den angegebenen Zeitpunkten oligodendroglialer Differenzierung *in vitro*. **B**, Relative Quantifizierung der mRNA Mengen in den differenzierenden primären Oligodendrozyten mittels qPCR, wobei 1DIV als Referenzkondition und β -*Aktin* als Referenzgen diente. Die Säulen repräsentieren Mittelwerte (\log_2 Skalierung) \pm SEM; n=3.

Die entsprechenden Amplikons der *Mobp* (78nt), *Mbp* (88nt) und *Aktin* (75nt) mRNA wurden mit Hilfe der in Abbildung 11A gezeigten Analyse der RT-PCR über Agarosegelelektrophorese visualisiert (siehe 3.6.3.1.1). Bereits nach 1DIV konnte die Anwesenheit der *Mobp* und *Mbp* mRNA in oligodendroglialen Zellen nachgewiesen werden. Wie erwartet, konnte mittels relativer Quantifizierung anhand der $\Delta\Delta C_t$ -Methode, welche die Expression eines Zielgens (*Mobp*; *Mbp*) auf die Expression eines konstant exprimierten Referenzgens (β -*Aktin*) bezieht, ein Anstieg der Mengen an *Mobp* und *Mbp* mRNA im Zuge der Oligodendrozytenentwicklung verzeichnet werden.

Parallel wurden Gesamtzelllysate aus primären Oligodendrozyten (siehe 3.9.1.1) unterschiedlicher Differenzierungsstadien (1, 3, 5, 7 DIV) hergestellt und auf die Synthese von MOBP, sowie anderen oligodendroglialen Proteinen analysiert, wobei Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) als Kontrolle diente.

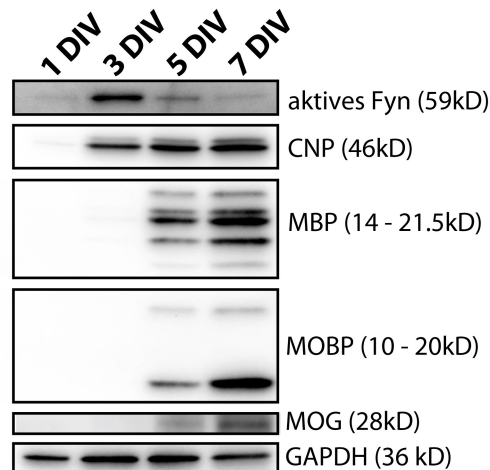


Abbildung 12: MOBP Protein Synthese in differenzierenden primären Oligodendrozyten. Detektion aktiver Fyn-Kinase, CNP, MBP, MOBP und MOG Proteinmengen in primären murinen Oligodendrozyten mittels Western Blot Analyse zu den angegebenen Zeitpunkten oligodendroglialer Differenzierung *in vitro* (DIV, days in vitro, Tage *in vitro*). GAPDH Mengen dienten als Ladekontrolle.

Die Western Blot Analyse in Abbildung 12 zeigt die endogen vorliegenden MOBP Isoformen nach 5DIV durch zwei deutliche Banden bei 10-20kD, wobei die sieben Isoformen mittels Western Blot Analyse nicht voneinander unterschieden werden können. Hierbei repräsentiert die untere Bande bei ~10kD die kleinen Isoformen MOBP69, 71, 81A/B, 99, wohingegen die obere Bande bei ~20kD die Detektion der Isoformen MOBP169, 170 darstellt. Genau wie MOBP, kann auch MBP erstmals nach 5DIV mit seinen 5 Isoformen in der Größenordnung 14-21.5kD detektiert werden. CNP ist bereits nach 3DIV detektierbar und MOG, ein Marker für reife Oligodendrozyten, ist erst zu einem späteren Zeitpunkt als MOBP und MBP stark exprimiert. Die ansteigenden Proteinmengen der Myelinproteine sind ein Maß für die spontane Differenzierung der kultivierten Oligodendrozyten *in vitro*.

Nachfolgend wurde mittels Immunzytochemie (siehe 3.9.6.1) an den verschiedenen Zeitpunkten oligodendroglialer Differenzierung der Beginn der MOBP und MBP Expression evaluiert. Als früh exprimierter Marker der primären Oligodendrozyten diente CNP. In der nachfolgenden Abbildung 13 ist deutlich zu sehen, dass CNP bereits an DIV1 in den noch bipolaren Oligodendrozytenvorläuferzellen zu detektieren ist, wohingegen noch kein MOBP und MBP Signal vorhanden ist. Anhand der CNP Färbung an DIV3 kann vernommen

werden, dass sich die Oligodendrozyten *in vitro* weiter differenziert haben. Im Vergleich zu der bipolaren Morphologie an DIV1, haben die Zellen nun bereits mehrere primäre Ausläufer ausgebildet, welche sich zum Teil auch schon weiter in sekundäre Ausläufer verzweigen. In diesem Stadium der Oligodendrozytendifferenzierung ist auch eine schwache perinukleäre Reaktivität der MOBP und MBP Expression detektierbar. Im darauffolgend hier analysierten Differenzierungsstadium (5DIV) bilden die Oligodendrozyten bereits ein komplexes Netzwerk aus Ausläufern, welche neben dem Zytoplasma, positiv für alle drei Myelinproteine sind.

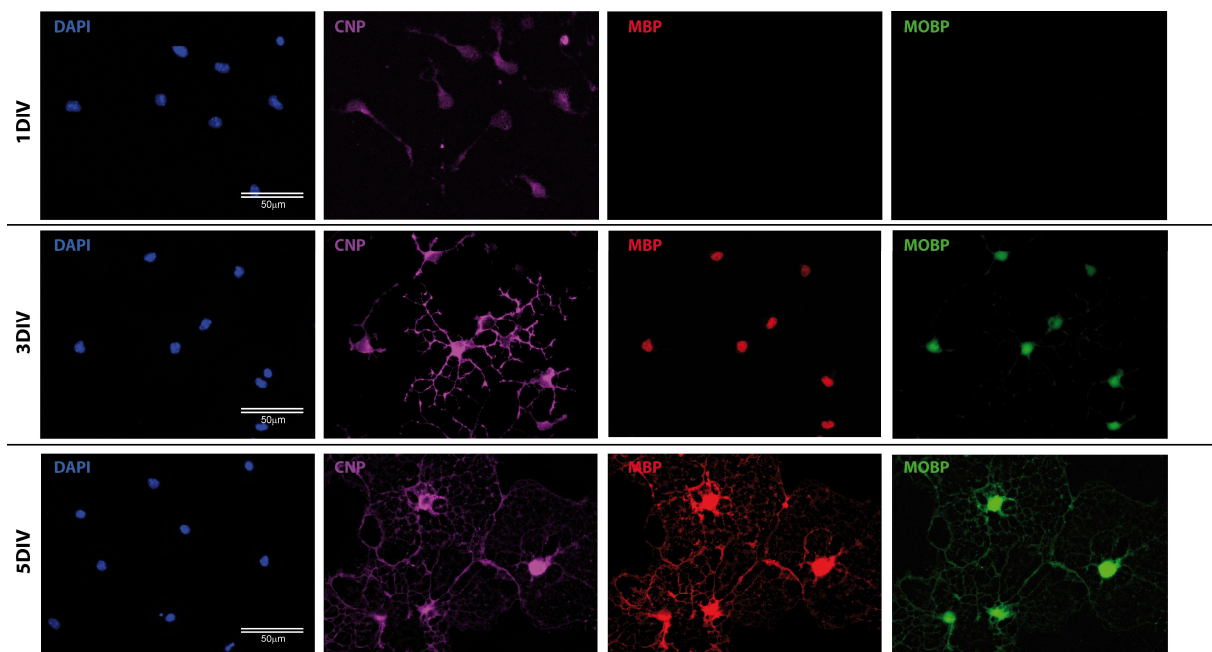


Abbildung 13: MOBP Immunzytochemie in differenzierenden Oligodendrozyten. Detektion von CNP, MBP, MOBP Protein in differenzierenden primären murinen Oligodendrozyten mittels Immunzytochemie zu den angegebenen Zeitpunkten oligodendroglialer Differenzierung. Zellkerne wurden mittels DAPI gefärbt. Die Maßstabskala beträgt 50µm.

In diesem Abschnitt konnte gezeigt werden, dass die mRNA und Protein Expressionsmuster beider basischer Myelinproteinfamilien in *in vitro* differenzierten primären Oligodendrozyten zeitlich korrelieren.

4.1.1.2 MOBP kann im Zytoplasma und in den primären Zellfortsätzen muriner Oligodendrozyten nachgewiesen werden

Neben dem einhergehenden Expressionsmuster von MOBP und MBP, konnte allerdings ein Unterschied in der Verteilung beider Proteine in differenzierten Oligodendrozyten festgestellt werden. Zur Analyse der Proteinverteilung wurden ebenfalls NG2-exprimierende Oligodendrozytenvorläuferzellen aus *wildtyp* Mäusen (P9) isoliert (siehe 3.7.2) und *in vitro* für

5 Tage differenziert. Danach erfolgte eine Kofärbung der beiden basischen Myelinproteine, MOBP und MBP mit den in Tabelle 4 und Tabelle 6 aufgezeigten Primär- und Sekundärantikörpern. Die Detektion der Proteine erfolgte an einem TCS SP5 konfokalen Mikroskop unter Verwendung eines 40x Öl-Objektives und der LAS AF 2.6.3 Software (siehe 3.9.6.2). In der nachfolgenden Abbildung 14 ist eine einzelne konfokale Ebene, welche die höchste Fluoreszenz aufwies, dargestellt.

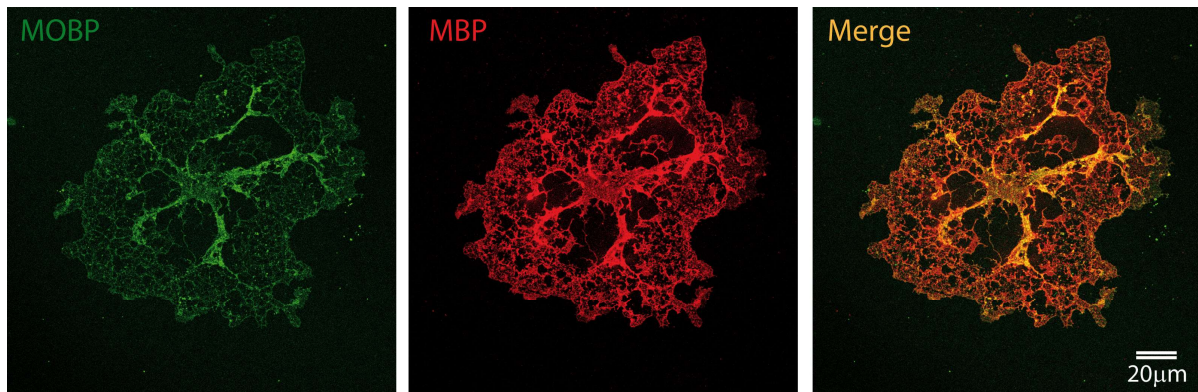


Abbildung 14: MOBP Proteinverteilung in differenzierten primären Oligodendrozyten. Einzelne konfokale Ebene (mit höchster Intensität) eines 5 DIV (Tage *in vitro*) kultivierten und anschließend mit den angezeigten Antikörpern gefärbten primären murinen Oligodendrozyten. Der Größenmaßstab beträgt 20µm.

Neben MBP, welches in hohem Maße in den Myelin-ähnlichen Membranen lokalisiert ist (siehe Abbildung 14; (Aggarwal et al., 2011b)) wurde MOBP eher im oligodendroglialen Zytoplasma und in den großen Ausläufern primärer Oligodendrozyten detektiert, was durch zuvor erbrachte Beobachtungen aus dem Jahre 1998 von Montague und Kollegen bestätigt wird (Montague et al., 1998).

4.1.2 Translationelle Regulation von MOBP in Oligodendrozyten

4.1.2.1 *Mobp* mRNA unterliegt einer translationellen Repression in den Anfangsstadien der Oligodendrozytendifferenzierung

Die aus den MOBP Expressionsuntersuchungen erhobenen Ergebnisse zeigen deutlich, dass *Mobp* mRNA bereits in den frühen Differenzierungsstadien der Oligodendrozyten detektiert werden kann, wohingegen MOBP Protein erst zu einem späteren Zeitpunkt der Entwicklung verzeichnet werden konnte. Dies könnte zum einen mit den unterschiedlichen Empfindlichkeiten der verwendeten Detektionsmethoden in Zusammenhang stehen oder

aber auf eine translationelle Repression der *Mobp* mRNA in den Anfangsstadien der Oligodendrozytendifferenzierung schließen lassen.

Um diese Hypothese zu verifizieren, werden im Folgenden die Ergebnisse der endogen durchgeführten hnRNP A2 Immunpräzipitation, der Behandlung primärer Oligodendrozyten mit dem proteasomalen Inhibitor ALLN, sowie der *Mobp* mRNA-Polysomen Interaktion in differenzierenden Oligodendrozyten beschrieben.

4.1.2.1.1 *Mobp* mRNA und hnRNP A2 interagieren in primären Oligodendrozyten

Zur Überprüfung der aufgestellten Hypothese, *Mobp* mRNA unterliege einer translationellen Regulation identisch der von *Mbp* mRNA, wurde eine endogene Immunpräzipitation (IP) des hnRNP A2- Proteins, welches für die Rekrutierung von A2RE enthaltenden mRNAs in RNA Granula verantwortlich ist, durchgeführt (siehe 3.9.5.). Die hnRNP A2 Proteine wurden mittels magnetischer Protein G Dynabeads und monoklonalem anti hnRNP A2 Antikörper aus 6DIV kultivierten primären Oligodendrozyten immunpräzipitiert, um eine Interaktion von *Mobp* mRNA und hnRNP A2 zu analysieren. Anschließend wurde die an die eluierten Proteine assoziierte RNA extrahiert (siehe 3.5.1.2), revers transkribiert (siehe 3.5.2) und mittels qPCR unter Nutzung spezifischer Primerpaare für *Mobp*, *Mbp* und *G6pdh* (Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase) analysiert (siehe 3.6.3; Tabelle 10). Als Negativkontrolle wurde der anti FLAG Antikörper gleichen Isotyps an die magnetischen Protein G Dynabeads gekoppelt und ebenfalls mit dem Oligodendrozytenlysat inkubiert. In diesem Ansatz sollte somit kein endogenes hnRNP A2 Protein angereichert werden und somit keine assoziierte RNA erkennbar sein. Zur Überprüfung der Spezifität der qPCR wurde des Weiteren ein Ansatz ohne zugefügte cDNA analysiert, um sicher zu sein, dass keine Verunreinigungen amplifiziert werden und somit als Signal in der qPCR gewertet werden. In der nachfolgenden Abbildung 15 ist das Ergebnis des Western Blots zur Kontrolle der endogenen hnRNP A2 IP, sowie die auf einem 4% Agarosegel aufgetrennten Amplikons der durchgeführten qPCR, dargestellt.

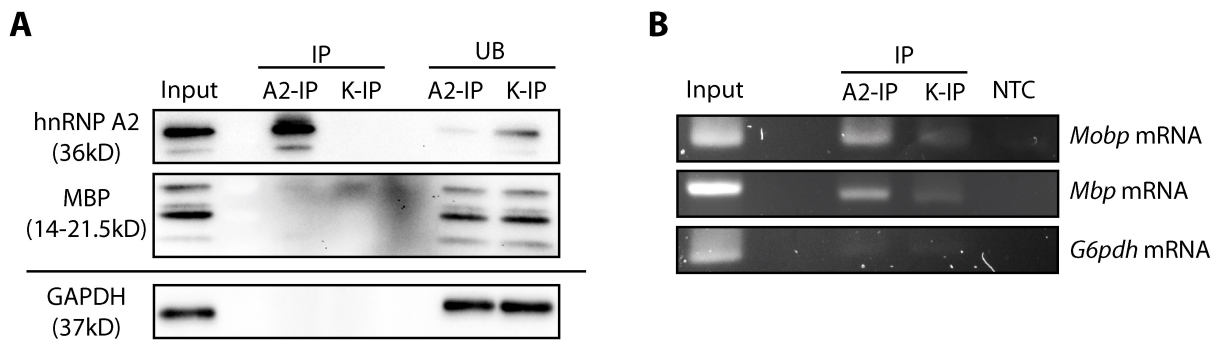


Abbildung 15: *Mobp* mRNA ist mit hnRNP A2 in einer endogenen A2-IP assoziiert. **A**, Western Blot der endogenen hnRNP A2- IP aus 6 DIV kultivierten primären murinen Oligodendrozyten. Antikörper gegen hnRNP A2, MBP und GAPDH als Spezifitätskontrolle wurden genutzt. Die horizontale Linie separiert die beiden Western Blots mit denselben aufgetragenen Proben. Als Negativkontrolle diente der FLAG Antikörper und ist mit Kontroll-IP (K-IP) bezeichnet. **B**, RT-PCR der A2-IP aus (A). NTC, no template control. *Mobp* und *Mbp* mRNAs sind in der A2-IP gegenüber der K-IP angereichert, nicht aber *G6pdh* mRNA.

Abbildung 15A zeigt den Western Blot zur endogen durchgeführten hnRNP A2-IP. Das in die IP eingesetzte Lysat (Input) der 6DIV kultivierten Oligodendrozyten enthält hnRNP A2, GAPDH und MBP, was verdeutlicht, dass die Zellen *in vitro* differenzieren konnten. In der IP wurden spezifisch nur hnRNP A2 Proteine aufgereinigt, da keine Bande für hnRNP A2 in der Kontroll IP (K-IP) und keine Bande für das Referenzprotein GAPDH in der A2-IP detektiert werden konnten. Wie gut die hnRNP A2 Anreicherung funktioniert hat, zeigt die Probe UB (ungebunden). Denn hier kann in der hnRNP A2 IP nur noch ein schwaches Signal für hnRNP A2 Protein detektiert werden. In Abbildung 15B sind die auf einem Agarosegel aufgetrennten Amplikons der RT-PCR von *Mobp* (78nt), *Mbp* (88nt) und *G6pdh* (81nt) aus der in Abbildung 15A gezeigten hnRNP A2 IP dargestellt. Die in die RT-PCR eingesetzte cDNA (Input) enthält alle getesteten mRNAs, wohingegen in der hnRNP A2 IP nur eine Bande für *Mobp* und *Mbp* zu detektieren ist, was für die Spezifität der durchgeführten Amplifikation spricht. Dies wird zusätzlich dadurch bestätigt, dass in der NTC keine Bande detektiert werden konnte. In der Kontroll- IP konnten allerdings Banden sehr schwacher Intensität verzeichnet werden, was auf mögliche Verunreinigung durch Übertragung von kleinen RNA-Mengen zurückzuführen sein könnte.

Zusammenfassend konnte im Zuge der hnRNP A2 Immunpräzipitation aus differenzierten primären Oligodendrozyten eine Interaktion zwischen dem hnRNP A2 Protein und *Mobp* mRNA bestätigt werden. Somit scheint *Mobp*, genau wie *Mbp*, mit der hnRNP A2-abhängigen mRNA Transportmaschinerie assoziiert zu sein.

4.1.2.1.2 MOBP Protein wird nicht über proteasomale Degradation in frühen Differenzierungsstadien primärer Oligodendrozyten abgebaut

Neben der in 4.1.2.1.1 vorgestellten Arbeitshypothese der reprimierten Proteinsynthese von *Mobp* und *Mbp* mRNA in den frühen Entwicklungsstadien primärer Oligodendrozyten, könnte auch durchgängige proteasomale Degradation dieser Proteine in den Vorläuferzellen Auslöser für die temporale Abweichung innerhalb der mRNA und Protein Detektion sein. Dies könnte somit auch erklären, warum *Mobp* und *Mbp* mRNAs bereits nach 1DIV detektierbar sind und die Proteine nicht. Um diese Möglichkeit zu überprüfen, wurden primäre Oligodendrozyten im Stadium der Vorläuferzellen (DIV1,3) für vier Stunden mit 100 μ M N-Acetyl-L-leucyl-L-leucyl-L-norleucinal (ALLN), einem Inhibitor proteasomaler Degradation (Kramer-Albers et al., 2006; White et al., 2012), oder DMSO als Kontrolle behandelt und anschließend mittels Western Blot (siehe 3.9.1.1, 3.9.3, 3.9.4) analysiert.

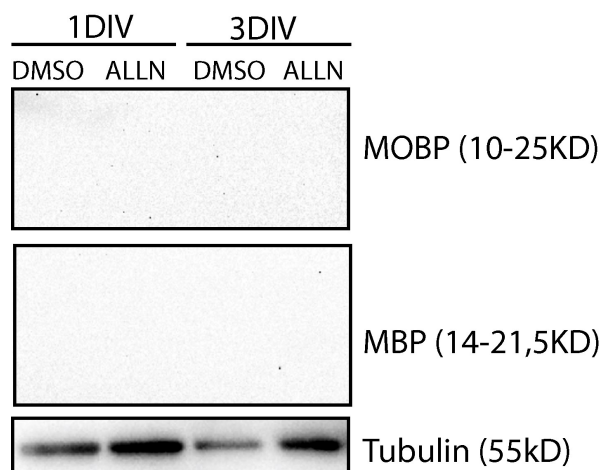


Abbildung 16: MOBP Protein wird nicht über proteasomale Degradation in den frühen Differenzierungsstadien primärer Oligodendrozyten abgebaut. Detektion von MOBP, MBP und α -Tubulin nach vier stündiger Behandlung primärer Oligodendrozyten (2DIV, 3DIV) mit ALLN, einem Inhibitor proteasomaler Degradation, oder DMSO als Kontrolle mit den angegebenen Antikörpern.

In Abbildung 16 ist der Western Blot der behandelten Oligodendrozytenvorläuferzellen dargestellt. Während α -Tubulin Proteinmengen nach ALLN Behandlung im Vergleich zur DMSO Behandlung erhöht sind, konnte weder für MOBP noch für MBP eine frühzeitige Proteinsynthese vermerkt werden. Folglich ist proteasomaler Abbau eine unwahrscheinliche Variante, um für die verspätete Detektion der beiden Myelinproteine verantwortlich zu sein.

4.1.2.1.3 *Mobp* mRNA- Polysomen Assoziation in differenzierenden Oligodendrozyten

Um die Idee der erhöhten translationellen Aktivität der *Mobp* und *Mbp* mRNA in den reiferen Entwicklungsstadien primärer Oligodendrozyten zu untermauern, wurde die Assoziation der *Mobp* und *Mbp* mRNA mit Polysomen in reifen Oligodendrozyten im Vergleich zu Oligodendrozytenvorläuferzellen mittels Polysom Profil Analyse mit daran anschließender RT-PCR auf die an die polysomale Fraktion assoziierter mRNA untersucht.

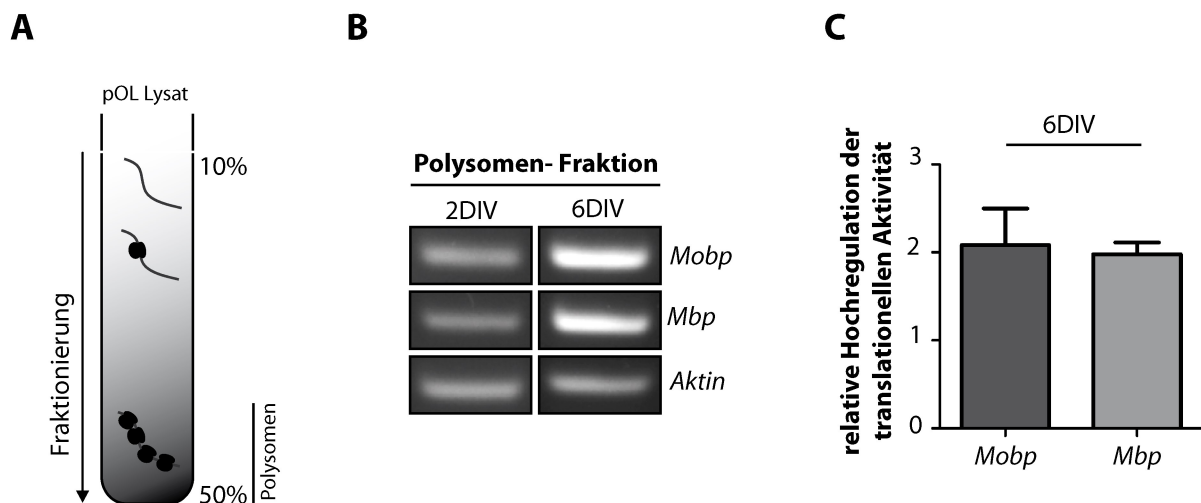


Abbildung 17: Hochregulation der *Mobp* mRNA Translation in differenzierten Oligodendrozyten. Lysate primärer Oligodendrozytenvorläuferzellen (2DIV) sowie ausdifferenzierter Oligodendrozyten (6DIV) wurden auf einen 10-50% linearen Saccharosegradienten geladen und mittels Zentrifugation fraktioniert. **A**, schematische Darstellung der Fraktionierung mittels Saccharosegradient. **B**, Qualitative Analyse der *Mobp*, *Mbp* und β -*Aktin* mRNA primärer Oligodendrozyten mittels RT-PCR auf einem Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegel zu den angegebenen Zeitpunkten. **C**, Relative Quantifizierung der *Mobp* und *Mbp* mRNA Mengen in der Polysomenfraktion differenzierter Oligodendrozyten (6DIV) mittels qPCR und *Rn18S* als Referenzgen und DIV2 als Referenzkondition. Die Säulen repräsentieren Mittelwerte +/- SEM; n=2.

Zunächst wurden wie in Abbildung 17A schematisch dargestellt die mRNA, freie 40S, 60S, 80S Untereinheiten, Monosomen und Polysomen über einen linearen Saccharose-Gradienten in der dargestellten Sedimentationsrichtung (10-50%) für zwei Stunden fraktioniert. Anschließend wurden aus den gepoolten Polysomenfraktionen RNA extrahiert, revers transkribiert und schließlich mittels qPCR auf Interaktion mit *Mobp*, *Mbp*, β -*Aktin* und *Rn18S* mRNA untersucht.

In Abbildung 17B sind die einzelnen Amplikons der RT-PCR mittels Agarosegelelektrophorese visualisiert (siehe 3.6.3.1.1). Zu beiden Zeitpunkten der oligodendroglialen Differenzierung sind *Mobp* (78nt), *Mbp* (88nt), sowie β -*Aktin* (75nt) detektierbar. Allerdings steigt die Intensität der Banden bei *Mobp* und *Mbp* im Gegensatz zu *Aktin* nach 6DIV im Vergleich zu 2DIV enorm an, was auch durch die relative Quantifizierung

in Abbildung 17C validiert werden konnte. Anhand der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode, welche die Expression eines Zielgens (*Mobp*; *Mbp*) auf die Expression eines konstant exprimierten Referenzgens (*Rn18S*) bezieht, konnte ein zweifacher Anstieg an mit Polysomen assoziierter *Mobp* und *Mbp* mRNA verzeichnet werden (siehe Abbildung 17C). Dieses Ergebnis zeigt einen Anstieg an translationeller Aktivität der *Mobp* und *Mbp* mRNA im Zuge der Oligodendrozytendifferenzierung, was schließlich die zuerst aufgestellte Hypothese von einer translationellen Repression der *Mobp* mRNA in den frühen Phasen der Zellentwicklung fundiert.

In Abschnitt 4.1.2 konnte bisher gezeigt werden, dass die *Mobp* mRNA genau wie *Mbp* mit der hnRNP A2-abhängigen Transportmaschinerie assoziiert ist. Zudem konnte gezeigt werden, dass deren translationelle Aktivierung zu späteren Zeitpunkten der Oligodendrozytenentwicklung hochreguliert wird, was die Idee der translationellen Repression während früher Reifestadien der Zellen untermauert.

4.1.2.2 Fyn- vermittelte translationelle Regulation von MOBP

Um nun einen besseren Einblick in den Mechanismus der translationellen Derepression in reifen Oligodendrozyten zu erhalten, sollten als nächstes mögliche Signalmoleküle identifiziert werden, die imstande sind, die MOBP Proteinsynthese zu regulieren.

Die Fyn-Kinase wird im hohen Maße in sich differenzierenden Oligodendrozyten exprimiert (Zhang et al., 2014), ist ein zentrales Schlüsselprotein in vielen Signalkaskaden (Krämer-Albers et al., 2011) und induziert die Translation von *Mbp* (White et al., 2008). Wie in den vorangegangenen Kapiteln gezeigt, ist das Expressionsmuster von MBP und MOBP durchaus vergleichbar und daher soll in den folgenden Abschnitten auf die Frage eingegangen werden, ob der Aktivitätszustand der Fyn-Kinase auch einen Einfluss auf die MOBP Proteinmenge ausübt.

4.1.2.2.1 Abhängigkeit der MOBP Proteinmenge vom Aktivitätszustand der Fyn-Kinase

In den nachfolgenden drei Unterpunkten sind die Ergebnisse der endogen durchgeführten Manipulation der Fyn-Kinase Aktivität und deren Effekt auf die MOBP Proteinmenge gezeigt. Als Positivkontrolle diente hier die Analyse der MBP Proteinmenge, da dessen Translation durch die Fyn- Kinase induziert wird. Als Negativkontrollen dienten zwei weitere

Myelinproteine, CNP und PLP, welche keiner lokalen Translation durch die Fyn-Kinase in Oligodendrozyten unterliegen.

4.1.2.2.1.1 Fyn- Kinase Knockdown

Im ersten Versuchsansatz wurden die Proteinmengen der Fyn-Kinase in primären *wildtyp* Oligodendrozyten nach 5DIV mittels siRNA (siehe 3.8.2.2) herunterreguliert und nachfolgend durch Western Blot Analyse die Effekte bezüglich der vorliegenden Proteinmenge der Myelinproteine MOBP, MBP, PLP und CNP überprüft.

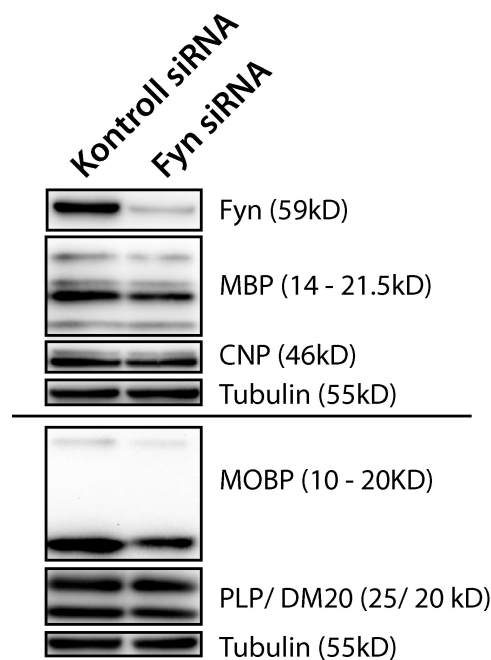


Abbildung 18: siRNA-vermittelter Fyn Knockdown und seine Auswirkung auf die Myelinproteine MOBP, MBP, CNP und PLP. Primäre murine Oligodendrozyten (5DIV) wurden mit Fyn siRNA oder Kontroll siRNA transfiziert und 48 Stunden später mittels Western Blot analysiert. Repräsentativer Western Blot zur Detektion von Fyn, MBP, CNP, MOBP, PLP und α -Tubulin in den Gesamtzelllysaten aus Kontroll- und Fyn siRNA behandelten Oligodendrozyten (7DIV). Die horizontale Linie separiert die beiden Western Blots mit denselben aufgetragenen Proben.

In Abbildung 18 ist ein exemplarischer Western Blot der 48 stündigen Behandlung primärer Oligodendrozyten mit Fyn siRNA im Vergleich zu Kontroll siRNA behandelten Zellen dargestellt. Mit Hilfe der densitometrischen Analyse unter Nutzung der *Image Lab 5.0* Software von Biorad wurden die Proteinmengen der Zielproteine (Fyn, MBP, CNP, MOBP und PLP) auf die Proteinmenge eines Kontrollproteins (α -Tubulin) normalisiert. Um den *Knockdown* der Fyn-Kinase zu verifizieren, wurde zunächst die Proteinmenge der Fyn-

Kinase in sechs voneinander unabhängigen Replikaten in Fyn siRNA behandelten Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen analysiert (siehe Abbildung 19).

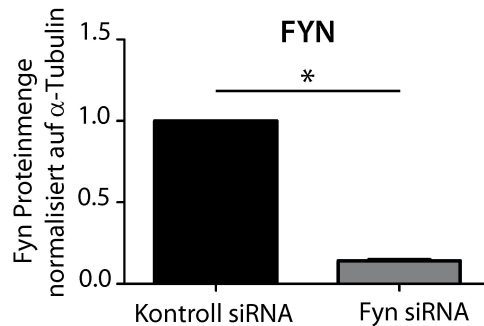


Abbildung 19: siRNA vermittelter Fyn Knockdown. Primäre murine Oligodendrozyten (5DIV) wurden mit Fyn siRNA oder Kontroll siRNA transfiziert und 48 Stunden später mittels Western Blot analysiert. Densitometrische Analyse der biologischen Replikate (n) aus **Abbildung 18** ergibt die normalisierte Fyn/ α -Tubulin Menge mit Kontroll siRNA als Referenzkondition. Die Säulen repräsentieren Mittelwerte \pm SEM; n=6; Wilcoxon signed-rank Test; *P<0.05.

Unter Zuhilfenahme des statistischen Wilcoxon signed- rank Test konnte eine signifikante Reduktion um 86% der Fyn-Proteinmenge erzielt werden (siehe Abbildung 18, Abbildung 19). Diese Verringerung in der Fyn- Expression wirkte sich auch signifikant auf die Expression der beiden basischen Myelinproteine MOBP und MBP aus, wie in den Graphen der nachfolgenden Abbildung 20 zu erkennen ist. Die MOBP Proteinmenge wurde um 31% reduziert und auch die Proteinmenge der Positivkontrolle MBP wurden um 29% reduziert (siehe Abbildung 18, Abbildung 20).

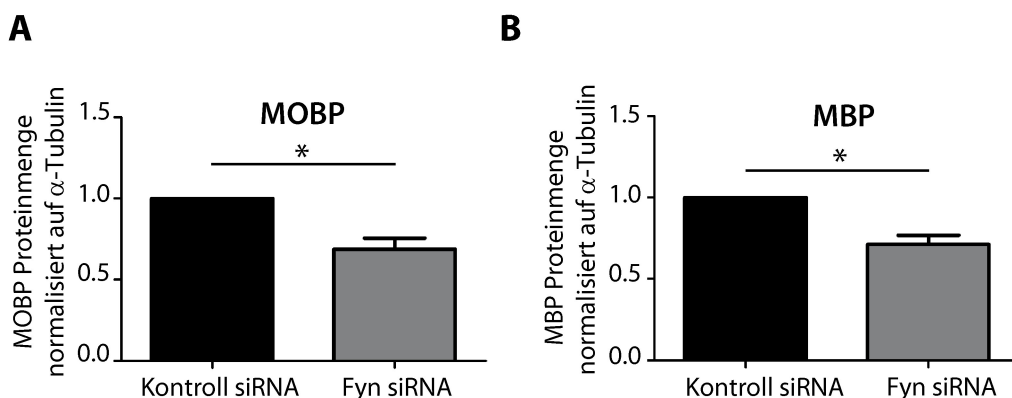


Abbildung 20: siRNA vermittelter Fyn Knockdown resultiert in reduzierten MOBP und MBP Mengen. Primäre murine Oligodendrozyten (5DIV) wurden mit Fyn siRNA oder Kontroll siRNA transfiziert und 48 Stunden später mittels Western Blot analysiert. Densitometrische Analyse der biologischen Replikate (n) aus **Abbildung 18** ergibt die normalisierte MOBP/ α -Tubulin (**A**) und MBP/ α -Tubulin (**B**) Menge mit Kontroll siRNA als Referenzkondition. Die Säulen repräsentieren Mittelwerte \pm SEM; n=6; Wilcoxon signed-rank Test; *P<0.05.

Ein solcher Effekt konnte allerdings nicht bei den Negativkontroll- Myelinproteinen verzeichnet werden. Diese zeigten nach Fyn *Knockdown* keine signifikante Verringerung in der Expression der jeweiligen Proteinmengen (siehe Abbildung 18, Abbildung 21).

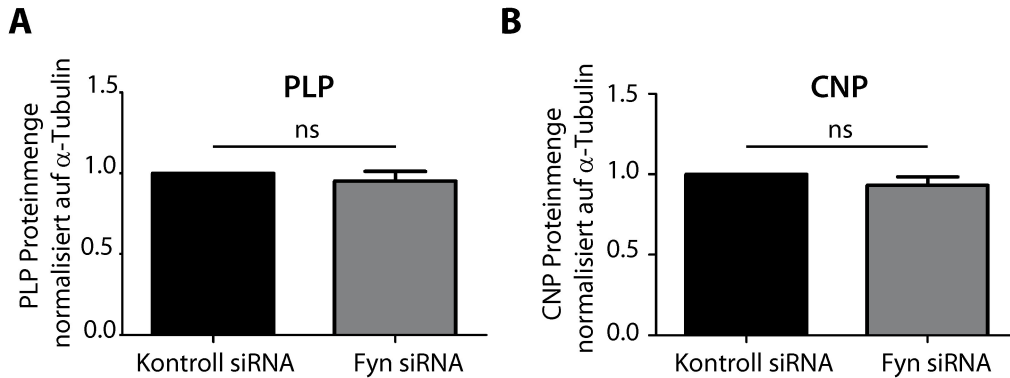


Abbildung 21: siRNA vermittelter Fyn Knockdown hat keinen Einfluss auf die PLP und CNP Expression. Primäre murine Oligodendrozyten (5DIV) wurden mit Fyn siRNA oder Kontroll siRNA transfiziert und 48 Stunden später mittels Western analysiert. Densitometrische Analyse der biologischen Replikate (n) aus **Abbildung 18** ergibt die normalisierte PLP/ α -Tubulin (**A**) und CNP/ α -Tubulin (**B**) Menge mit Kontroll siRNA als Referenzkondition. Die Säulen repräsentieren Mittelwerte \pm SEM; n=6; Wilcoxon signed-rank Test; ns=nicht signifikant.

Dieses Ergebnis des Fyn-Kinase Knockdown lässt einen Einfluss von Fyn auf die MOBP Synthese vermuten. Um diese Hypothese zu untermauern, wurden zwei weitere experimentelle Ansätze in primären Oligodendrozyten durchgeführt, in welchen nun der Aktivitätszustand der Kinase Angriffspunkt der Manipulation war.

4.1.2.2.1.2 Fyn- Kinase Inhibition

Zunächst sollte der Aktivitätszustand der zur Proteinfamilie der Src-Kinasen gehörigen Fyn-Kinase reduziert werden (siehe 2.3.2). Hierzu wurden primäre Oligodendrozyten mit PP2 behandelt, welcher ein potenter, reversibler ATP-kompetitiver Inhibitor der Src-Kinase Familie darstellt. Die Behandlung der Zellen erfolgte an zwei verschiedenen Zeitpunkten innerhalb der Differenzierung der kultivierten primären Oligodendrozyten (DIV1 und DIV5), um eine Abweichung der erzielten Effekte hinsichtlich des differentiellen Entwicklungsstadiums ausschließen zu können und dauerte bis zur Ausdifferenzierung der Zellen an (DIV7). Als Kontrollkondition wurden die Oligodendrozyten mit äquivalenten Mengen an DMSO behandelt. In der nachfolgenden Abbildung 22 ist ein exemplarischer Western Blot nach PP2 Behandlung der primären Oligodendrozyten gezeigt.

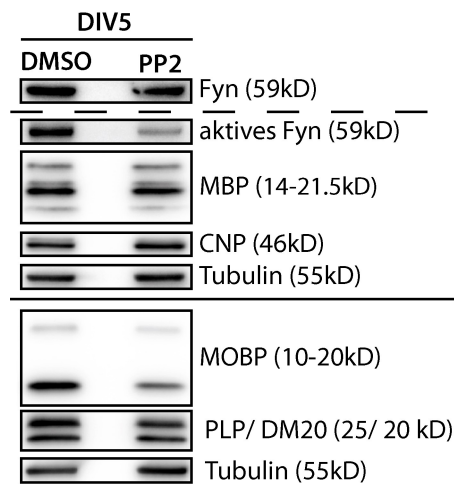


Abbildung 22: Verminderte Fyn-Kinase Aktivität und die Auswirkung auf die Expression der Myelinproteine MOBP, MBP, PLP und CNP. Primäre murine Oligodendrozytenvorläuferzellen (1DIV) sowie differenzierte Oligodendrozyten (5DIV) wurden einmalig mit $1\mu\text{M}$ PP2 oder DMSO als Kontrolle behandelt und mittels Western Blot nach 7 Tagen *in vitro* (7DIV) analysiert. Repräsentativer Western Blot zur Detektion von Fyn, aktiver Fyn-Kinase, MBP, CNP, MOBP, PLP und α -Tubulin in den Lysaten aus DMSO- und PP2 behandelten Oligodendrozyten (5DIV). Die durchgängige horizontale Linie separiert die beiden Western Blots mit denselben aufgetragenen Proben.

Auch hier wurde wie im vorangegangenen Abschnitt 4.1.2.2.1.1 eine densitometrische Analyse der Proteinbanden mit nachfolgender Normalisierung von MBP, CNP, MOBP und PLP auf Tubulin durchgeführt, um die Effekte der PP2 Behandlung zu analysieren. Um den Aktivitätsstatus der Fyn-Kinase zu analysieren, wurde das Signal für aktives Fyn auf die komplette Menge an endogen vorhandenem Fyn-Protein bezogen. Hierzu musste der Western Blot nach Inkubation mit dem Src418 Antikörper, welcher phosphoryliertes Tyrosin an der Position 418 (Y418) und somit aktives Fyn detektiert, mit Hilfe des in Tabelle 3 aufgeführten Western-Blot Stripping Puffer inkubiert werden, um nachfolgend die Gesamtproteinmenge von Fyn detektieren zu können (siehe Tabelle 4), was in Abbildung 22 durch die gestrichelte Linie symbolisiert wurde. Die PP2 Behandlung zeigt nach 1DIV, sowie nach 5DIV eine signifikante Reduktion der Fyn-Kinase Aktivität (siehe Abbildung 22, Abbildung 23) um 46% beziehungsweise 63% im Vergleich zur DMSO-Kontrolle.

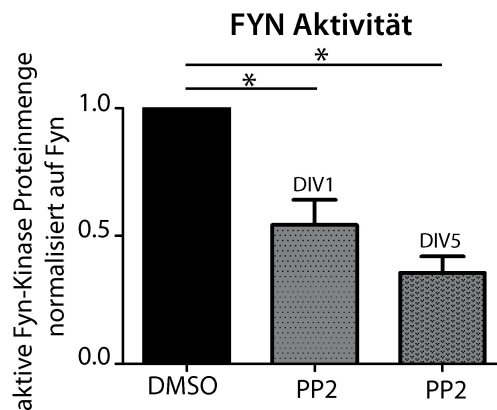


Abbildung 23: PP2- induzierte Reduktion der Fyn-Kinase Aktivität. Primäre murine Oligodendrozytenvorläuferzellen (1DIV) sowie differenziertere Oligodendrozyten (5DIV) wurden einmalig mit 1 μ M PP2 oder DMSO als Kontrolle behandelt und mittels Western Blot nach 7 Tagen *in vitro* (7DIV) analysiert. Densitometrische Analyse der biologischen Replikate (n) aus **Abbildung 22** ergibt die normalisierte aktive-Fyn/Fyn Menge in beiden PP2- Versuchsansätzen mit DMSO als Referenzkondition. Die Säulen repräsentieren Mittelwerte \pm SEM; n=6; Wilcoxon signed-rank Test; *P<0.05.

Zu beobachten ist zudem eine signifikante Verringerung der MOBP und MBP Proteinmenge um jeweils 37% nach einer 6 tägigen Inkubation, sowie um 57% beziehungsweise 29% nach einer 2 tägigen Inkubation, zum einen ersichtlich aus den verringerten Bandenintensitäten der MOBP- und MBP Isoformen im vorliegenden Western Blot (siehe Abbildung 22) und zum anderen aus dem in Abbildung 24 dargestellten Graphen.

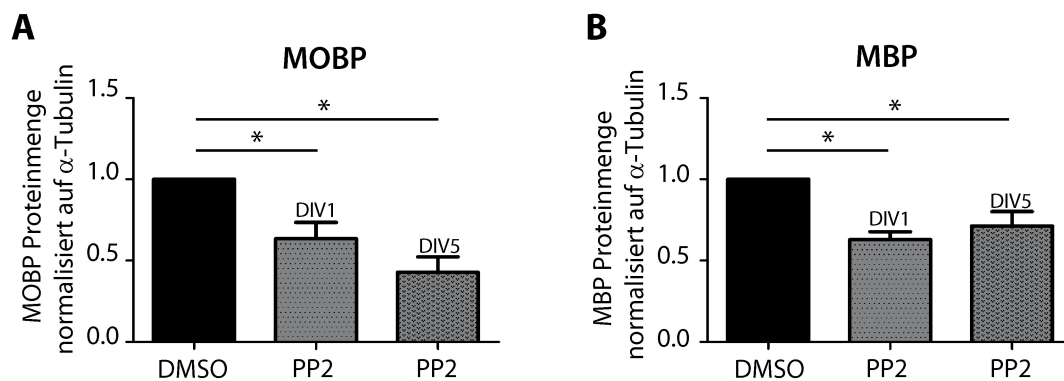


Abbildung 24: Die PP2- induzierte Reduktion der Fyn-Kinase Aktivität resultiert in verringerten MOBP und MBP Mengen. Primäre murine Oligodendrozytenvorläuferzellen (1DIV) sowie differenziertere Oligodendrozyten (5DIV) wurden einmalig mit 1 μ M PP2 oder DMSO als Kontrolle behandelt und mittels Western Blot nach 7 Tagen *in vitro* (7DIV) analysiert. Densitometrische Analyse der biologischen Replikate (n) aus **Abbildung 22** ergibt die normalisierte MOBP/ α -Tubulin (A) und MBP/ α -Tubulin (B) Menge in beiden PP2- Versuchsansätzen mit DMSO als Referenzkondition. Die Säulen repräsentieren Mittelwerte \pm SEM; n=6; Wilcoxon signed-rank Test; *P<0.05.

Dementgegen übte die Erniedrigung der Fyn-Kinase Aktivität keinen signifikanten Effekt auf die Mengen der CNP und PLP Proteine aus.

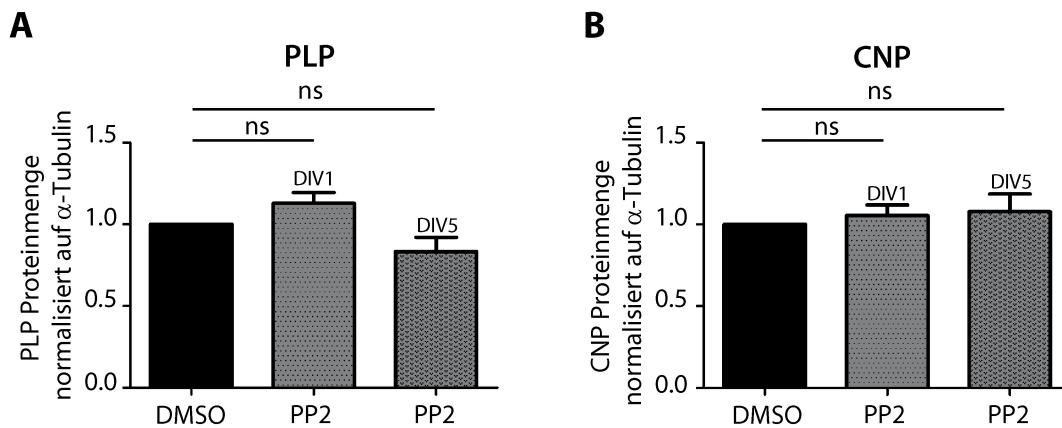


Abbildung 25: Die PP2- induzierte Reduktion der Fyn-Kinase Aktivität hat keinen Einfluss auf die PLP und CNP Expression. Primäre murine Oligodendrozytenvorläuferzellen (1DIV) sowie differenziertere Oligodendrozyten (5DIV) wurden einmalig mit $1\mu\text{M}$ PP2 oder DMSO als Kontrolle behandelt und mittels Western Blot nach 7 Tagen *in vitro* (7DIV) analysiert. Densitometrische Analyse der biologischen Replikate (n) aus **Abbildung 22** ergibt die normalisierte PLP/ α -Tubulin (**A**) und CNP/ α -Tubulin (**B**) Menge in beiden PP2-Versuchsansätzen mit DMSO als Referenzkondition. Die Säulen repräsentieren Mittelwerte \pm SEM; n=6; Wilcoxon signed-rank Test; ns=nicht signifikant.

Beide als Negativkontrolle fungierenden Myelinproteine zeigten keine signifikante Veränderung in ihren Proteinmengen, wie durch die Graphen in **Abbildung 25**, aber auch durch die Bandenintensitäten der Proteine in dem exemplarisch dargestellten Western Blot in **Abbildung 22** visualisiert werden konnte.

4.1.2.2.1.3 Fyn- Kinase Überexpression

Neben der Herunterregulation des gesamten Fyn Proteins mittels siRNA (siehe 4.1.2.2.1.1) und der Reduzierung der Fyn-Kinase Aktivität über PP2 (siehe 4.1.2.2.1.2), sollte nun die Fyn-Kinase Aktivität gesteigert werden. Hierzu wurden die Wildtyp Fyn-Kinase (FynWT) oder die inaktive Version der Fyn-Kinase (Fyn-) in primären Oligodendrozyten nach 2DIV mittels Transduktion basierend auf Nutzung Adeno-assoziiierter Viren (AAV) überexprimiert (siehe **Tabelle 7**; 3.8.3). Diese AAV Vektoren besitzen einen verkürzten MBP-Promotor, um eine effiziente Expression spezifisch in Oligodendrozyten zu gewährleisten (von Jonquieres et al., 2013). Fünf Tage nach der Transduktion wurden die Zelllysate mittels Western Blot und densitometrischer Analyse ausgewertet. Auch hier wurden MOBP, MBP, CNP und PLP Proteinmengen auf α -Tubulin normalisiert, wohingegen aktives Fyn auf die gesamte endogen exprimierte Menge an Fyn-Protein normalisiert wurde (siehe 4.1.2.2.1.2). In der nachfolgenden **Abbildung 26** ist ein exemplarischer Western Blot des Fyn-Überexpressionsexperiments dargestellt.

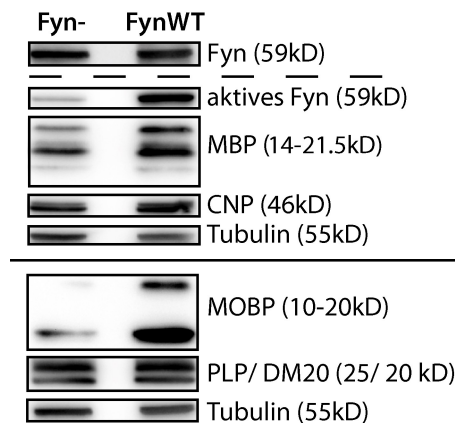


Abbildung 26: Erhöhte Fyn-Kinase Aktivität und die Auswirkung auf die Expression der Myelinproteine MOBP, MBP, PLP und CNP. Primäre murine Oligodendrozytenvorläuferzellen (2DIV) wurden einmalig mit AAVs (2×10^9 virales Genom (vg)/ml Kulturmedium), welche die Wildtyp Fyn-Kinase (FynWT) oder die konstitutiv inaktive Fyn-Kinase (Fyn-, Kontrolle) exprimieren, behandelt und mittels Western Blot nach 7 Tagen *in vitro* (7DIV) analysiert. Repräsentativer Western Blot zur Detektion von Fyn, aktiver Fyn-Kinase, MBP, CNP, MOBP, PLP und α -Tubulin in den Lysaten aus Fyn- und FynWT überexprimierenden Oligodendrozyten. Die durchgängige horizontale Linie separiert die beiden Western Blots mit denselben aufgetragenen Proben.

Um die Unterschiede im Aktivitätsstatus der Fyn-Kinase in den beiden experimentellen Ansätzen analysieren zu können, wurde auch hier wie im vorangegangenen Abschnitt 4.1.2.2.1.2 ein Antikörper (anti Src418) genutzt, welcher aktives Fyn detektiert. In der Analyse wurden schließlich die Zielproteine (Fyn, MOBP, MBP, CNP, PLP) aus den FynWT-transduzierten Zellen mit den Zielproteinen aus den Kontroll-transduzierten (Fyn-) Zellen in Relation gesetzt. Wie aus Abbildung 26 und Abbildung 27 deutlich wird, wurden die Mengen an aktiver Fyn-Kinase in FynWT gegenüber Fyn- überexprimierenden Zellen stark erhöht.

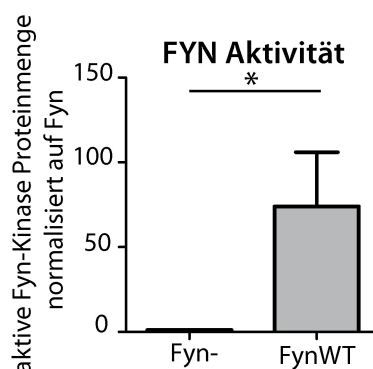


Abbildung 27: AAV-vermittelte Erhöhung der Fyn-Kinase Aktivität. Primäre murine Oligodendrozytenvorläuferzellen (2DIV) wurden einmalig mit AAVs (2×10^9 virales Genom (vg)/ml Kulturmedium), welche die Wildtyp Fyn-Kinase (FynWT) oder die konstitutiv inaktive Fyn-Kinase (Fyn-, Kontrolle) exprimieren, behandelt und mittels Western Blot nach 7 Tagen *in vitro* (7DIV) analysiert. Densitometrische Analyse der biologischen Replikate (n) aus **Abbildung 26** ergibt die normalisierte aktive- Fyn/Fyn Menge in FynWT überexprimierenden Oligodendrozyten mit Fyn- als Referenzkondition. Die Säulen repräsentieren Mittelwerte \pm SEM; n=6; Wilcoxon signed-rank Test; *P<0.05.

Darüber hinaus wurden auch die Proteinmengen an MOBP und MBP signifikant in Zellen erhöhter Fyn-Aktivität hochreguliert, was man deutlich im Western Blot in Abbildung 26, sowie in den Graphen der statistischen Analyse in Abbildung 28 erkennen kann.

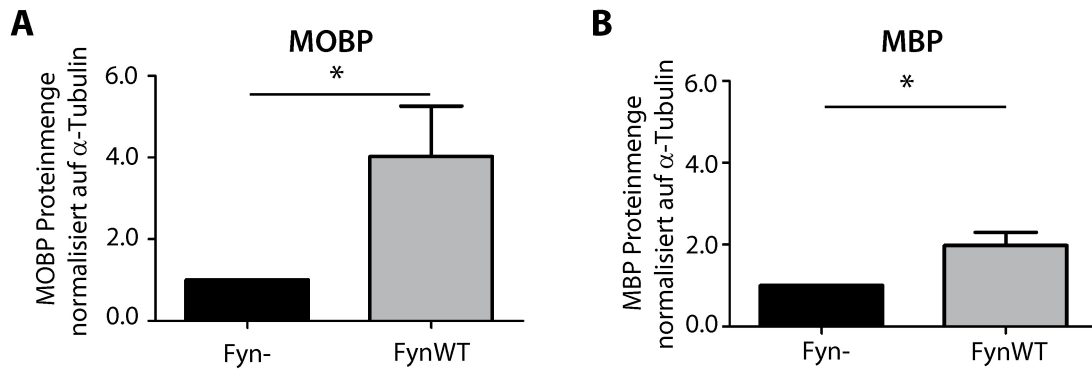


Abbildung 28: Die AAV-vermittelte Erhöhung der Fyn-Kinase Aktivität resultiert in einer gesteigerten MOBP und MBP Proteinsynthese. Primäre murine Oligodendrozytenvorläuferzellen (2DIV) wurden einmalig mit AAVs (2×10^9 virales Genom (vg)/ml Kulturmedium), welche die Wildtyp Fyn-Kinase (FynWT) oder die konstitutiv inaktive Fyn-Kinase (Fyn-, Kontrolle) exprimieren, behandelt und mittels Western Blot nach 7 Tagen *in vitro* (7DIV) analysiert. Densitometrische Analyse der biologischen Replikate (n) aus **Abbildung 26** ergibt die normalisierte MOBP/ α -Tubulin (**A**) und MBP/ α -Tubulin (**B**) Menge in FynWT überexprimierenden Oligodendrozyten mit Fyn- als Referenzkondition. Die Säulen repräsentieren Mittelwerte \pm SEM; n=6; Wilcoxon signed-rank Test; *P<0.05.

Auch in dem Fall einer Aktivitätssteigerung der Fyn- Kinase zeigten die beiden Myelinproteine CNP und PLP keine signifikante Veränderung in ihren Proteinmengen (siehe Abbildung 26; Abbildung 29).

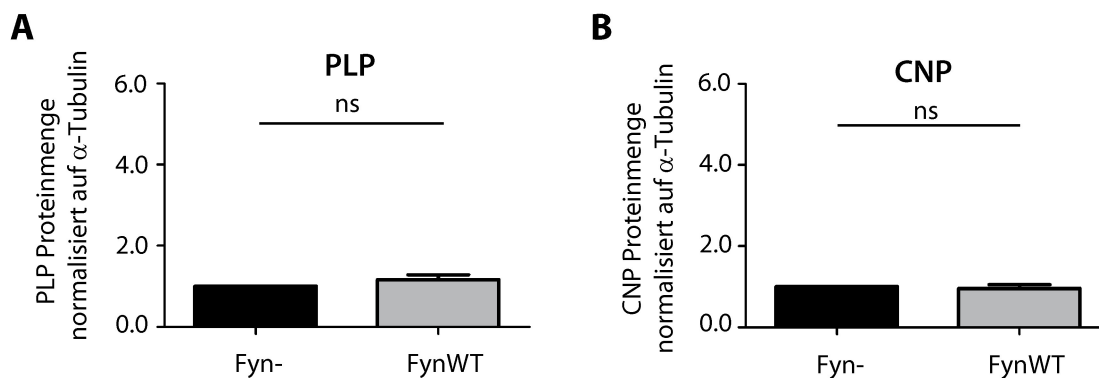


Abbildung 29: Die AAV-vermittelte Erhöhung der Fyn-Kinase Aktivität hat keinen Effekt auf die PLP und CNP Proteinsynthese. Primäre murine Oligodendrozytenvorläuferzellen (2DIV) wurden einmalig mit AAVs (2×10^9 virales Genom (vg)/ml Kulturmedium), welche die Wildtyp Fyn-Kinase (FynWT) oder die konstitutiv inaktive Fyn-Kinase (Fyn-, Kontrolle) exprimieren, behandelt und mittels Western Blot nach 7 Tagen *in vitro* (7DIV) analysiert. Densitometrische Analyse der biologischen Replikate (n) aus **Abbildung 26** ergibt die normalisierte PLP/ α -Tubulin (**A**) und CNP/ α -Tubulin (**B**) Menge in FynWT überexprimierenden Oligodendrozyten mit Fyn- als Referenzkondition. Die Säulen repräsentieren Mittelwerte \pm SEM; n=6; Wilcoxon signed-rank Test; ns=nicht signifikant.

Im Zuge drei verschiedener endogener Manipulationen des Fyn-Kinase Aktivitätszustandes konnte gezeigt werden, dass MOBP und MBP Proteinmengen durch die vorliegende Aktivität der Fyn Kinase in primären Oligodendrozyten beeinflusst werden, wohingegen andere Myelinproteine, wie CNP und PLP, unbeeinflusst bleiben. Somit wurde die Fyn- Kinase als neues Signalmolekül identifiziert, welches imstande ist, die translationelle Derepression der *Mobp* mRNA aufzuheben und somit die MOBP Proteinsynthese zu stimulieren.

4.1.2.2.2 A2RE- abhängige translationelle Regulation der ffluziMOBP-3'UTR Reporterkonstrukte durch Fyn

In einer vorangegangenen Studie konnte gezeigt werden, dass Fyn oligodendrogiales hnRNP A2 phosphoryliert. hnRNP A2 bindet in trans an die RNA Transportsequenz A2RE in der 3'UTR der *Mbp* mRNA (White et al., 2008). Während alle *Mbp* Isoformen ein A2RE inkludieren, besitzen nur *Mobp71*, *81A*, *99* und *169* mRNAs ein A2RE, wohingegen *Mobp69*, *81B* und *170* diese RNA Transportsequenz missen. Da durch die in Abschnitt 4.1.2.2.1 erhobenen Ergebnisse gezeigt werden konnte, dass zwischen dem Fyn- Aktivitätsstatus und den endogenen MOBP Proteinmengen in primären Oligodendrozyten ein Zusammenhang besteht, wurde im nächsten Schritt ein *in vitro* durchgeführter Luziferase-basierter Reporter Assay genutzt, um die Frage zu klären, ob aktive Fyn-Kinase spezifisch die Translation solcher *Mobp* Isoformen stimuliert, welche ein A2RE in ihrer 3'UTR inkludieren.

4.1.2.2.2.1 Generierte ffluziMOBP-3'UTR Reporterkonstrukte

Um die Frage der A2RE-abhängigen translationellen Regulation durch Fyn klären zu können, wurden im Zuge der vorangegangenen Diplomarbeit (Schäfer, 2012) drei MOBP-Reporterkonstrukte hergestellt, welche die 3'UTR von *Mobp81A* und *Mobp99* inklusive A2RE, oder die 3'UTR von *Mobp170*, ohne A2RE, stromabwärts des Firefly-Luziferase Gens besitzen.

4.1.2.2.2.2 Luziferase Assay

Für den *in vitro* Assay wurden *Oli-neu* Zellen, eine immortalisierte Oligodendrozytenvorläuferzelllinie (siehe 3.7.1), mit den ffluziMOBP-3'UTR Reporterkonstrukte und einem Plasmid, welches für Fyn- oder FynWT kodiert, kotransfiziert. Zudem wurde ein Plasmid, welches für die Renilla- Luziferase kodiert und denselben

Promotor wie die ffluziMOBP-3'UTR- Reporterkonstrukte besitzt, aber keine stromabwärts gelegenen regulatorischen Elemente trägt, in allen Experimenten kotransfiziert. Zwei Tage nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert und der DualGlo Luziferase Assay durchgeführt (siehe 3.9.7). Wie in der nachfolgenden Abbildung 30 dargestellt, resultierte die FynWT Transfektion in einer Steigerung der Fyn-Aktivität gegenüber Fyn- transfizierten Zellen. GAPDH Proteinmengen dienten hier als Ladekontrolle.

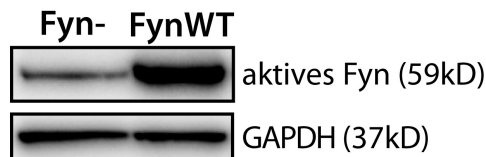


Abbildung 30: Fyn-Kinase Aktivität in für den Luziferase-Assay transfizierten Oli-neu Zellen. Oli-neu Zellen wurden mit Fyn- oder FynWT sowie dem entsprechenden ffluziMOBP-3'UTR Reporterkonstrukt und einem Renilla-Luziferase-Konstrukt kotransfiziert und 48 Stunden später mittels DualGlo Luziferase Assay analysiert. Repräsentativer Western Blot zur Aktivitätskontrolle der Fyn-Kinase in den transfizierten Oli-neu Zellen mit den angegebenen Antikörpern. In den FynWT transfizierten Zellen zeigt die Fyn-Kinase eine erhöhte Aktivität. Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) diente hier als Ladekontrolle.

Die mit Hilfe des TECAN Mikroplattenleser gemessenen relativen Lichtmengen, freigesetzt durch die Fireflyluziferase-Aktivität, wurden schließlich auf die gemessene Lumineszenz der Renilla Luziferase normalisiert, um transkriptionelle Einflüsse innerhalb des Versuchs ausschließen zu können. Die normalisierten Werte von FynWT transfizierten Zellen wurden nachfolgend auf die normalisierten Werte der Fyn- transfizierten Kontrollzellen bezogen.

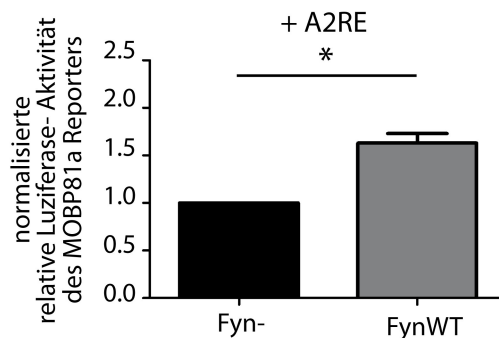


Abbildung 31: Normalisierte relative Luziferase-Aktivität des ffluziMOBP81a-Reporterkonstruktes. Oli-neu Zellen wurden mit Fyn- oder FynWT sowie dem entsprechenden ffluziMOBP81a- Reporterkonstrukt und einem Renilla-Luziferase-Konstrukt kotransfiziert und 48 Stunden später mittels DualGlo Luziferase Assay hinsichtlich der Translationsrate analysiert. Das Balkendiagramm zeigt die relative Luziferaseaktivität des A2RE-beinhaltenden ffluziMOBP81a-Reporterkonstruktes in FynWT in Bezug auf Fyn- transfizierten Zellen normalisiert auf die kotransfizierte Renillaluziferase. Die Säulen repräsentieren Mittelwerte +/- SEM; n=6; Wilcoxon signed-rank Test. *P<0.05.

In Abbildung 31 ist das Ergebnis des Luziferase Assay mit dem ffluziMOBP81A-Reporterkonstruktes dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass es in Abhängigkeit erhöhter Fyn-Aktivität zu einer erhöhten Translation des Firefly-Luziferase Reporters kommt, welcher unter der Kontrolle der A2RE-beinhaltenen 3'UTR von *Mobp81A* steht, was hier durch eine erhöhte relative Luziferase-Aktivität in FynWT transfizierten Oli-*neu* Zellen illustriert wurde. Um einen durch Fyn hervorgerufenen transkriptionellen Effekt ausschließen zu können, wurden die ffluzi*Mobp81A* Reporter mRNA Level mittels qPCR analysiert. Abbildung 32 zeigt deutlich, dass sich der Aktivitätszustand der Fyn-Kinase nicht auf die mRNA Menge des A2RE enthaltenen ffluzi*Mobp81A* Reporters auswirken.

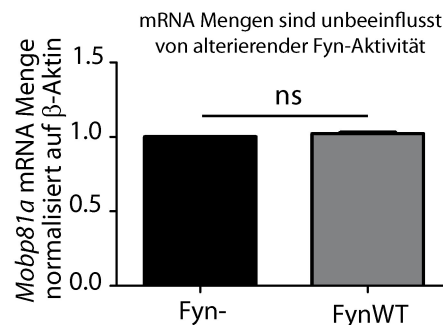


Abbildung 32: *Mobp81a* mRNA Menge in Abhängigkeit alterierender Fyn-Aktivitäten. Oli-*neu* Zellen wurden in einem parallelen Versuchsansatz mit Fyn- oder FynWT sowie dem entsprechenden ffluziMOBP81A-Reporterkonstrukt und einem Renilla-Luziferase-Konstrukt kotransfiziert und 48 Stunden später hinsichtlich der mRNA Menge analysiert. Das Balkendiagramm zeigt die relative mRNA Menge der A2RE-beinhaltenen *Mobp81a* Isoform in FynWT in Bezug auf Fyn- transfizierten Zellen normalisiert auf die kotransfizierte Renillaluziferase. Die Säulen repräsentieren Mittelwerte \pm SEM; n=6; Wilcoxon signed-rank Test. ns=nicht signifikant.

Der Fyn-Aktivitätszustand hatte zudem keinen Effekt auf die Translation des ffluziMOBP170 Reporterkonstruktes, welches kein A2RE in seiner 3'UTR besitzt. Dies wird in der nachfolgenden Abbildung 33 deutlich, da keine signifikant erhöhte relative Luziferase Aktivität in FynWT transfizierten Oli-*neu* Zellen im Vergleich zu Fyn- transfizierten Kontrollzellen zu erkennen ist.

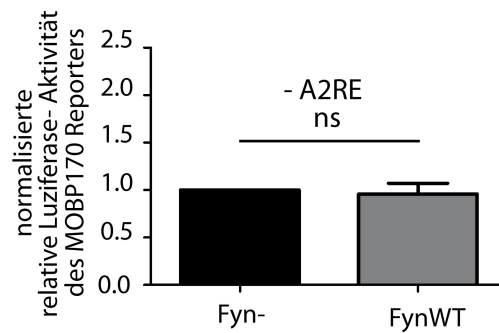


Abbildung 33: Normalisierte relative Luziferase-Aktivität des ffluziMOBP170-Reporterkonstruktes. Oli-*neu* Zellen wurden mit Fyn- oder FynWT sowie dem ffluziMOBP170- Reporterkonstrukt und einem Renilla-Luziferase-Konstrukt kotransfiziert und 48 Stunden später mittels DualGlo Luziferase Assay hinsichtlich der Translationsrate analysiert. Das Balkendiagramm zeigt die relative Luziferaseaktivität des ffluziMOBP170-Reporterkonstruktes ohne A2RE in der 3'UTR in FynWT in Bezug auf Fyn- transfizierten Zellen normalisiert auf die kotransfizierte Renillaluziferase. Die Säulen repräsentieren Mittelwerte +/- SEM; n=6; Wilcoxon signed-rank Test. ns=nicht signifikant.

Dieses Ergebnis lässt eine A2RE-abhängige translationelle Regulation von MOBP durch die Fyn-Kinase vermuten. Um diese Hypothese zu stützen, wurden Luziferase Assays unter denselben Bedingungen mit dem A2RE- enthaltenden ffluziMOBP99 Reporterkonstrukt und zusätzlich mit dem mutagenen ffluziMOBP99mut Reporterkonstruktes durchgeführt. In Letzterem wurde, wie in Abbildung 34A dargestellt, die Sequenz des A2RE mittels zielgerichteter Mutagenese (*site directed mutagenesis*) gegen eine gleichlange willkürliche Sequenz mit der Schnittstelle für das Restriktionsenzym SmaI ausgetauscht.

A

Mutation des A2RE in der MOBP 3'UTR

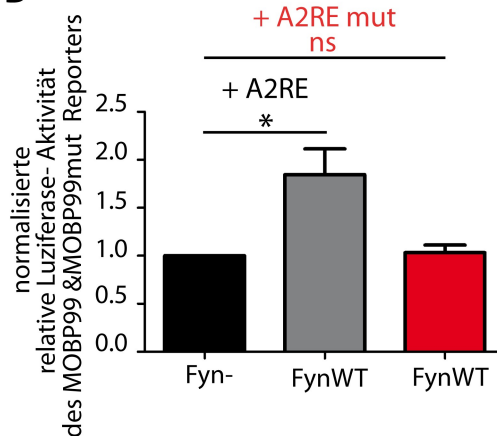
**B**

Abbildung 34: Normalisierte relative Luziferase-Aktivität des ffluziMOBP99- und ffluziMOBP99mut-Reporterkonstruktes. Oli-*neu* Zellen wurden mit Fyn- oder FynWT sowie dem ffluziMOBP99- oder ffluziMOBP99mut- Reporterkonstrukt und einem Renilla-Luziferase-Konstrukt kotransfiziert und 48 Stunden später mittels DualGlo Luziferase Assay hinsichtlich der Translationsrate analysiert. **A**, Sequenz des mittels zielgerichteter Mutagenese eingefügten mutierten A2RE des ffluziMOBP99mut-Reporterkonstruktes. **B**, Das Balkendiagramm zeigt die relative Luziferaseaktivität des A2RE- enthaltenden ffluziMOBP99-Reporterkonstruktes sowie des ffluziMOBP99mut- Reporterkonstruktes mit mutiertem A2RE in FynWT in Bezug auf Fyn- transfizierten Zellen normalisiert auf die kotransfizierte Renillaluziferase. Die Säulen repräsentieren Mittelwerte +/- SEM; n=6; Wilcoxon signed-rank Test. *P<0.05; ns=nicht signifikant.

Wie in den Graphen in Abbildung 34B gezeigt ist, führte eine erhöhte Fyn-Aktivität zur Steigerung der Translation des ffluziMOBP99 Reporterkonstruktes, welches ein intaktes A2RE in seiner 3'UTR trägt. Die Translation derselben *Mobp* Isoform, in welcher allerdings das A2RE mutiert vorliegt, wird nicht durch den Aktivitätszustand der Fyn- Kinase beeinflusst. Somit scheint sich die translationelle Aktivierung durch die aktivierte Fyn- Kinase spezifisch nur auf *Mobp* mRNAs, welche ein A2RE in ihrer 3'UTR aufweisen, auszuwirken.

Zusammenfassend zeigen die Experimente in primären Oligodendrozyten und des *in vitro* Assays in Oli-*neu* Zellen (siehe 4.1.2.2), dass die aktive Fyn-Kinase als Signalmolekül spezifisch die Translation von A2RE enthaltenden *Mobp* mRNAs induziert und somit die Proteinsynthese von MOBP71, 81A, 99 und 169 stimuliert.

4.2 Auswirkung alterierender MOBP Mengen auf die oligodendrogliale Morphologie

Obwohl MOBP in hohen Mengen in Oligodendrozyten exprimiert wird, verblieb seine Funktion auf zellulärer Ebene bisher unbekannt. Daher soll in den folgenden Abschnitten auf die Ergebnisse zur Auswirkung alterierender MOBP Proteinmengen auf die Morphologie primärer Oligodendrozyten eingegangen werden. Hierzu wurden experimentell die MOBP Proteinmengen reduziert oder erhöht, indem in primären Oligodendrozyten mittels siRNA-Behandlung ein *Knockdown* oder aber mittels AAV-Behandlung eine Überexpression vermittelt werden konnte.

4.2.1 Überprüfung des MOBP Knockdown

Um eine effiziente Reduktion der endogenen MOBP Menge in den bereits differenzierten primären Oligodendrozyten (5DIV) sicherzustellen, wurde eine siRNA erstellt, welche innerhalb der in allen Isoformen identisch vorliegenden 68N-terminalen Aminosäuren bindet (siehe Tabelle 11). Die Zellen wurden wie unter 3.8.2.1 beschrieben mit der siRNA inkubiert und nach 48 Stunden schließlich mittels Western Blot analysiert. In der nachfolgenden Abbildung 35 ist der Western Blot zur Überprüfung der siRNA Wirksamkeit dargestellt.

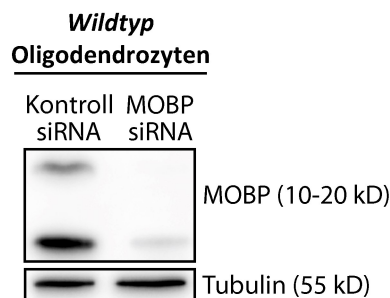


Abbildung 35: siRNA vermittelter MOBP Knockdown. Primäre *Wildtyp* Oligodendrozyten wurden zweimal mit MOBP siRNA oder Kontroll siRNA behandelt (DIV5+DIV6) und nach sieben Tagen *in vitro* mittels Western Blot analysiert. Repräsentativer Western Blot der Lysate aus Kontroll- oder MOBP siRNA behandelten Oligodendrozyten (7DIV). Tubulin diente hier als Ladekontrolle.

Man sieht deutlich, dass die MOBP Proteinmengen nach Behandlung mit der spezifisch gegen alle MOBP Isoformen gerichteten siRNA einen 98% Knockdown in den insgesamt sechs durchgeführten biologischen Replikaten im Vergleich zu den Kontroll-siRNA behandelten Zellen zeigt. Um sicher zu sein, dass die verwendete siRNA keine Apoptose in den behandelten primären Oligodendrozyten induziert, wurde zudem ein fluorimetrischer TUNEL Versuch, welcher auf der fluorimetrischen Markierung von DNA-Strangbrüchen

mittels Fluorescein beruht (siehe 3.8.2.1.1), durchgeführt. Diese somit markierten Stellen innerhalb der geschädigten DNA, sowie die Gesamtzellzahl wurden schließlich mit Hilfe eines Mikrotiterplatten- Lesers F200 (TECAN) detektiert und nachfolgend die Apoptoserate ermittelt.

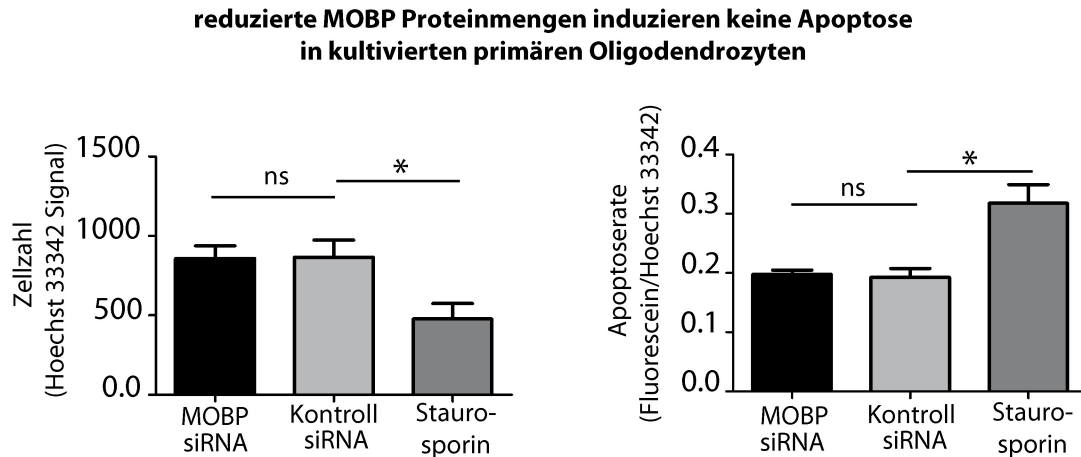


Abbildung 36: TUNEL Assay zur Überprüfung einer Apoptose-Induktion durch MOBP siRNA. Primäre *Wildtyp* Oligodendrozyten wurden zweimal mit MOBP siRNA oder Kontroll siRNA behandelt (DIV5+DIV6) und nach sieben Tagen *in vitro* mittels TUNEL assay auf eine mögliche apoptotische Wirkung der MOBP siRNA analysiert. Die relative Menge apoptotischer Zellen (TUNEL positiv) bezüglich der Gesamtzellzahl (Zellkernfärbung, Hoechst 33342 positiv) wurde in MOBP siRNA, Kontroll siRNA und Staurosporin (Positivkontrolle)- behandelten Zellen bestimmt. **A**, Das Balkendiagramm zeigt die Gesamtzellzahl anhand des Hoechst 33342 Signals in MOBP siRNA und Staurosporin behandelten Zellen im Vergleich zu den Kontroll siRNA behandelten Oligodendrozyten. **B**, Das Balkendiagramm zeigt die relative Apoptoserate als Fluorescein/Hoechst 33342 Werte in MOBPsiRNA und Staurosporin behandelten Zellen im Vergleich zu Kontroll siRNA behandelten Oligodendrozyten an. Die Säulen repräsentieren Mittelwerte +/- SEM; n=4; Unpaired Student's t-Test; *P<0.05.

Wie man deutlich in Abbildung 36 erkennen kann, liegen zwischen MOBP siRNA und Kontroll siRNA behandelten Zellen keine Unterschiede in der Zellzahl, sowie in der Apoptoserate vor. Um sicher zu sein, dass der durchgeführte TUNEL Versuch auch funktioniert hat, wurden in einem zusätzlichen Ansatz die Zellen mit Staurosporin als Positivkontrolle behandelt. Das aus dem Bakterium *Streptomyces staurosporeus* stammende Staurosporin inhibiert Proteinkinasen, indem es die ATP-Bindung an die entsprechende Kinase verhindert. In Abbildung 36 ist die Zellzahl nach Staurosporinbehandlung im Vergleich zu Kontroll siRNA behandelten Zellen signifikant reduziert und äquivalent dazu die Apoptoserate signifikant erhöht. Dies bedeutet, dass reduzierte MOBP Proteinmengen in kultivierten primären Oligodendrozyten keine Apoptose induzieren.

4.2.2 Überprüfung der MOBP Überexpression

In dem zweiten experimentellen Ansatz sollte MOBP vorzeitig im Laufe der Oligodendrozytendifferenzierung exprimiert werden. Um dies zu gewährleisten, wurden die kodierenden Bereiche der MOBP Isoformen MOBP81, MOBP169, MOBP170 in primäre Oligodendrozytenvorläuferzellen (2DIV) mittels Transduktion, basierend auf Nutzung Adeno-assoziiierter Viren (AAV), überexprimiert (siehe Tabelle 7; 3.8.3). Diese AAV Vektoren besitzen wie die zuvor in Abschnitt 4.1.2.2.1.3 beschriebenen Fyn-Viren einen verkürzten MBP-Promotor, um eine effiziente Expression spezifisch in Oligodendrozyten zu gewährleisten (Jonquieres et al., 2013). Nach 72 Stunden wurde die Überexpression der einzelnen MOBP Isoformen mittels Western Blot Analyse überprüft.

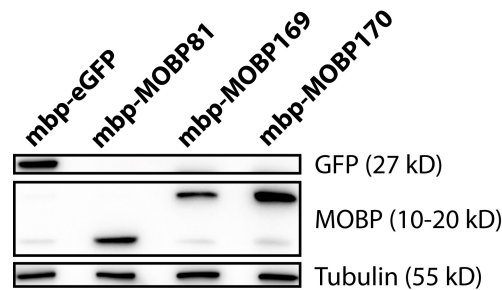


Abbildung 37: AAV- vermittelte Überexpression der MOBP81, 169 und 170 Isoformen in Oligodendrozyten. Primäre *Wildtyp* Oligodendrozytenvorläuferzellen (2DIV) wurden einmalig mit AAVs (2×10^9 virales Genom (vg)/ml Kulturmedium), welche die angegebenen MOBP Isoformen (mbp-MOBP81,169,170) oder eGFP (mbp-eGFP) exprimieren, behandelt und nach sieben Tagen *in vitro* mittels Western Blot analysiert. Repräsentativer Western Blot der Lysate aus eGFP, MOBP81, 169, 170 überexprimierenden Oligodendrozyten (7DIV) mit den angegebenen Antikörpern. Tubulin diente hier als Ladekontrolle.

Wie in Abbildung 37 deutlich zu erkennen ist, gelang es die einzelnen MOBP Isoformen mittels AAV-vermittelter Transduktion verfrüht überzuexprimieren. Der mbp-eGFP Virus diente hier als Transduktionskontrolle. Man kann ein deutliches eGFP-Signal auf Höhe der 27kD verzeichnen, was darauf schließen lässt, dass die durchgeführte Transduktion mit 2×10^9 Kopien/ml Kultivierungsmedium effizient funktioniert hat. Zudem kann auf Höhe der 10kD im eGFP, sowie in den MOBP Überexpressionsansätzen eine schwache Bande detektiert werden, welche auf den Beginn der endogenen Expression der kleinen MOBP Isoformen nach 5DIV schließen lässt. Die MOBP81-Überexpression, ebenfalls repräsentiert in der 10kD Bande, wird durch eine deutlich verstärkte Proteinbande verifiziert. Auf Höhe der 20kD ist zudem die noch nicht endogen eingesetzte Expression der Isoformen MOBP169 (mbp-MOBP169) und MOBP170 (mbp-MOBP170) durch eine starke Bandenintensität zu verzeichnen, was ebenfalls den Erfolg der Proteinüberexpression verdeutlicht.

4.2.2.1 Überprüfung der MOBP Überexpression in murinen kortikalen Hirnschnitten

Um die MOBP Funktion auf zellulärer Ebene zudem unter physiologischeren Bedingungen zu studieren, sollte MOBP vorzeitig im Laufe der Oligodendrozytendifferenzierung in einem *ex vivo* System wie den murinen kortikalen Hirnschnitten exprimiert werden. Hierzu musste zunächst das Expressionsmuster der Myelinproteine während der Oligodendrozytendifferenzierung in den murinen kortikalen Hirnschnitten analysiert werden. In der nachfolgenden Abbildung 38A wird deutlich, dass die Proteinsynthese der einzelnen Myelinproteine in den kortikalen Hirnschnitten, wie erwartet, vergleichbar mit dem Expressionsmuster in den primären Oligodendrozyten ist. MOBP (10kD) und MBP (14-21.5kD) sind erstmals nach 9DIV durch Banden geringer Intensität detektierbar, wobei CNP vorher exprimiert wird, was durch eine Bande nach 6DIV auf Höhe der 46kD verdeutlicht wird. MOBP wird hier nur durch eine Bande bei 10kD detektiert. Die geringer exprimierten Isoformen MOBP169/170 liegen vermutlich in zu geringer Menge in den hier erstellten Lysaten aus Oligodendrozyten und neuronalen Zellen vor, sodass sie nicht mittels Western Blot auf Höhe der 20kD detektiert werden konnten.

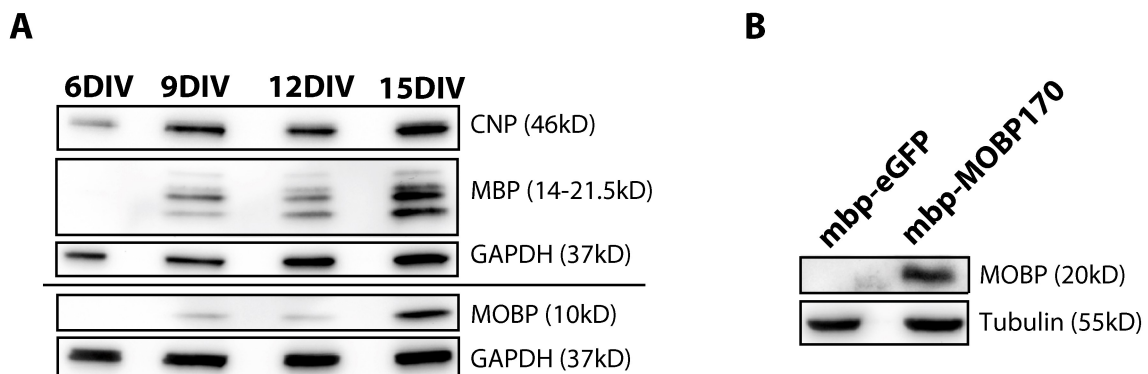


Abbildung 38: MOBP Protein Synthese und AAV- vermittelte Überexpression von MOBP170 in murinen kortikalen Hirnschnitten. **A**, Detektion von CNP, MBP und MOBP Proteinmengen in murinen kortikalen Hirnschnitten mittels Western Blot Analyse zu den angegebenen Zeitpunkten oligodendroglialer Differenzierung *ex vivo*. GAPDH Mengen dienen als Ladekontrolle; (DIV, days in vitro, Tage *in vitro*). **B**, Murine kortikale Hirnschnitte (1DIV) wurden einmalig mit AAVs (2×10^9 virales Genom (vg)/ml Kulturmedium), welche MOBP170 (mbp-MOBP170) oder eGFP (mbp-eGFP) exprimieren, behandelt und nach neun Tagen *in vitro* mittels Western Blot analysiert. Repräsentativer Western Blot der Lysate aus eGFP und MOBP170 überexprimierenden kortikalen Hirnschnitten (9DIV) mit den angegebenen Antikörpern. Tubulin diente hier als Ladekontrolle.

Nachfolgend sollte der kodierende Bereich von MOBP170 (mbp-MOBP170) und eGFP (mbp-eGFP) als Kontrolle in die kultivierten murinen kortikalen Hirnschnitte (1DIV) mittels Transduktion, basierend auf Nutzung Adeno-assoziierten Viren (AAV), überexprimiert werden (siehe Tabelle 7;3.8.3.2). Diese AAV Vektoren besitzen einen verkürzten MBP-Promotor, um

eine effiziente Expression spezifisch in Oligodendrozyten zu gewährleisten (Jonquieres et al., 2013). Nach 9DIV wurde die MOBP-Überexpression mittels Western Blot Analyse überprüft. In Abbildung 38B kann ein MOBP-Signal hoher Intensität auf Höhe der 20kD verzeichnet werden, was mit einem Ausbleiben an endogener MOBP Expression, verdeutlicht durch die Kontrolltransduktion, einhergeht. Die vorzeitige MOBP Expression im Laufe der Oligodendrozytendifferenzierung in dem hier gewählten *ex vivo* System konnte mit 2×10^9 Kopien/ml Kultivierungsmedium effizient durchgeführt werden. Eine weitere Analyse bezüglich der MOBP Überexpression in murinen kortikalen Hirnschnitten war im Rahmen der Doktorarbeit leider nicht mehr möglich.

4.2.3 Differenzierungseffekt von MOBP auf oligodendrogliale Zellen

Nachdem mittels Western Blot Analyse der Erfolg des MOBP *Knockdown* beziehungsweise der MOBP Überexpression bestätigt wurde, konnten nun die resultierenden Effekte auf morphologischer Ebene detaillierter betrachtet werden.

4.2.3.1 Alterierende MOBP Mengen beeinflussen die Zelloberfläche primärer *wildtyp* Oligodendrozyten

Mit Hilfe des „Fijisurf“ Makros für ImageJ (siehe 3.9.6.3) konnte zunächst die Zelloberfläche [Pixel²] in primären Oligodendrozyten in Abhängigkeit der endogen vorliegenden MOBP Proteinmenge evaluiert werden.

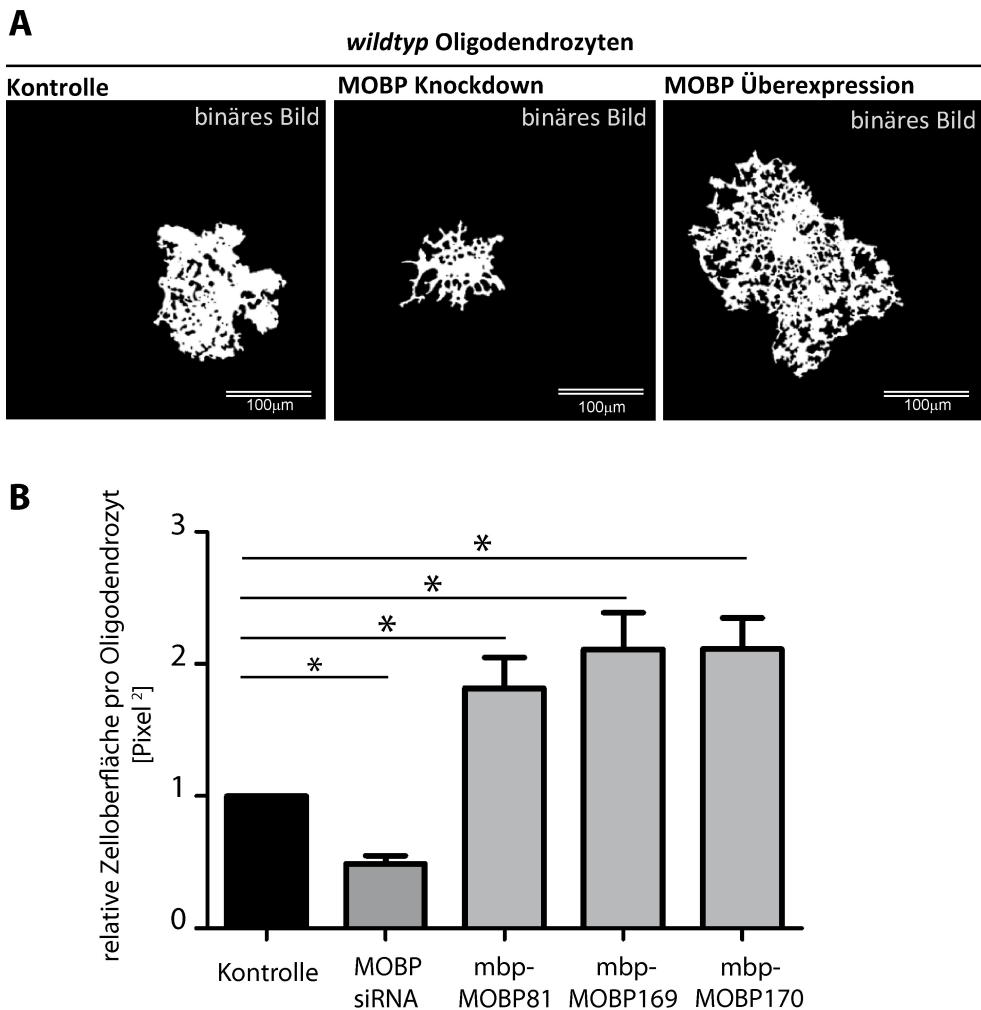


Abbildung 39: MOBP beeinflusst die Zelloberfläche primärer Oligodendrozyten. MOBP Mengen wurden in primären *Wildtyp* Oligodendrozyten mit Hilfe von siRNA-vermittelterm Knockdown reduziert oder mit Hilfe von AAV-vermittelter Überexpression erhöht. Die Zelloberfläche [Pixel²] wurde mit dem „Fijisurf“ Makro für ImageJ ermittelt. **A**, Repräsentative binäre Bilder der Zelloberfläche eines Kontroll, eines MOBP siRNA transfizierten und eines MOBP170-AAV transduzierten Oligodendrozyten. Der Größenmaßstab beträgt 100µm. **B**, Relative Zelloberfläche in MOBP-defizienten beziehungsweise MOBP-überexprimierenden Zellen im Vergleich zur Kontrollkondition (Kontrolle= Kontroll siRNA/mbp-eGFP). Die Säulen repräsentieren Mittelwerte +/- SEM; n=6; Wilcoxon signed-rank Test; *P<0.05.

In Abbildung 39A sind die binären Bilder der analysierten Oligodendrozyten nach siRNA Behandlung oder Überexpression dargestellt. Kontrolle bezeichnet hier eine repräsentative Zelle, welche mit Kontroll siRNA oder mit mbp-eGFP behandelt wurde. Bereits anhand der binären Bilder kann man deutliche Unterschiede hinsichtlich der Zelloberfläche in Abhängigkeit alterierender MOBP Proteinmengen erkennen. Eine Behandlung primärer Oligodendrozyten mit MOBP siRNA resultiert in einer kleineren Zelloberfläche, wohingegen AAV-basierende MOBP Überexpression eine deutliche Vergrößerung der Zelloberfläche hervorruft. Unter Zuhilfenahme statistischer Tests konnte diese Beobachtung des Weiteren untermauert werden, was in den Graphen von Abbildung 39B deutlich wird. Die Reduktion

um 98% der endogenen MOBP Proteinlevel in primären Oligodendrozyten resultiert in einer signifikanten Verkleinerung der ausgebildeten Zelloberfläche, wohingegen die Erhöhung endogener MOBP Proteinlevel einen gegenteiligen Effekt, nämlich eine signifikante zweifache Vergrößerung der Zelloberfläche induziert.

Mit der hier durchgeführten Analyse der Zelloberfläche in Abhängigkeit endogener MOBP Proteinmengen konnte gezeigt werden, dass MOBP einen positiven Effekt auf die ausgebildete Oberfläche oligodendroglialer Zellen ausübt.

4.2.3.2 Erhöhte MOBP Mengen resultieren in der gesteigerten Formierung Myelin-ähnlicher Membranen und in einer gesteigerten Fortsatzverzweigung in Oligodendrozyten

Um den Effekt auf die ausgebildete oligodendrogliale Oberfläche aufgrund experimentell verursachter alterierender MOBP Proteinmengen in den kultivierten primären Oligodendrozyten etwas genauer zu betrachten, wurden die zuvor hinsichtlich ihrer Zelloberfläche analysierten Zellen nun mit Hilfe des trainable weka segmentation Plugins für ImageJ detaillierter untersucht (siehe 3.9.6.3). Die Zellen wurden zunächst in drei Hauptbestandteile segmentiert- Zellkörper, Fortsätze und Myelin-ähnliche Membranen. Dies ist in den klassifizierten binären Bildern der Abbildung 40A durch unterschiedliche Grautöne visualisiert.

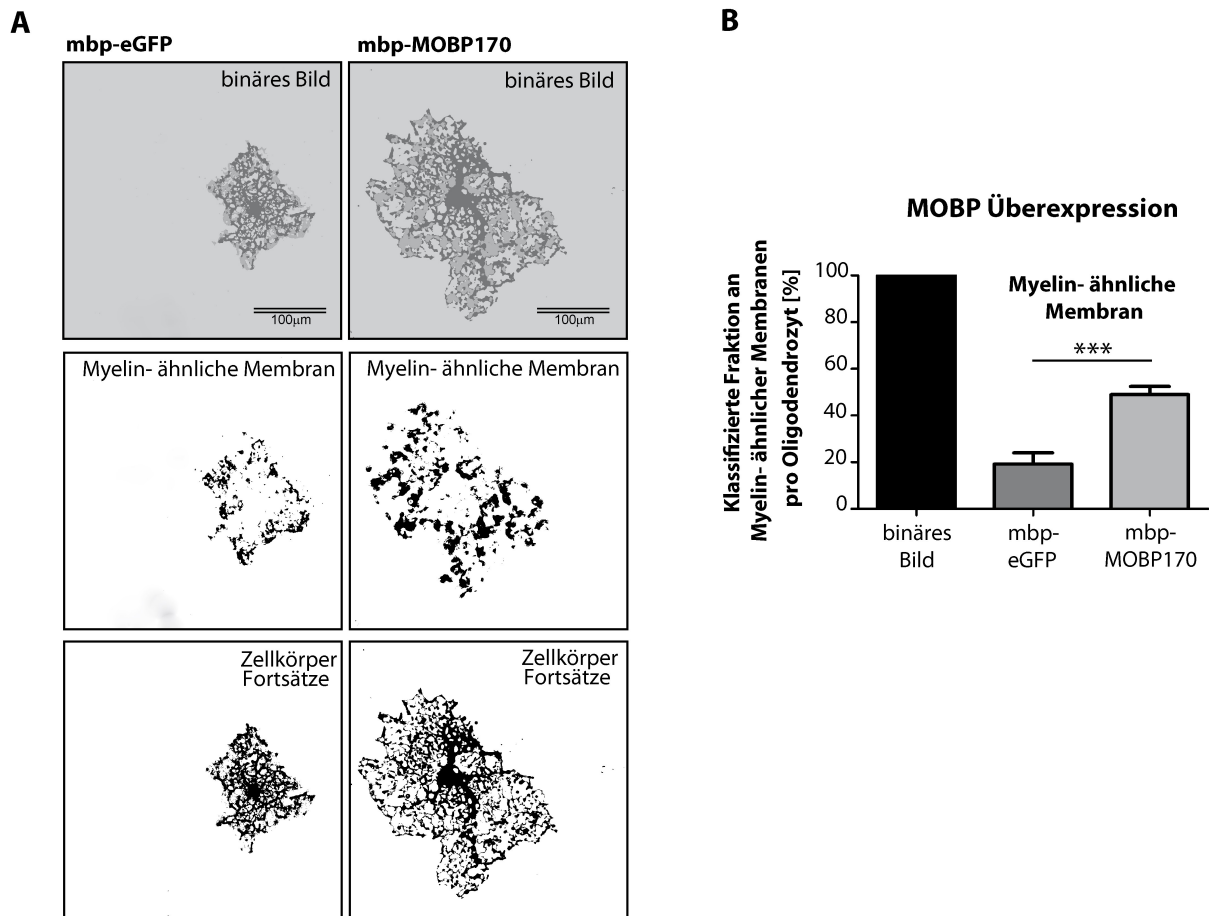


Abbildung 40: MOBP Überexpressions- vermittelte Erhöhung der Myelin-ähnlichen Membranfraktion primärer Oligodendrozyten. Die Klassifizierung der Myelin-ähnlichen Membranfraktion pro Zelloberfläche der zuvor analysierten Oligodendrozyten (siehe Abbildung 39) erfolgte mit Hilfe des trainable weka segmentation V2.2.1 Plugin für ImageJ. **A**, In Myelin-ähnliche Membranen, Zellkörper und Fortsätze klassifizierte binäre Bilder der MOBP- überexprimierenden oder eGFP Kontroll- Zellen. Der Größenmaßstab beträgt 100µm. **B**, Das Balkendiagramm zeigt den prozentualen Anteil ausgebildeter Myelin-ähnlicher Membranen in Abhängigkeit der MOBP Mengen. Die Säulen repräsentieren Mittelwerte +/- SEM; n=6; Unpaired Student's t-Test; ***P<0.001.

Nachdem die Klassifizierung mit Hilfe des ImageJ Plugin durchgeführt wurde, konnten prozentuale Anteile der einzelnen Fraktionen ermittelt werden. Im Fall der in Abbildung 40 dargestellten Überexpression von MOBP170 war ein signifikanter Anstieg an gebildeten Myelin-ähnlichen Membranen im Vergleich zu Kontroll (mbp-eGFP) transduzierten Zellen zu erkennen, was auf einen erhöhten Differenzierungsgrad der primären Oligodendrozyten schließen lässt. Im Gegensatz dazu zeigten die mit MOBP siRNA behandelten Zellen eine signifikante Reduktion an gebildeten Myelin-ähnlichen Membranen im Vergleich zur Kontroll Transfektion (Kontroll siRNA), was in der nachfolgenden Abbildung 41A anhand der klassifizierten binären Bilder und in Abbildung 41B anhand des statistisch erstellten Säulendiagramms verdeutlicht wird.

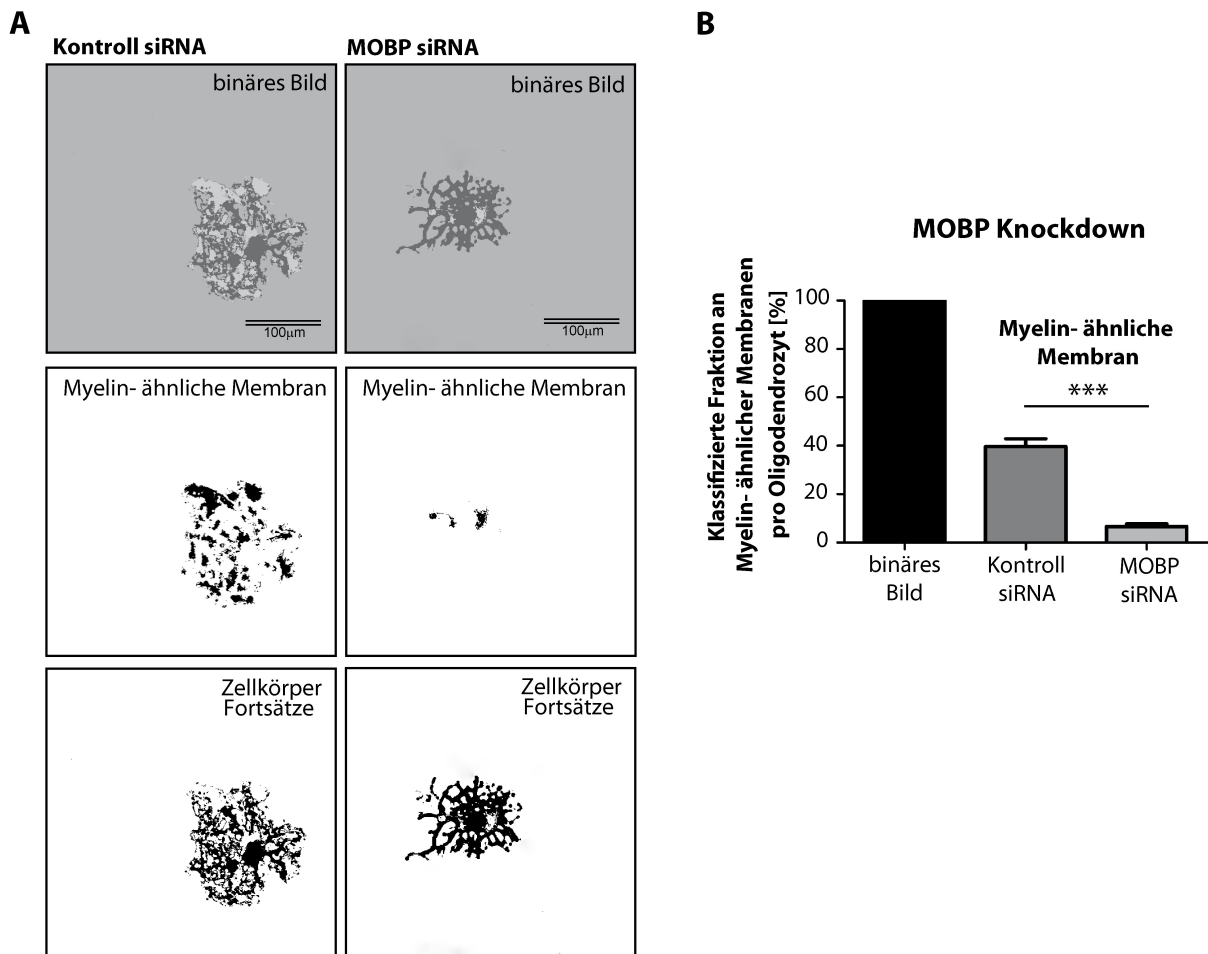


Abbildung 41: siRNA- vermittelter MOBP Knockdown resultiert in einer verringerten Ausbildung Myelin-ähnliche Membranen in primären Oligodendrozyten. Die Klassifizierung der Myelin-ähnlichen Membranfraktion pro Zelloberfläche der zuvor analysierten Oligodendrozyten (siehe Abbildung 39) erfolgte mit Hilfe des trainable weka segmentation V2.2.1 Plugin für ImageJ. **A**, In Myelin-ähnliche Membranen, Zellkörper und Fortsätze klassifizierte binäre Bilder der mit MOBP siRNA oder Kontroll siRNA behandelten Zellen. Der Größenmaßstab beträgt 100µm. **B**, Das Balkendiagramm zeigt den prozentualen Anteil ausgebildeter Myelin-ähnlicher Membranen in Abhängigkeit der MOBP Mengen. Die Säulen repräsentieren Mittelwerte +/- SEM; n=6; Unpaired Student's t-Test; ***P<0.001.

Die Tatsache, dass die hier verwendeten Kontrollzellen, zum einen die eGFP transduzierten und zum anderen die Kontroll siRNA transfizierten Oligodendrozyten, einen Unterschied in der gebildeten Zellfläche und in der Formierung Myelin-ähnlicher Membranen (siehe Abbildung 40, Abbildung 41) aufweisen, liegt daran, dass die analysierten Zeitpunkte variieren. In der MOBP Überexpressionsstudie sollte eine frühzeitige starke Expression an endogenem MOBP gewährleistet werden, weshalb die Zellen schon an 5DIV analysiert wurden, wohingegen in der MOBP Knockdown Studie ausdifferenzierte Oligodendrozyten mit nachträglich reduzierten endogenen MOBP Proteinmengen an 7DIV untersucht wurden. Anhand der beiden Säulendiagramme in Abbildung 40B und Abbildung 41B ist zu erkennen,

dass der Anteil an Myelin-ähnlichen Membranen durch MOBP Überexpression schon nach 5DIV den in 7DIV kultivierten Kontrollzellen übersteigt.

Um den durch Manipulation der endogen vorliegenden MOBP Proteinmenge erzielten Effekt auf den Differenzierungsstatus der primären Oligodendrozyten noch weiter zu charakterisieren, wurden neben dem prozentualen Anteil der Myelin-ähnlichen Membranfraktion im Folgenden auch der Verzweigungsstatus der primären Zellen ermittelt. Hierzu wurde der Verzweigungsgrad der Oligodendrozyten mit Hilfe des Sholl Plugins für ImageJ (siehe 3.9.6.3) analysiert.

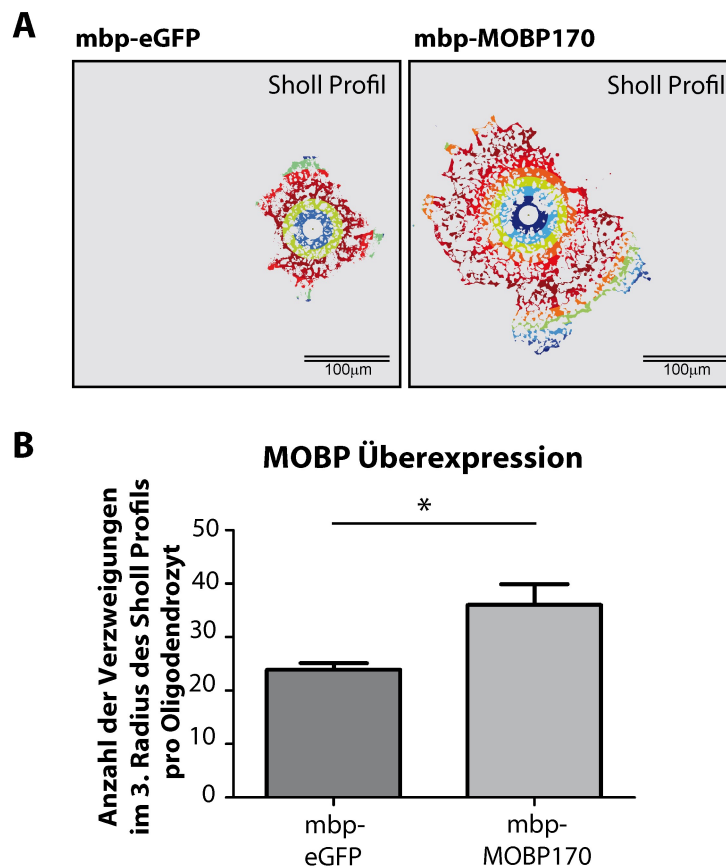


Abbildung 42: MOBP Überexpressions- vermittelte Erhöhung der Fortsatzverzweigung primärer Oligodendrozyten. Um das Ausmaß der Fortsatzverzweigung pro Zelloberfläche der zuvor analysierten Oligodendrozyten (siehe Abbildung 39) in Abhängigkeit alterierender MOBP Mengen zu bestimmen kam das Sholl Plugin für ImageJ zum Einsatz. **A**, Sholl Profil der MOBP- überexprimierenden oder eGFP Kontroll- Zellen. Der Größenmaßstab beträgt 100µm. **B**, Das Balkendiagramm zeigt die Anzahl an Verzweigungen innerhalb des dritten Radius pro Oligodendrozyt. Die Säulen repräsentieren Mittelwerte +/- SEM; n=6; Unpaired Student's t-Test; *P<0.05.

In Abbildung 42A und Abbildung 43A ist das Sholl Profil eines exemplarisch ausgewählten Oligodendrozyten nach MOBP Überexpression und Kontroll eGFP Transduktion oder nach MOBP Knockdown und Kontroll siRNA Transfektion dargestellt. Es werden Radien in einer

Größenordnung von $10\mu\text{m}$ um die Zelle angeordnet, wobei die Anzahl an Radian schließlich Auskunft über den Zelldurchmesser liefert. Es ist bereits deutlich zu erkennen, dass die Anzahl der Radian nach Erhöhung endogener MOBP Proteinmengen gesteigert ist im Vergleich zu den Kontroll-Zellen, was das Ergebnis der vergrößerten Zellfläche nach MOBP Überexpression aus Abschnitt 4.2.3.1 nun auch mit dieser analytischen Methode untermauert. Des Weiteren liefert die Sholl Analyse Auskunft darüber, wie viele Verzweigungen die Fortsätze in den jeweiligen Radian ausbilden. Da die mit MOBP siRNA behandelten Zellen (siehe Abbildung 43) im Durchschnitt nur 5 Radian d.h. einen Durchmesser von $50\mu\text{m}$ besitzen, wurden im Folgenden die Verzweigungen innerhalb des in allen analysierten Zellen ausgebildeten Radius 3 ausgewertet. In Abbildung 42B ist deutlich zu sehen, dass MOBP Überexpression zu einer signifikant erhöhten Komplexität der formierten Ausläufer führt, wohingegen MOBP siRNA Behandlung primärer Oligodendrozyten nicht nur in einem verkleinerten Durchmesser der Zelle, sondern auch in einer signifikant geringeren Verzweigung der ausgebildeten Ausläufer resultiert (siehe Abbildung 43B).

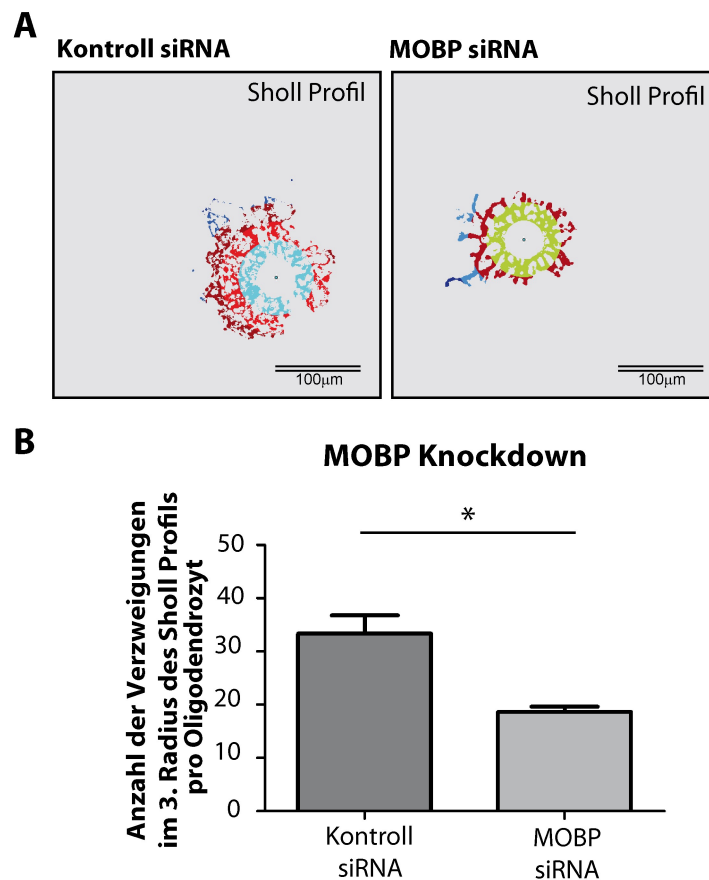


Abbildung 43: siRNA-vermittelter MOBP Knockdown resultiert in einer verringerten Fortsatzverzweigung primärer Oligodendrozyten. Um das Ausmaß der Fortsatzverzweigung pro Zelloberfläche der zuvor analysierten Oligodendrozyten (siehe Abbildung 39) in Abhängigkeit alterierender MOBP Mengen zu bestimmen kam das Sholl Plugin für ImageJ zum Einsatz. **A**, Sholl Profil der mit MOBPsiRNA oder Kontroll siRNA behandelten Zellen. Der Größenmaßstab beträgt 100µm. **B**, Das Balkendiagramm zeigt die Anzahl an Verzweigungen innerhalb des dritten Radius pro Oligodendrozyt. Die Säulen repräsentieren Mittelwerte +/- SEM; n=6; Unpaired Student's t-Test; *P<0.05.

Abschließend bleibt zu sagen, dass die endogen vorliegende Menge an MOBP Einfluss auf den Differenzierungsgrad der *in vitro* differenzierten Oligodendrozyten ausübt, was durch eine signifikant erhöhte Komplexität des Fortsatz-Netzwerkes sowie durch eine signifikant gesteigerte Ausbildung Myelin-ähnlicher Membranen in Antwort auf eine Erhöhung endogener MOBP Proteinmengen gezeigt werden konnte.

4.2.3.3 Erhöhte MOBP Proteinmengen induzieren eine Differenzierung in der oligodendroglialen Zelllinie Oli-*neu*

Um die Effekte von MOBP auf die oligodendrogliale Morphologie noch weiter zu charakterisieren, wurde im nächsten Schritt MOBP in Oli-*neu* Zellen überexprimiert. Oli-*neu* Zellen weisen eine weniger komplexe Morphologie hinsichtlich der Anzahl, der Länge und

der Verzweigung ausgebildeter Fortsätze auf und wurden zudem bereits erfolgreich in der Analyse morphologischer Veränderungen eingesetzt (Biname et al., 2013; Gonsior et al., 2014). Die Zellen wurden wie unter 3.8.1 beschrieben mit eGFP als Kontrolle oder mit den MOBP Expressionsvektoren, welche die kodierenden Bereiche der MOBP 71, 169, 170 Isoform inklusive eines Myc-Tags exprimieren (siehe 3.6.2.1.2), transfiziert und zwei Tage später fixiert (siehe 3.9.6.1). Die Zellen wurden mit NG2, einem Marker oligodendroglialer Vorläuferzellen, visualisiert und die MOBP Überexpression konnte durch Nutzung des Myc-Antikörpers detektiert werden. Myc-positive, MOBP-transfizierte Zellen wurden schließlich hinsichtlich dreier Aspekte, Fortsatzlänge, Fortsatzbreite und Anzahl der ausgebildeten Fortsätze, im Vergleich zu eGFP positiven Kontrollzellen analysiert. Die Bestimmung der Fortsatzlänge und Fortsatzbreite des jeweils längsten und breitesten Fortsatzes pro Zelle erfolgte unter Nutzung des Fiji "freehand line tool" (siehe 3.9.6.3).

In Abbildung 44A ist eine repräsentative Myc-positive MOBP-transfizierte *Oli-neu* Zelle zu sehen, welche signifikant längere Zellfortsätze im Vergleich zu den eGFP positiven Kontrollzellen ausbildet. Die MOBP-transfizierten *Oli-neu* Zellen, welche unter normalen Bedingungen eine bipolare Morphologie aufweisen, waren zudem von einer signifikant verzweigteren Morphologie geprägt (siehe Abbildung 44B), was deutlich anhand der exemplarisch dargestellten Myc-positiven Zelle in Abbildung 44B zu erkennen ist.

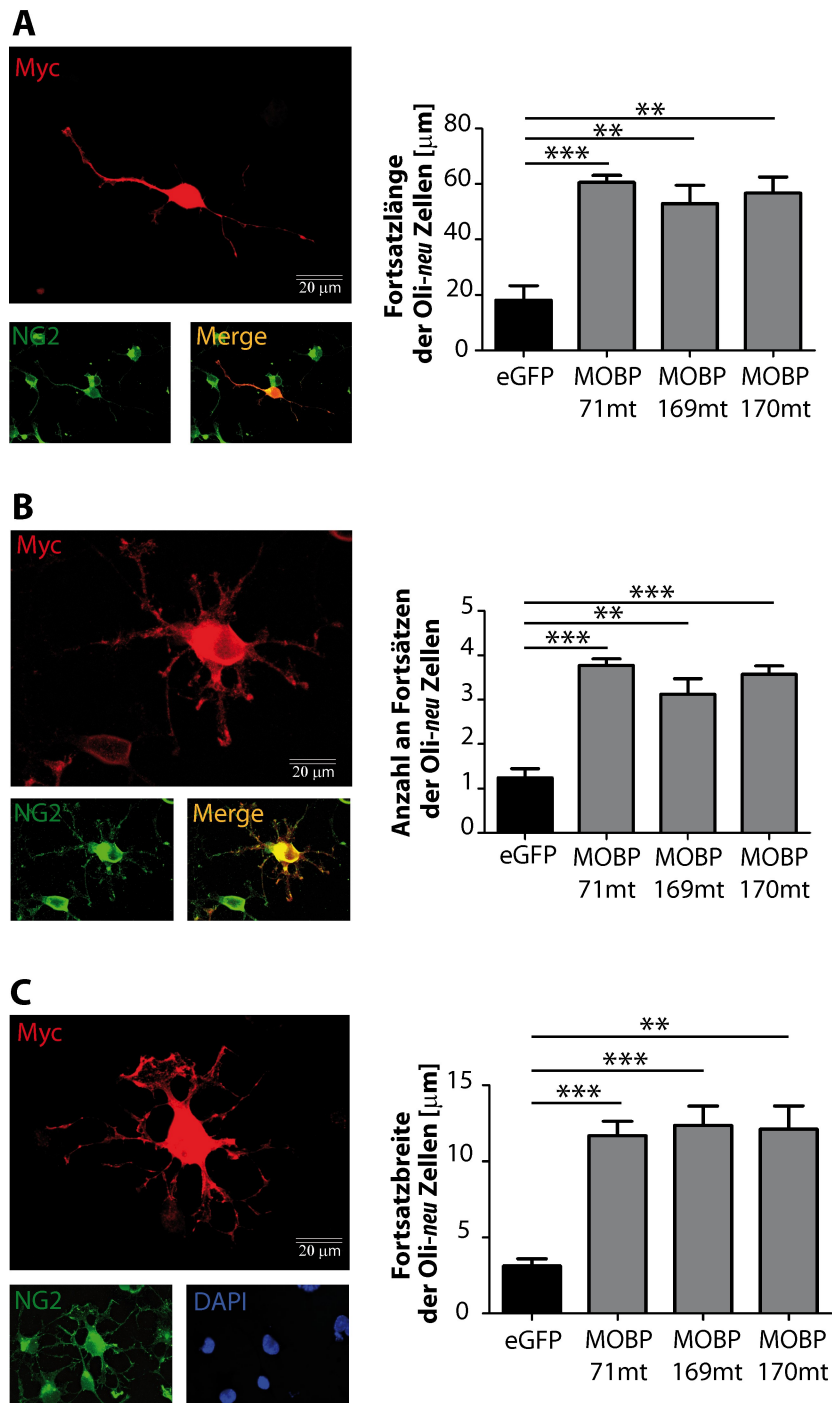


Abbildung 44: MOBP Überexpression stimuliert die morphologische Differenzierung in Oli-*neu* Zellen. Oli-*neu* Zellen wurden mit den MOBP Expressionvektoren mit Myc-Tag (MOBP71mt, 169mt, 170mt) oder eGFP als Kontrolle transfiziert und 48 Stunden später fixiert und mittels Immunzytochemie analysiert. Myc-positive MOBP-transfizierte Zellen wurden mittels Fiji Software hinsichtlich dreier morphologischer Aspekte, Fortsatzlänge (**A**), Anzahl der Fortsätze (**B**) und Fortsatzbreite (**C**) analysiert. **A-C** Der Größenmaßstab beträgt 20 μm ; Die Säulen repräsentieren Mittelwerte \pm SEM; n=4; Unpaired Student's t-Test; **P<0.01, ***P<0.001.

Die MOBP Überexpression stimuliert zudem die Ausbildung signifikant breiterer Ausläufer (siehe Abbildung 44C), welche flächige Strukturen ausbilden, die an Myelin-ähnliche

Membranen erinnern. Dies ist in Abbildung 44C anhand der repräsentativen Myc-positiven MOBP-transfizierten Zelle visualisiert.

Daraus lässt sich ableiten, dass eine Überexpression von MOBP in der Vorläuferzelllinie *Oli-neu* drei wichtige Marker morphologischer Differenzierung stimuliert, Fortsatzlänge, -Breite und -Anzahl.

4.2.4 Der Differenzierungseffekt von MOBP wird nicht durch eine Interaktion der beiden basischen Myelinproteine vermittelt

Es wurde suggeriert, dass die MBP Polymerisation sich auf die oligodendrogliale Membranausbildung auswirkt (Aggarwal et al., 2013). Da MOBP und MBP gleiche biophysikalische Eigenschaften aufweisen, wären sie in der Lage Polymere durch heterophile Interaktionen auszubilden. Daher sollte im Folgenden untersucht werden, ob die zuvor beschriebenen Beobachtungen hinsichtlich der morphologischen Veränderungen in Abhängigkeit alterierender MOBP Mengen auch in Abwesenheit von MBP eintreten. Hierzu wurden primäre Oligodendrozyten aus der *shiverer* (*Mbp^{shi}*) Maus (Readhead and Hood, 1990) extrahiert (siehe 3.7.2) und mittels desselben experimentellen Ansatzes hinsichtlich ihres MOBP Gehaltes manipuliert (siehe 3.8.2, 3.8.2.1 3.8.3, 3.8.3.1).

In der natürlich vorkommenden Maus-Mutante *shiverer* ist ein Großteil des MBP Gens deletiert und daher kann kein funktionelles MBP gebildet werden (siehe 2.2.3.1), was auch in den Expressionsuntersuchungen der hier verwendeten Tiere gezeigt werden konnte. Nach Extraktion des Gesamtgehirns aus *wildtyp* und *shiverer* Mäusen (P18/P19) und nachfolgender Expressionsanalyse der beiden basischen Myelinproteine auf RNA- und Proteinebene, konnte verifiziert werden, dass weder die *Mbp* mRNA noch das MBP Protein in *shiverer* (*Mbp^{shi}*) Mäusen exprimiert werden (siehe Abbildung 45A+B).

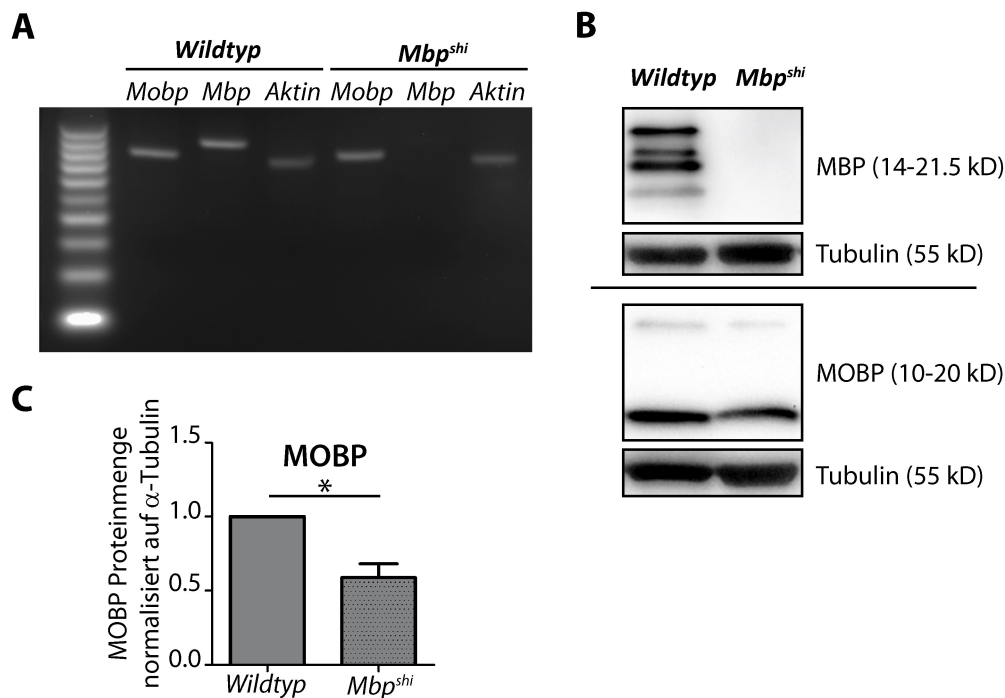


Abbildung 45: *Mobp* mRNA und MOBP Proteinmengen im Gesamthirn aus *wildtyp*- und *shiverer* Mäusen. **A**, Qualitative Analyse der *Mobp*, *Mbp* und β -Aktin mRNA in Gesamthirnllysaten aus *wildtyp* und *Mbp^{shi}* Mäusen (P18/P19). **B**, Detektion der MBP, MOBP und α -Tubulin Proteinmengen in Gesamthirnllysaten aus *wildtyp* und *Mbp^{shi}* Mäusen (P18/P19). **C**, Densitometrische Analyse der normalisierten MOBP/ α -Tubulin Mengen in *Mbp^{shi}* Mäusen im Vergleich zu *wildtyp* Mäusen. Die Säulen repräsentieren Mittelwerte \pm SEM; n=6; Wilcoxon signed-rank Test; *P<0.05.

Interessanterweise zeigen die *shiverer* Mäuse im Vergleich zu den *wildtyp* Mäusen auch eine 37%ige Reduktion in der exprimierten MOBP Proteinmenge im Gesamthirn, was deutlich an dem exemplarischen Western Blot in Abbildung 45B und der aus sechs biologischen Replikaten erstellten Statistik in Abbildung 45C zu erkennen ist. Es wurde vermutet, dass eine abnormal ausgebildete MDL der *shiverer* Mäuse die Einlagerung von MOBP in das Myelin gefährden könnte, was schließlich in herunterregulierten MOBP Proteinmengen in MBP- defizientem Myelin der homozygoten *shiverer* Maus resultieren würde (Montague et al., 1999).

Um eine effiziente Reduktion der endogenen MOBP Proteinmenge in den bereits differenzierten primären *shiverer* Oligodendrozyten (5DIV) sicherzustellen, wurden die Zellen wie unter 3.8.2.1 und 4.2.1 beschrieben mit siRNA gegen alle MOBP Isoformen transfiziert und nach 48 Stunden mittels Western Blot analysiert. In einem zweiten experimentellen Ansatz sollte MOBP vorzeitig im Laufe der Oligodendrozytendifferenzierung exprimiert werden. Um dies zu gewährleisten, wurde der kodierende Bereich der MOBP Isoform MOBP169 in die primären *shiverer* Oligodendrozytenvorläuferzellen (2DIV) mittels

Transduktion, basierend auf Nutzung Adeno-assoziiierter Viren (AAV), überexprimiert (siehe Tabelle 7; 3.8.3; 4.2.2) und nach 72 Stunden analysiert. In der nachfolgenden Abbildung 46A+B sind die Western Blots zur Überprüfung der MOBP siRNA Wirksamkeit und der MOBP169 Überexpression im Vergleich zu den Kontrollbedingungen (Kontroll siRNA/ mbp-eGFP) dargestellt.

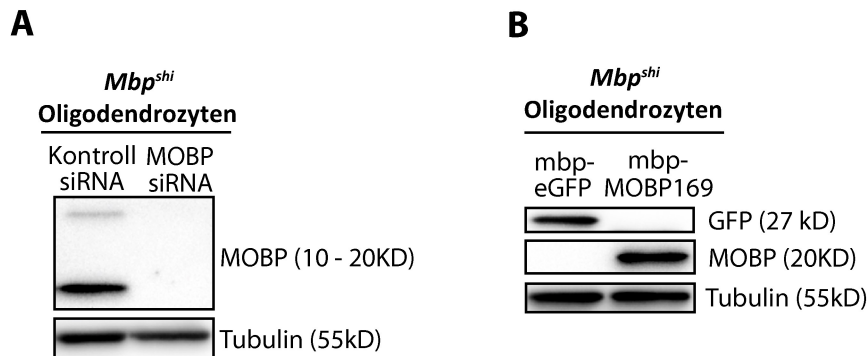


Abbildung 46: siRNA-vermittelter MOBP Knockdown und AAV-vermittelte Überexpression von MOBP169 in *Mbp^{shi}* Oligodendrozyten. Primäre *shiverer* Oligodendrozyten wurden zweimal mit MOBP siRNA oder Kontroll siRNA transfiziert (5DIV+6DIV) oder einmalig an DIV2 mit AAVs (2×10^9 virales Genom (vg)/ml Kulturmedium), welche die angegebene MOBP Isoform (mbp-MOBP169) oder eGFP (mbp-eGFP) exprimieren, transduziert und nach sieben Tagen *in vitro* mittels Western Blot analysiert. **A**, Repräsentativer Western Blot der Lysate aus Kontroll- oder MOBP siRNA behandelten Oligodendrozyten (7DIV). **B**, Repräsentativer Western Blot der Lysate aus eGFP oder MOBP169 überexprimierenden Oligodendrozyten (7DIV) mit den angegebenen Antikörpern. **A-B**, Tubulin diente hier als Ladekontrolle.

Man sieht deutlich, dass die MOBP Mengen nach Behandlung mit der spezifisch gegen alle MOBP Isoformen gerichteten siRNA einen nahezu 100%igen Knockdown im Vergleich zu den Kontroll-siRNA behandelten Zellen zeigt (siehe Abbildung 46A). Wie in Abbildung 46B deutlich zu erkennen ist, gelang es MOBP169 mittels AAV-vermittelter Transduktion (mbp-MOBP169) zu überexprimieren, was durch ein starkes Signal auf Höhe von 20kD zu erkennen ist. Der mbp-eGFP Virus diente hier als Transduktionskontrolle. Man kann ein deutliches eGFP-Signal auf Höhe der 27kD verzeichnen, was darauf schließen lässt, dass die durchgeführte Transduktion mit 2×10^9 Kopien/ml Kultivierungsmedium effizient funktioniert hat.

Nachdem der siRNA vermittelte Knockdown sowie die AAV-vermittelte Überexpression von MOBP in den *shiverer* Oligodendrozyten erfolgreich mittels Western Blot nachgewiesen werden konnte, erfolgte nun die Bestimmung deren Zelloberfläche [Pixel²] in Abhängigkeit der endogen vorliegenden MOBP Proteinmengen mit Hilfe des „Fijisurf“ Makros für ImageJ (siehe 3.9.6.3). Nach 5DIV beziehungsweise 7DIV wurden die MOBP überexprimierenden beziehungsweise MOBP Knockdown Zellen mittels Immunzytochemie identifiziert und die

CNP+/MBP- Zelloberfläche pro *Mbp^{shi}* Zelle quantifiziert. In der nachfolgenden Abbildung 47 sind die binären Bilder der analysierten *shiverer* Oligodendrozyten nach siRNA Behandlung oder Überexpression dargestellt. Kontrolle bezeichnet hier eine repräsentative Zelle, welche mit Kontroll siRNA behandelt wurde, was genau wie die Kontroll Transduktion mit eGFP keinerlei Auswirkung auf die Morphologie der Zelle haben sollte.

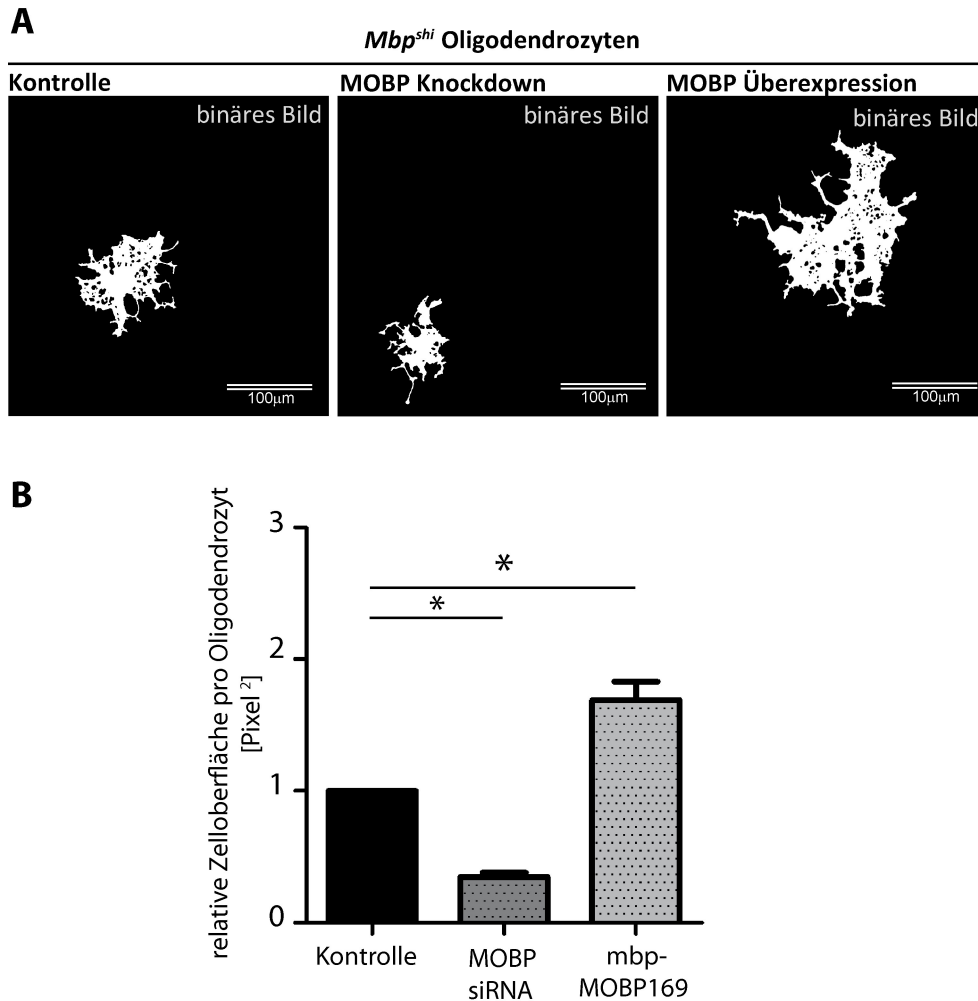


Abbildung 47: MOBP beeinflusst die Zelloberfläche primärer Oligodendrozyten in einer MBP-unabhängigen Weise. MOBP Mengen wurden in primären *shiverer* Oligodendrozyten (*Mbp^{shi}*) mit Hilfe von siRNA-vermitteltem Knockdown reduziert oder mit Hilfe von AAV-vermittelter Überexpression erhöht. Die Zelloberfläche [Pixel²] wurde mit dem „Fijisurf“ Makro für ImageJ ermittelt. **A**, Repräsentative binäre Bilder der Zelloberfläche eines Kontroll, eines MOBP siRNA transfizierten und eines MOBP169-AAV transduzierten *Mbp^{shi}* Oligodendrozyten. Der Größenmaßstab beträgt 100µm. **B**, Relative Zelloberfläche in MOBP-defizienten beziehungsweise MOBP-überexprimierenden Zellen im Vergleich zur Kontrollkondition (Kontrolle= Kontroll siRNA/mbp-eGFP). Die Säulen repräsentieren Mittelwerte +/- SEM; n=6; Wilcoxon signed-rank Test; *P<0.05.

Im Vergleich zu *wiltp* Oligodendrozyten weisen *shiverer* Oligodendrozyten eine andersartige Morphologie auf, was sich in einer abnormalen Ausbildung der Zellfortsätze in Abbildung 47A widerspiegelt. Es ist bekannt, dass *shiverer* Oligodendrozyten vergrößerte Zellkörper,

abnormale Zellfortsätze und so gut wie keine Myelin-ähnlichen Membranen *in vitro* ausbilden (Dyer et al., 1995). Anhand der binären Bilder kann man deutliche Unterschiede hinsichtlich der *shiverer* Zelloberfläche in Abhängigkeit alterierender endogener MOBP Proteinmengen erkennen (siehe Abbildung 47A). Eine Behandlung primärer Oligodendrozyten mit MOBP siRNA resultiert in einer kleineren Zelloberfläche, wohingegen AAV-basierende MOBP Überexpression eine deutliche Vergrößerung der Zelloberfläche hervorruft. Mittels statistischer Auswertung der sechs biologischen Replikate konnte diese Beobachtung mit einer Signifikanz untermauert werden (siehe Abbildung 47B).

Es konnte somit gezeigt werden, dass unbehandelte Kontroll *Mbp^{shi}* Oligodendrozyten bereits kleiner im Vergleich zu *wildtyp* Oligodendrozyten sind und das ein MOBP Knockdown die Reduktion der Zelloberfläche verstärkt. Dementgegen führt eine MOBP Überexpression genau wie in *wildtyp* Zellen zu einer signifikant größeren Zelloberfläche (siehe Abbildung 47B), was zusammenfassend darauf schließen lässt, dass sich alterierende MOBP Mengen in einer MBP-unabhängigen Weise auf die oligodendrogliale Morphologie auswirken.

4.2.5 Potentieller Zytoskelett- vermittelter Wirkmechanismus von MOBP auf die oligodendrogliale Morphologie

Die bisher in primären Oligodendrozyten und *Oli-neu* Zellen erhobenen Daten deuten stark auf eine Funktion von MOBP auf die morphologische Differenzierung von Oligodendrozyten hin und scheinen unabhängig von einer heterophilen Interaktion mit MBP umgesetzt zu werden. Eine weitere Möglichkeit, wie MOBP die Differenzierung primärer Oligodendrozyten im Laufe der Entwicklung vorantreiben könnte, wäre eine Interaktion mit dem Zytoskelett. Interessanterweise wurde bereits eine Assoziation von MOBP und dem Mikrotubuli-Netzwerk in kultivierten Oligodendrozyten vermutet (Montague et al., 1998). Um die Assoziation von MOBP und α -Tubulin genauer zu untersuchen, wurden primäre Oligodendrozyten aus C57BL/6 Mäusen kultiviert, nach 5DIV fixiert und gegen MOBP sowie α -Tubulin gefärbt (siehe 3.7.2, 3.9.6.1). Mit Hilfe eines TCS SP5 Konfokalen-Mikroskops (Leica) wurden zwischen 200- und 300 μ m dicke Ebenen innerhalb der Oligodendrozyten aufgenommen (siehe 3.9.6.2), wobei schließlich die Ebene, mit der höchsten Intensität an MOBP und α -Tubulin zur Überprüfung einer Kolo-kalisation analysiert wurde. In der nachfolgenden Abbildung 48 ist exemplarisch eine der insgesamt sechs analysierten Oligodendrozyten (5DIV) dargestellt.

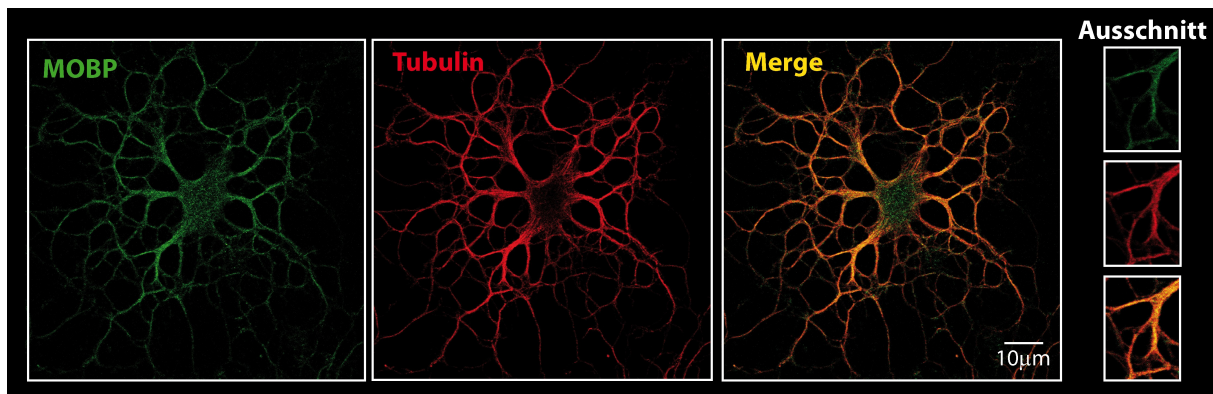


Abbildung 48: Zelluläre Kolokalisation von α -Tubulin und MOBP in primären Oligodendrozyten. Immunzytochemischer Nachweis der Kolokalisation von α -Tubulin (rot) und MOBP (grün) in einem kultivierten primären Oligodendrozyten (5DIV). Gezeigt ist eine einzelne konfokale Ebene (mit höchster Intensität). Der Größenmaßstab beträgt 10 μ m.

Im grünen Kanal ist MOBP dargestellt und zeigt wie bereits in 4.1.1.2 beschrieben eine Expression im oligodendroglialen Zytoplasma und in den großen Ausläufern des Oligodendrozyten. Das Mikrotubulinetzwerk ist im roten Kanal mit hoher Intensität in den großen Ausläufern des Oligodendrozyten zu erkennen. Schon alleine in der Überlagerung beider Kanäle (Merge) kann die von Montague und Kollegen im Jahre 1998 gemachte Beobachtung, einer Assoziation von MOBP mit Tubulin, nachvollzogen werden.

Um die Kolokalisation allerdings hinsichtlich ihrer Signifikanz im Detail zu untersuchen, wurde pro biologischem Replikat ein Bereich innerhalb der Ebene höchster Intensität (siehe Abbildung 48) unter Zuhilfenahme der Software ImageJ und des Plugins JACoP unter Verwendung des Mander's Korrelationskoeffizienten (MCC) durchgeführt (Bolte, S. and Cordeliers, 2006; Manders et al., 1993). In der nachfolgenden Abbildung 49 ist exemplarisch ein solch analysierter Bereich innerhalb der Ebene höchster Intensität abgebildet.

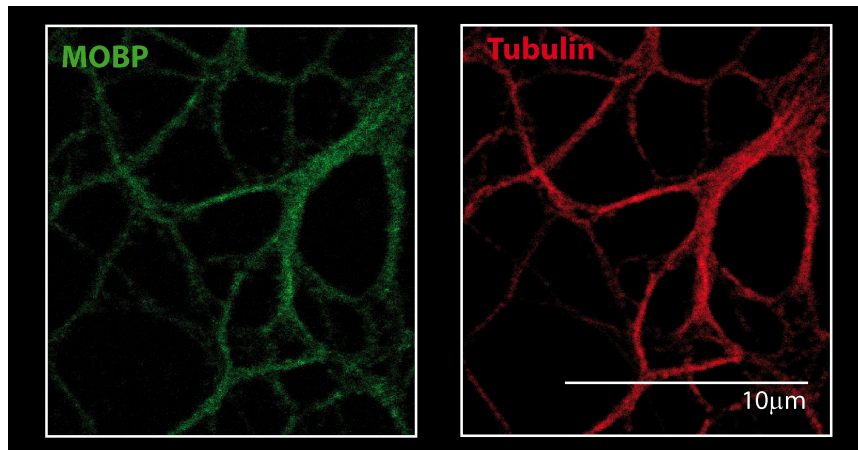


Abbildung 49: Quantifizierung der zellulären Kollokalisierung von α -Tubulin mit MOBP. Beispiel eines mit Hilfe des Mander's Korrelationskoeffizienten analysierten Bereiches innerhalb der konfokalen Ebene höchster Intensität des Oligodendrozyten aus Abbildung 48. Es wurde die zu Gesamt- α -Tubulin relative Überlagerung von α -Tubulin mit MOBP quantifiziert. Der Größenmaßstab beträgt 10 μ m; Der Mittelwert aus den biologischen Replikaten (n) ergibt für M1 58,3%. n=6; Details siehe Text und Tabelle 23 + Tabelle 24.

Die Analyse des in Abbildung 49 gezeigten Bereiches der konfokalen Ebene höchster Intensität des Oligodendrozyten gibt zwei unterschiedliche Werte an. M1 beschreibt den Anteil des roten Kanals (α -Tubulin) in Regionen des grünen Kanals (MOBP) und M2 den Anteil des grünen Kanals in Regionen des roten Kanals. In der in Tabelle 23 gezeigten Analyse wurde der Koeffizient M1 verwendet, um die Kollokalisierung von α -Tubulin und MOBP in Bezug auf Gesamt-Tubulin zu zeigen. Hierbei entspricht ein Wert von 0 keiner Kollokalisierung und ein Wert von 1 einer vollständigen, also 100%igen Kollokalisierung beider Proteine.

Tabelle 23: Zusammenfassung MCC (M1): Prozentualer Anteil an α -Tubulin, der mit MOBP assoziiert ist

	n1	n2	n3	n4	n5	n6	Mittelwert	SEM
MCC (M1)	0,542	0,702	0,532	0,472	0,675	0,577	0,583	0,088

Zur Untermauerung der in Tabelle 23 angegebenen prozentualen Kollokalisierung beider Proteine von 58,3% wurden zudem der Pearson's Korrelationskoeffizient (PCC) berechnet und der Cost's Test durchgeführt (siehe 3.9.6.3). Der PCC ($r=0,623$) bestätigt die Kollokalisierung und der Cost's Test ergibt einen P-Wert von 100%, womit die Signifikanz der Kollokalisierung als bewiesen gilt.

Tabelle 24: Zusammenfassung MCC (M2), PCC und Cost'sTest

	MCC (M2)	PCC	r (Original)	r (willkürlich)	P-Wert
n1	0,403	0,482	0,482	0.0±0.0010	100%
n2	0,724	0,953	0,953	0.0±0.0060	100%
n3	0,398	0,479	0,479	0.0±0.0010	100%
n4	0,597	0,523	0,523	0.0±0.0030	100%
n5	0,739	0,731	0,731	0.0±0.0050	100%
n6	0,515	0,562	0,562	0.0±0.0040	100%

Zusammenfassend konnte eine signifikante Kolo­kalisierung von α -Tubulin mit MOBP von insgesamt 58,3% zum Zeitpunkt stark erhöhter MOBP Expression in kultivierten Oligodendrozyten (5DIV) evaluiert werden. Somit könnte MOBP die morphologische Differenzierung von Oligodendrozyten über das Zytoskelett vermitteln.

5 Diskussion

Eine physiologische Myelinisierung neuronaler Axone mit ihren funktionellen sowie strukturellen Eigenschaften erfordert eine präzise Anpassung der Oligodendrozyten an die jeweils vorliegenden Bedingungen. Zunächst werden differenzierende Oligodendrozytenvorläuferzellen ihre Fortsätze dynamisch verlängern und wieder einziehen, bis sie in eine Ausbildung stabiler Kontakte mit den entsprechenden axonalen Segmenten übergehen (Nave and Werner, 2014). Diese axo-glialen Kontakte entwickeln sich zu komplexen dreidimensionalen radialen sowie lateralen Umhüllungsstrukturen, welche bei Erreichen einer bestimmten Dicke der stetig wachsenden Myelinschicht schließlich zum Pausieren kommen (Snaidero et al., 2014). Während die der Myelinisierung zu Grunde liegenden Start- und vor allem Stop- Signale bisher nur im geringen Ausmaß erforscht sind, stellt der Axondurchmesser einen essentiellen Parameter für die Dicke der ausgebildeten Myelinschicht dar (Chomiak and Hu, 2009). Um schnell auf neuronale Anforderungen reagieren zu können, müssen Oligodendrozyten daher über aktivierbare Signalwege verfügen, um die benötigte morphologische oligodendrogliale Differenzierung vorantreiben zu können. Ein Konzept zur Erfüllung der zuvor beschriebenen Ansprüche an den Oligodendrozyten ist die lokale Synthese von Myelin- Bestandteilen direkt an der axo-glialen Kontaktstelle zu dem erforderlichen Zeitpunkt. Die lokale Fyn-vermittelte Synthese des Myelin basischen Proteins stellt einen entscheidenden Prozess der Myelinisierung dar (Müller et al., 2013), was durch einen hypomyelinisierten Phänotyp des zentralen Nervensystem in Abwesenheit der Fyn-Kinase oder MBP unterstrichen wird (Readhead and Hood, 1990; Sperber et al., 2001).

5.1 Fyn- vermittelte translationelle Regulation von A2RE enthaltenden *Mbp* mRNAs

Neben einer reinen perinukleären *Mbp* mRNA Lokalisation konnte diese auch innerhalb von Myelinfraktionen ausgemacht werden (Colman et al., 1982), was darauf hindeutet, dass *Mbp* mit Hilfe eines spezialisierten Mechanismus temporal reguliert zu dem entsprechenden Zielort transportiert wird und dort einer lokalen Synthese unterliegt (White et al., 2008), um einerseits eine schnelle Myelinisierung zu gewährleisten und andererseits intrazelluläre Aggregationen zu vermeiden (Brophy et al., 1993). Im Zuge der mRNA Lokalisierung hin zur

axo-glialen Kontaktstelle wird die *Mbp* mRNA zunächst für den Transport in die Zellperipherie innerhalb des Zellkerns markiert. Dies erfolgt durch Bindung des trans acting factors hnRNP A2 an die RNA- Transportsequenz (*A2 response element*, A2RE) innerhalb der 3'UTR der *Mbp* mRNA (Munro et al., 1999). Nachdem die markierte *Mbp* mRNA aus dem Nukleus exportiert wurde, assoziieren weitere RNA-binde Proteine (Kosturko et al., 2006, 2005; Raju et al., 2008; White et al., 2012) sowie Komponenten der Translationsmaschinerie (Barbarese et al., 1995), um eine schnelle lokal sowie temporal regulierte Translation zu gewährleisten. Durch diese komplexe Assoziation verschiedener Proteine sowie regulatorischer Faktoren werden so genannte Ribonukleoproteinpartikel (RNP) beziehungsweise RNA-Granula formiert (Carson and Barbarese, 2005), welche schließlich entlang des Zytoskeletts an den entsprechenden Zielort transportiert werden können (Ainger et al., 1993; Lyons et al., 2009). In Oligodendrozyten spielt die regulatorische kleine nicht-kodierende RNA 715 (*sncRNA 715*), sowie Argonaut- Proteine eine entscheidende Rolle bei der translationellen Inhibition der *Mbp* mRNA während der Lokalisierung (Bauer et al., 2012; Müller et al., 2015). Für Ago2 konnte gezeigt werden, dass es vermutlich innerhalb des RNA-Granula mit hnRNP A2, der *Mbp* mRNA sowie der *sncRNA 715* interagieren kann (Müller et al., 2015). Argonaut- Proteine sind Schlüsselkomponenten des sogenannten miRISC (*microRNA-induced silencing complex*), einem Proteinkomplex, in welchem sie die translationale Regulation von mRNAs über beispielsweise kleine nicht-kodierende RNAs, wie die innerhalb der *Mbp* 3'UTR bindende *sncRNA 715*, vermitteln (Bauer et al., 2012; Johnston et al., 2010; Müller et al., 2015). Angekommen an der axo-glialen Kontaktstelle, kommt es unter anderem durch Bindung von axonalem L1 an oligodendrogiales F3/Contactin zur Aktivierung der Src-Kinase Fyn, welche wiederum durch Phosphorylierung verschiedener Granula- Komponenten wie hnRNP A2 und F sowie Ago zu dessen Dissoziation führt. Die Ablösung des miRISC von der *Mbp* mRNA könnte die Translation reaktivieren und somit die Myelinisierung einleiten (Krämer-Albers et al., 2011; Laursen et al., 2009; Müller et al., 2015; White et al., 2008).

Innerhalb der oligodendroglialen hnRNP A2- abhängigen RNPs befinden sich wahrscheinlich unterschiedliche A2RE- enthaltende mRNAs, welche während des Transports translational inaktiviert und spezifisch lokal sowie temporal reaktiviert werden müssen, was bereits für andere Zelltypen verifiziert werden konnte (Carson et al., 2008; Gao et al., 2008; Mouland et al., 2001). Neben *Mbp* wird auch für andere A2RE-enthaltende mRNAs, wie *CamKIIalpha*, *Neurogranin*, *Arc* und *Mobp* vermutet, dass diese in hnRNP A2-abhängigen RNA Granulas zur axo-glialen Kontaktseite transportiert werden (Barbarese et al., 1999; Gao et al., 2008).

Im Laufe der oligodendroglialen Differenzierung konnte eine Umverteilung der *Mobp81a* mRNA vom Soma hin zu den Zellfortsätzen ausgemacht werden (Montague et al., 1997). Es ergibt sich also die Vermutung, dass A2RE- enthaltenden *Mobp* mRNAs (*Mobp* 71,81A,99 und 169) genau wie *Mbp* in Bereichen der „*myelin sheath assembly site*“ lokalisiert sind, wobei die kleinen basischen Proteine mit der MDL des kompakten Myelins assoziieren (Gould et al., 1999).

Anhand der hier durchgeführten Ko-Immunpräzipitation von endogenem hnRNP A2 und der basischen Myelinproteine MBP und MOBP aus *in vitro* differenzierten Oligodendrozyten, konnte eine deutliche Assoziation der *Mbp* mRNA sowie der *Mobp* mRNA mit endogen exprimiertem hnRNP A2 gezeigt werden (siehe Abbildung 15). Daraus ergibt sich, dass *Mbp* und *Mobp* mRNA in oligodendroglialen hnRNP A2- abhängigen RNA-Granulas hin zur axoglialen Kontaktstelle transportiert werden (Carson and Barbarese, 2005; Kosturko et al., 2006, 2005; Munro et al., 1999; Raju et al., 2008; Schäfer et al., 2016; White et al., 2012). Dies lässt zudem auf eine translationelle Repression der *Mobp* mRNA im Zuge des Lokalisationsweges schließen. Anhand der hier durchgeführten Expressionsanalyse endogener *Mobp* mRNA sowie MOBP Protein Mengen zu verschiedenen Zeitpunkten oligodendroglialer Differenzierung, konnte eine temporale Verschiebung zwischen der mRNA und Protein Detektion, äquivalent zu MBP, ausgemacht werden (siehe Abbildung 11, Abbildung 12). Zudem konnte mit Hilfe des erstellten Polysomen Profils ein deutlicher Anstieg translationeller Aktivität der *Mbp* und *Mobp* mRNA im Verlauf der Oligodendrozytendifferenzierung verzeichnet werden (siehe Abbildung 17), was zusätzlich die aufgestellte Hypothese einer translationellen *Mobp* mRNA Repression in den frühen Phasen oligodendroglialer Entwicklung fundiert.

Die in hnRNP A2 RNA Granula transportierten translationell inhibierten mRNAs, wie *Mbp* und *Mobp*, werden nun spezifisch lokal sowie temporal reaktiviert. Im Zuge dieser Arbeit sollte anhand verschiedener experimenteller Versuche, in welchen die endogen vorliegende Fyn-Kinase Proteinmenge sowie deren Aktivitätszustand in primären Oligodendrozyten manipuliert wurde (siehe 4.1.2.2), untersucht werden, ob die Translation der A2RE- enthaltenden mRNAs hinsichtlich derselben Signale lokal initiiert wird. Anhand der hier endogen durchgeführten Manipulation des Aktivitätszustandes der Fyn Kinase, konnte ein weiterer experimenteller Beweis zur Untermauerung bisheriger Ergebnisse geliefert werden, dass die nicht Rezeptor Tyrosin-Kinase Fyn das Signalmolekül für die lokal sowie temporal regulierte MBP Synthese darstellt (Schäfer et al., 2016; Wake et al., 2011; White et al.,

2008). Zudem konnte hinsichtlich dieser durchgeführten Versuche ein Einblick in die translationelle Regulation der oligodendroglial exprimierten MOBP-Proteinfamilie gewonnen werden. *Mobp* unterliegt ebenfalls einer lokal sowie temporal regulierten Translation in Oligodendrozyten, wobei die Fyn-Kinase essentiell für die Initiation der A2RE-abhängigen Translation zu sein scheint ((Schäfer et al., 2016), siehe Abbildung 18, Abbildung 20, Abbildung 22, Abbildung 24, Abbildung 26, Abbildung28, Abbildung 34).

Ob die Fyn-stimulierte *Mbp*- und *Mobp* Translation während der oligodendroglialen Entwicklung nun simultan oder zu unterschiedlichen Zeitpunkten sowie in unterschiedlichen Bereichen abläuft, konnte noch nicht geklärt werden. Anhand der hier durchgeführten Expressionanalyse und zuvor gemachter Beobachtungen, wird jedoch deutlich, dass die Expression der MOBP Proteine mit der Periode aktivster Myelinformierung beziehungsweise MBP Expression korreliert (Montague et al., 1997). Die Immunzytochemische Analyse der MOBP sowie MBP Verteilung in einem differenzierten Oligodendrozyten lässt allerdings eine zumindest teilweise differentielle Lokalisierung der beiden basischen Myelinproteine vermuten (siehe Abbildung 14). MOBP ist primär in den großen oligodendroglialen Zellfortsätzen lokalisiert, wohingegen MBP zusätzlich in den flachen Myelin-ähnlichen Membranen in den *in vitro* kultivierten Oligodendrozyten vorhanden ist (Aggarwal et al., 2011b; Montague et al., 1998; Schäfer et al., 2016). Interessanterweise kann auch die Fyn-Kinase vorwiegend innerhalb der großen- sowie innerhalb der sehr feinen die Myelin-ähnlichen Membranen durchziehenden oligodendroglialen Zellfortsätzen detektiert werden (Osterhout et al., 1999). Daraus resultiert die Vermutung, dass dies die Bereiche lokaler *Mobp* und *Mbp* Translation darstellen. Nachfolgend könnte MBP schließlich aktiv oder auch passiv in die Membranstruktur übergehen. Anhand von *in vitro* durchgeführten Studien wurde suggeriert, dass sich die MBP Polymerisation auf Grundlage heterophiler Interaktion auf die oligodendrogliale Membranformierung auswirkt. Die Polymerisation wird durch strukturell bedingte Veränderungen nach entstehendem Kontakt mit der Membran stimuliert, was schließlich in der Bildung eines wachsenden Proteinnetzwerks und somit in der Ausbildung Myelin-ähnlicher Membranen *in vitro* resultiert und einer Ausbildung kompakten Myelins *in vivo* entsprechen würde (Aggarwal et al., 2011b; Bakhti et al., 2014). Hierbei wird die Bindung von MBP an die Membran über PI(4,5)P2 (*phosphatidylinositol 4, 5- bisphosphate*) vermittelt (Nawaz et al., 2009), wobei es bisher noch unklar ist, wo der initiale Kontakt aufgebaut wird und wie die PI(4,5)P2- abhängige Kontaktvermittlung reguliert werden kann. Allerdings konnte PI(4,5)P2 innerhalb von *Lipid Rafts* in Zusammenhang mit der zellulär ausgebildeten Oberfläche über eine Modulation der Aktindynamik gebracht werden (Golub

and Caroni, 2005). Auch die Fyn-Kinase wird über Myristoylierung eines N-terminalen Glycin beziehungsweise Cystein- Restes innerhalb von *Lipid Rafts* der Membran verankert. *Lipid Rafts* stellen spezialisierte, dynamische Mikrodomänen dar, welche reich an Cholesterin und Sphingolipiden sind und als eine Art Signalplattform zur Kommunikation zwischen Axon und Oligodendrozyt fungieren (Krämer et al., 1999). Daher liegt die Vermutung nahe, dass MBP direkt nach Fyn-vermittelter Translation mit den PI(4,5)P₂- angereicherten *Lipid Rafts* in der Plasmamembran assoziiert und die MBP Polymerisation sowie nachfolgend die Membranausweitung initiiert. Die in MOBP Proteinen vorliegende FYVE-Domäne (Fab1, YOTB, Vac1, EEA1) initiiert eine spezifische Bindung zu PI(3)P (*phosphatidylinositol-3-phosphate*) (Stahelin et al., 2014). In dem neuronal exprimierten Protrudin konnte allerdings gezeigt werden, dass dessen FYVE- Domäne zudem in der Lage ist, weitere Phospholipide einschließlich PI(4,5)P₂ zu binden (Gil et al., 2012). Somit könnte auch MOBP innerhalb der großen oligodendroglialen Zellfortsätze nach Fyn-vermittelter Translation mit den Phospholipiden innerhalb der *Lipid Rafts* der Plasmamembran interagieren und so in das kompakte Myelin eingebaut werden. Dementgegen könnten die basischen Proteine auch in Membrannähe synthetisiert werden und darauffolgend in ihrer löslichen Form an den Zielort lokalisiert werden oder sogar differentiell in separaten hnRNP A2- abhängigen RNA Granulas zu einem distinkten Bereich transportiert und dort in Antwort auf Fyn-Kinase Aktivität translatiert werden. Eine Umgestaltung *Mbp*- enthaltender RNA-Granulas wurde bereits vermutet (Torvund-Jensen et al., 2014), was die Möglichkeit unterschiedlicher hnRNP A2 RNA- Granula Subtypen ebenfalls mit einschließt.

5.2 MOBP und dessen Funktion in der oligodendroglialen morphologischen Differenzierung

Das spezifisch in Oligodendrozyten exprimierte Myelin-assoziierte Oligodendrozyten basische Protein (MOBP) gleicht MBP hinsichtlich mehrerer Aspekte. Alle MBP Isoformen sowie ein Teil der MOBP Isoformen weisen eine identische RNA Transportsequenz auf, die vermutlich der Markierung dieser mRNAs im Zellkern für den translationell inhibierten hnRNP A2-abhängigen RNA Transport hin zur axo glialen Kontaktstelle vermittelt (Gao et al., 2008; Munro et al., 1999; Schäfer et al., 2016). Die Derepression der *Mobp* und *Mbp* Translation wird schließlich in Abhängigkeit ausgebildeter axo-glialer Signale durch die Fyn-Kinase stimuliert (Krämer-Albers et al., 2011; Schäfer et al., 2016; White and Krämer-Albers, 2014). Da MOBP, genau wie MBP, einen stark basischen Charakter aufweist, wurde zunächst

angenommen, dass MOBP auch an der Kompaktierung der Myelinmembran und somit an der Formierung der MDL beteiligt sein könnte (Gould et al., 2000; Montague et al., 2006). Unterstützt wurde diese Hypothese durch verringerte MOBP Proteinmengen in MBP-defizientem Myelin der homozygoten *shiverer* Maus (siehe Abbildung 45, (Montague et al., 1999)). In den heterozygoten *shiverer* Mäusen, unter Ausbildung eines strukturell normal aufgebauten Myelins, konnte keine Verringerung hinsichtlich der MOBP Proteinmenge verzeichnet werden (Montague et al., 1999). Dies lässt darauf schließen, dass eine abnormal ausgebildete MDL die Einlagerung von MOBP in das Myelin gefährdet. Unter MOBP-defizienten Bedingungen konnte allerdings kein demyelinisierender Phänotyp identifiziert werden (Yamamoto et al., 1999; Yool et al., 2002), vielmehr scheint MOBP an der Aufrechterhaltung des kompakten Myelins beteiligt zu sein. Es wird vermutet, dass MOBP direkter Bestandteil der radialen Komponente innerhalb der MDL ist. Diese zytoplasmagefüllten Kanäle durchziehen das kompakte Myelin in einem als diffus bezeichneten Zick-Zack Muster und kontrollieren die Permeabilität kleiner Moleküle zwischen den einzelnen Myelinschichten zur Aufrechterhaltung der Integrität. In den MOBP-defizienten Mäusen kommt es zur Ausbildung eines phylogenetisch simpleren in Amphibien bekannten Modells der radialen Komponente, welches als kondensiert bezeichnet wird. Diese kondensierte Anordnung der radialen Komponente scheint dem kompakten Myelin eine verringerte Stabilität zu verleihen, da durch eine Behandlung mit dem demyelinisierenden Hexachlorophen eine Lockerung der MDL in MOBP Knockout Mäusen beobachtet werden konnte (Yamamoto et al., 1999; Yoshikawa, 2001). MOBP scheint somit weniger essentiell für die Formierung des kompakten Myelin zu sein, vielmehr wird ihm eine Rolle in der Aufrechterhaltung der Myelinintegrität und der Stabilisierung der radialen Komponente im ZNS zugeschrieben.

Um die Rolle von MOBP in oligodendroglialen Zellen besser verstehen zu können, wurde nun die bisher ungeklärte Funktion auf zellulärer Ebene der im hohen Maß exprimierten und komplex regulierten basischen Proteinfamilie untersucht. Mittels alterierender endogener MOBP Proteinmengen, herbeigeführt durch siRNA vermittelten Knockdown beziehungsweise AAV- vermittelte Überexpression, konnten die Effekte von MOBP auf zellulärer Ebene in *in vitro* differenzierten primären Oligodendrozyten untersucht werden. In den hier durchgeführten Experimenten wurden Expressionvektoren erstellt, welche nur die kodierenden Bereiche ohne die jeweilige 3'UTR mit ihren regulatorischen Elementen der einzelnen MOBP Isoformen exprimieren. Der Schwerpunkt wurde somit auf die zellulären Effekte, welche allein auf die jeweils vorliegende MOBP Proteinmenge der Isoformen

zurückzuführen ist, gelegt. Die Überexpression verschiedener MOBP Isoformen resultierte in einer gleichartigen Wirkung in primären Oligodendrozyten sowie in der immortalisierten Oligodendrozytenvorläuferzelllinie *Oli-neu*. Zum einen wurde die gebildete Zelloberfläche primärer Oligodendrozyten durch eine erhöhte endogene MOBP Proteinmenge signifikant vergrößert, was mit einer verstärkten Ausbildung Myelin-ähnlicher Membranen sowie einem signifikant stärker verzweigten Netzwerk an oligodendroglialen Ausläufern einhergeht (siehe Abbildung 39, Abbildung 40, Abbildung 42 (Schäfer et al., 2016)). Auch in *Oli-neu* Zellen konnte durch eine Erhöhung endogener MOBP Proteinmengen die Morphologie hinsichtlich ihrer Komplexität signifikant beeinflusst werden. Die Zellen bildeten längere und breitere Ausläufer und wiesen eine deutlich verzweigtere Morphologie auf (siehe Abbildung 44, (Schäfer et al., 2016)). Gegensätzliches gilt für die Reduktion endogener MOBP Proteinmengen, die in signifikant kleineren Oligodendrozyten mit einer stark reduzierten Komplexität resultiert (siehe Abbildung 39, Abbildung 41, Abbildung 43). Die Funktion von MOBP hinsichtlich der morphologischen Differenzierung von Oligodendrozyten könnte durch die in allen Isoformen identischen 68 N-terminalen Aminosäuren vermittelt werden. Der aminoterminalen Cystein-enthaltenden Region innerhalb des MOBP Proteins wurde zunächst noch keine Funktion zugeschrieben (Yamamoto et al., 1994). In einer neueren Studie konnte allerdings die zuvor beschriebene N-terminal lokalisierte FYVE Domäne innerhalb des MOBP Proteins identifiziert werden, welche generell eine Bindung an Phospholipide (PI(3)P) ermöglicht (Stahelin et al., 2014). Diese cystein-reiche Sequenz könnte nun eine Membraninteraktion über hydrophobe Wechselwirkungen sowie über eine Bindung der basischen Reste an die negativ geladenen Membranlipide vermitteln (Han et al., 2013) und so die Bildung Myelin-ähnlicher Membranen stimulieren. Es wurde zudem suggeriert, dass sich die MBP Polymerisation auf die oligodendrogliale Membranausbildung auswirkt (Aggarwal et al., 2011a, 2011b; Bakhti et al., 2014). MOBP sowie MBP weisen gleiche biophysikalische Eigenschaften auf und wären somit in der Lage Polymere durch heterophile Interaktionen auszubilden. Die erbrachten Beobachtungen hinsichtlich der morphologischen Veränderungen, wie der verstärkten Generierung Myelin-ähnlicher Membranen in Abhängigkeit erhöhter MOBP Proteinmengen, könnte somit auch durch eine Interaktion der beiden basischen Proteinfamilien umgesetzt werden. Die in *shiverer* Oligodendrozyten erhobenen Ergebnisse lassen allerdings eher vermuten, dass die MOBP-vermittelte morphologische Auswirkung auf die oligodendroglialen Zellen unabhängig von MBP ausgeführt wird (siehe Abbildung 47, (Schäfer et al., 2016)). Die C-terminale Prolin-reiche und damit basische Region von MOBP scheint weniger an der Interaktion mit Membranen beteiligt zu sein, was durch die *in vivo* Studien MOBP-defizienter Mäuse

bestätigt wurde (Yamamoto et al., 1999; Yool et al., 2002). Vielmehr weist er eine Lokalisation innerhalb der zytoplasmatischen Kanäle der MDL kompakten Myelins auf (Myllykoski et al., 2012) und kann so möglicherweise die Membranintegrität gewährleisten. Zudem könnte diese Prolin-reiche basische Region auch eine Anlagerung an das Zytoskelett vermitteln, denn bereits 1998 wurde eine Assoziation von MOBP81A mit dem Mikrotubulinetzwerk vermutet (Montague et al., 1998) und im Zuge einer Kollokalisationsanalyse konnte hier zudem eine signifikante Kollokalisierung von alpha-Tubulin mit MOBP von 58,3% in primären Oligodendrozyten zu dem Zeitpunkt stark erhöhter endogener Proteinmengen evaluiert werden (Schäfer 2016, siehe Abbildung 48, Abbildung 49, Tabelle 23, Tabelle 24). Die in Abhängigkeit von MOBP erhöhte ausgebildete Komplexität des Netzwerkes oligodendroglialer Zellausläufer könnte somit zumindest teilweise über eine Interaktion von MOBP mit dem Mikrotubulinetzwerk vermittelt werden. Somit wäre es möglich, dass MOBP die Formierung neuer oligodendroglialer Zellfortsätze begünstigt und das Wachstum Zytoskelett vermittelt stimuliert.

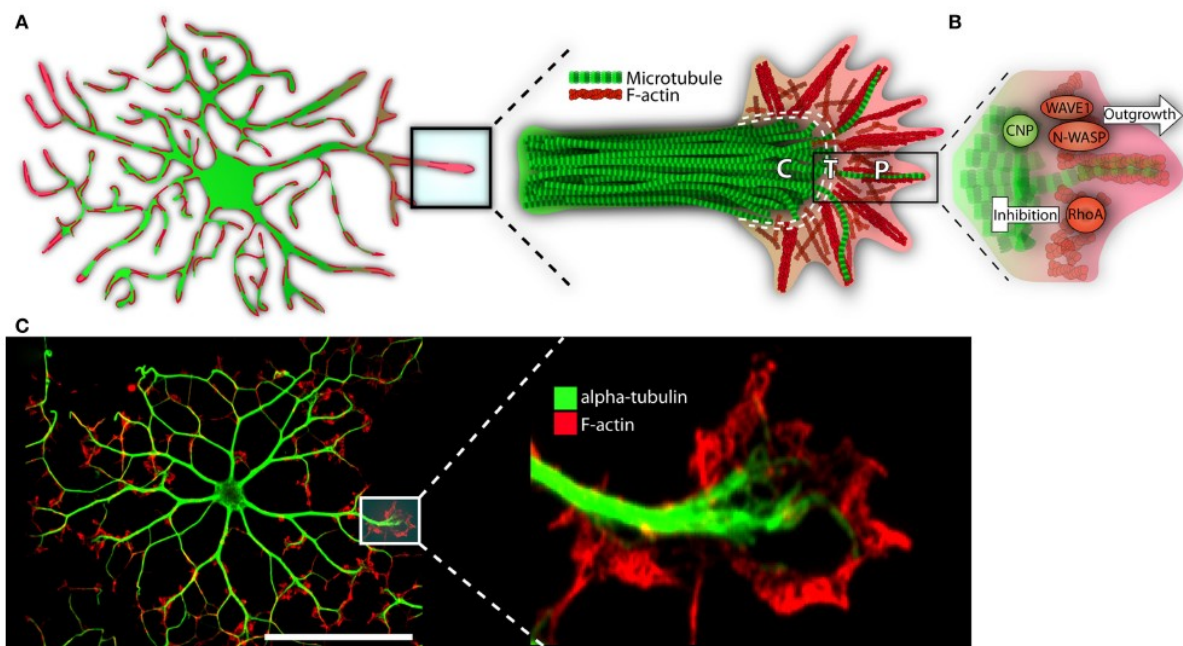


Abbildung 50: Das Zytoskelett in differenzierenden Oligodendrozyten. **A**, Mikrotubuli (in grün) sind in parallelen Bündeln entlang der oligodendroglialen Fortsätze lokalisiert, wohingegen F-Aktin (in rot) an der Vorderkante des oligodendroglialen Fortsatzes konzentriert vorliegt. **B**, Schematische Darstellung von Zytoskelett- assoziierten Proteinen, die eine Fortsatzverlängerung stimulieren (CNP, WAVE1, N-WASP) oder blockieren (Rho A). **C**, Immunzytochemische Aufnahme des Zytoskeletts eines unreifen Oligodendrozyten mit den angegebenen Antikörpern. (modifiziert nach (Michalski and Kothary, 2015)).

Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass unreife Oligodendrozyten an der Vorderkante des oligodendroglialen Zellfortsatzes reichlich mit einem Netzwerk an F-Aktin

Fasern versehen sind, wobei parallele F-Aktin Bündel gegen die Membrankante drängen und so Filopodien generieren (Fox et al., 2006; Rumsby et al., 2003). Eine Mikrotubuli-reiche zentrale Domäne ist direkt hinter dieser aktiven, dynamischen peripheren Aktinfront lokalisiert, wobei wenige Mikrotubuli in die periphere Domäne hineinragen und so ein gerichtetes Wachstum ermöglichen (Bauer et al., 2009; Lunn et al., 1997; Song et al., 2001). Die F-Aktin reiche periphere Domäne ebnet somit einen Weg für die Mikrotubuli innerhalb der primären Ausläufer im Laufe der oligodendroglialen Entwicklung (siehe Abbildung 50). CNP, ein Marker unreifer Oligodendrozyten, ist im Stande mit Tubulin-Heterodimeren zu assoziieren und ist somit am Zusammenbau der zentral gelegenen mikrotubulären Domäne involviert, wodurch es essentiell für den Auswuchs der Zellfortsätze zu Beginn der Oligodendrozytendifferenzierung zu sein scheint (Lee et al., 2005). Mit Erhöhung der Zellkomplexität während der oligodendroglialen Reifung liegen die Mikrotubuli nun vermehrt in ihrer acetylierten Form vor, was temporal gesehen mit der Einleitung der lokalen Translation der in die Zellfortsätze lokalisierten *Mobp* mRNA korrelieren könnte und somit in einer Assoziation von MOBP über seine Prolin-reiche basische Region mit α -Tubulin resultiert (siehe Abbildung 48, Abbildung 49, Tabelle 23, Tabelle 24). Oligodendrozyten neigen im Zuge ihrer Differenzierung dazu, ihre Zellfortsätze dynamisch zu verlängern, auszubreiten sowie wieder einzuziehen bis sie schließlich in Abhängigkeit spezifischer axo-glialer Signale einen stabilisierten Kontakt zu dem ausgewählten Zielaxon ausbilden (Nave and Werner, 2014). MOBP könnte nun zudem die neu formierten, verlängerten und polarisierten, verbreiterten Zellausläufer stabilisieren und einer erneuten Einziehung der Zellfortsätze entgegenwirken, was in einer Stabilisierung des axo-glialen Kontaktes resultieren würde und wodurch schließlich die radiale und laterale Membranexpansion eingeleitet werden könnte. Zudem ermöglicht die Stabilisierung des mikrotubulären Netzwerkes, hervorgerufen durch eine Tubulin- Acetylierung in reifenden Oligodendrozyten und möglicherweise durch Interaktion mit MOBP, eine Aufrechterhaltung des verzweigten oligodendroglialen Netzwerkes (Bauer et al., 2009; Schäfer et al., 2016; Song et al., 2001). Es wurde vermutet, dass im Zuge oligodendroglialer Differenzierung ein Gleichgewicht zwischen CNP's Vorantreibung für zelluläres Wachstum (Gravel et al., 1996; Yin et al., 1997) und MBP's Drang die Myelinmembran zu kompaktieren beziehungsweise zu stabilisieren vorliegen müsse (Snaidero et al., 2014), was möglicherweise durch die stabilisierende Funktion von MOBP hinsichtlich des mikrotubulären Netzwerkes im Zuge der Myelinisierung vermittelt werden könnte.

Im Zuge aktiver Myelinisierung konnte zudem gezeigt werden, dass neue Myelinmembranen an der inneren oligodendroglialen, dem Axon anliegenden Fläche (*innermost tongue*) gebildet werden, was mit einer lateralen Membranexpansion einhergeht. Innerhalb der wachsenden Myelinschicht gewährleisten zytoplasmatische Kanäle den Membrantransport hin zur leitenden Myelinisierungsfront (*leading edge*) während Phasen aktiver Myelinisierung. Im Zuge der Entwicklung werden diese Kanäle weitgehend geschlossen, wobei der Öffnungszustand dieser zytoplasmatischen Kanäle abhängig von den vorliegenden Mengen an Phosphatidylinositol- (3,4,5)-Triphosphat (PI(3,4,5)P3), reguliert über die Aktivierung der Rho GTPase, zu sein scheint (Snaidero et al., 2014) und somit entscheidend an der Initiierung des Myelin-Wachstums beteiligt ist. Die in MOBP Proteinen vorliegende FYVE-Domäne könnte neben der Bindung zu PI(3)P möglicherweise auch eine Bindung zu anderen Phospholipiden wie PI(3,4,5)P3 und PI(4,5)P2 vermitteln (Gil et al., 2012; Stahelin et al., 2014). Somit könnte auch MOBP innerhalb der großen oligodendroglialen Zellfortsätze nach Fyn-vermittelter Translation mit den Phospholipiden innerhalb der *Lipid Rafts* in Kontakt treten und PI(3,4,5)P3- vermittelt an der Stabilisierung der zytoplasmatischen Kanäle, welche essentiell für den Membrantransport sind, und somit an dem Wachstum der Myelinmembran beteiligt sein. Dies könnte ein Mechanismus sein, wie MOBP schließlich auf zellulärer Ebene die erhöhte Bildung Myelin-ähnlicher Membranen *in vitro* induziert (siehe Abbildung 40). Im Zuge der Membran Kompaktierung durch MBP *in vitro*, kommt es zu einem Rückzug beider Komponenten des Zytoskeletts und MOBP könnte schließlich PI(4,5)P2- vermittelt in das kompakte Myelin eingebaut werden, wobei sein C-terminaler Bereich innerhalb der zytoplasmatischen Kanäle lokalisiert (Myllykoski et al., 2012) für die Membranintegrität sorgen könnte.

5.3 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die *Mobp* mRNA im Laufe oligodendroglialer Differenzierung genau wie *Mbp* mRNA vermutlich einer Translokation in die Peripherie hin zur axo-glialen Kontaktstelle unterliegt, da eine Interaktion von endogen exprimierter *Mobp*- und *Mbp* mRNA mit hnRNP A2 anhand von Immunopräzipitationsexperimenten aus primären Oligodendrozyten nachgewiesen werden konnte. Somit liegt die Vermutung nahe, dass die *Mobp* mRNA, möglicherweise zusammen mit der *Mbp* mRNA, in hnRNP A2- abhängigen RNA- Transportgranula vom Zellkern in die Peripherie transportiert wird. In zukünftigen Experimenten könnte anhand von *in situ* Hybridisierungen untersucht werden, ob die A2RE- enthaltenden *Mobp*- und *Mbp* mRNAs

zusammen in den hnRNP A2- abhängigen RNA- Transportgranula in die Zellperipherie transportiert werden. In anderen Zelltypen wurde bereits vermutet, dass mehrere mRNAs zusammen in RNA Transportgranula transportiert werden können (Carson et al., 2008). Dennoch besteht die Möglichkeit, dass sie in unterschiedlichen hnRNP A2 RNA-Granula, welchen bereits eine gewisse Dynamik zugeschrieben werden konnte (Torvund-Jensen et al., 2014), lokalisiert werden.

Es konnte zudem gezeigt werden, dass die über hnRNP A2-abhängige RNA Granula transportierte *Mobp* mRNA während der Translokation hin zur axo-glialen Kontaktstelle einer translationellen Inhibition unterliegt. Dies konnte durch Überprüfung der *Mobp* mRNA Expression sowie MOBP Synthese während der oligodendroglialen Differenzierung *in vitro* analysiert werden, wobei eine gesteigerte Translation in späteren Phasen der Zellentwicklung verzeichnet werden konnte. Anhand weiterer Experimente könnte nun untersucht werden, wie die Translationsrepression im Zuge des granulären Transportes gewährleistet wird. Mit Hilfe der Software GeneTrail (<http://genetrail.bioinf.uni-sb.de/>) hatte Nina Hochhaus im Zuge ihrer Dissertation potentielle Ziel Gene der sncRNA 715, einem Inhibitor der *Mbp* Translation identifiziert (Hochhaus, 2013; Shah et al., 2012), wobei *Mobp* mRNA ebenfalls als potentielle Ziel- mRNA aufgeführt wurde. Da zwischen der MBP Synthese und der sncRNA 715 Expression eine negative Korrelation besteht (Bauer et al., 2012), wäre es interessant im Zuge der Überexpression einer synthetischen sncRNA 715 beziehungsweise der Inhibierung der endogen exprimierten sncRNA 715 mittels siRNA in primären Oligodendrozyten den Effekt auf die vorliegenden MOBP Proteinmengen zu untersuchen. So würde man im Falle einer Überexpression der synthetischen sncRNA 715 in primären Oligodendrozyten eine verringerte MOBP Synthese und mittels Inhibierung der endogen exprimierten sncRNA 715 eine gesteigerte MOBP Synthese erwarten. Neben sncRNA 715 wird Ago2 ebenfalls eine wichtige Funktion in der Inhibition der *Mbp* mRNA zugeschrieben. Ago2 ist in der Lage mit hnRNP A2, der *Mbp* mRNA, der sncRNA 715 und mit der Src-Kinase Fyn zu interagieren (Müller et al., 2015). Argonaut- Proteine sind Schlüsselkomponenten des sogenannten miRISC, einem Proteinkomplex, in welchem sie die translationale Regulation von mRNAs über beispielsweise kleine nicht-kodierende RNAs vermitteln (Johnston et al., 2010; Meister, 2013). In einem weiteren experimentellen Ansatz könnte somit anhand von Immunopräzipitationen eine Assoziation von *Mobp* mRNA mit sncRNA 715 sowie Ago2 untersucht werden, um einen Einblick in die Translationsrepression während des *Mobp* mRNA Transportes innerhalb der hnRNP A2-abhängigen RNA Granula zu erlangen.

Die nicht-Rezeptor Tyrosin Kinase Fyn konnte zudem als Signalmolekül zur temporal sowie lokal regulierten translationellen Reaktivierung der *Mobp* mRNA in Oligodendrozyten nachgewiesen werden. Durch Bindung von axonalem L1 an oligodendrogliales F3/Contactin kommt es zur Aktivierung der Src-Kinase Fyn, welche wiederum durch Phosphorylierung verschiedener Granula-Komponenten wie hnRNP A2 und F sowie Ago den Zerfall des RNA-Granula bedingt und somit die Myelinisierung eingeleitet werden kann (Müller et al., 2015, 2013; White et al., 2012, 2008). In weiteren Experimenten wäre es interessant, den Mechanismus der translationellen Reaktivierung von *Mbp* mRNA sowie *Mobp* mRNA zu untersuchen. Hierzu könnte die endogene Aktivität der Fyn-Kinase durch AAV-vermittelte Überexpression in oligodendroglialen Zellen gesteigert werden und nachfolgend mit Hilfe von Koimmunopräzipitationsversuchen eine Interaktion der verschiedenen granulären Komponenten in Abhängigkeit ihres Phosphorylierungsstatus analysiert werden.

MOBP scheint im Zuge oligodendroglialer Entwicklung zudem einen positiven Effekt auf die morphologische Differenzierung auszuüben, was im Zuge dieser Arbeit anhand alterierender endogener MOBP Proteinmengen in primären Oligodendrozyten sowie *Oli-neu* Zellen validiert werden konnte (Schäfer et al., 2016).

Um den Mechanismus der vermutlich Zytoskelett-vermittelten Ausbildung und Stabilisierung des verzweigten oligodendroglialen Netzwerks besser verstehen zu können, wäre es interessant mit Hilfe der FRAP (*Fluorescence Recovery after Photobleaching*) Methode eine Interaktion mit dem Mikrotubuli Netzwerk dynamisch zu untersuchen. Hierzu müsste man die MOBP Expressionsvektoren umklonieren, um die kodierenden Bereiche der MOBP Isoformen zusammen mit der jeweiligen regulatorischen 3'UTR sowie einem Fluoreszenzmarker in primären Oligodendrozyten mittels AAV-Transduktion überexprimieren zu können. Tubulin kann hierfür mit kommerziellen Fluoreszenzfarbstoffen wie SiR-Tubulin markiert werden. Im Zuge der Life cell Imaging Technologie könnte nun die dynamische Interaktion beider Proteine an einem Fluoreszenzmikroskop über eine bestimmte Zeit analysiert werden. Da auch CNP an einem Auswachsen von oligodendroglialen Zellfortsätzen durch Interaktion mit Tubulin eine essentielle Rolle zu spielen scheint (Gravel et al., 1996; Yin et al., 1997), wäre es zusätzlich interessant eine Interaktion dieser beiden Myelinproteine zu untersuchen. Zum einen könnte man mittels FRAP die Interaktion von Tubulin, CNP sowie MOBP parallel untersuchen und zum anderen könnte man endogene Immunopräzipitationen mit den entsprechenden Antikörpern in Oligodendrozyten verschiedener Differenzierungsstadien durchführen und auf eine Assoziation überprüfen.

Es wurde zudem vermutet, dass die in MOBP Proteinen vorliegende FYVE- Domäne neben der Bindung zu PI(3)P möglicherweise auch eine Bindung zu anderen Phospholipiden wie auch PI(3,4,5)P3 und PI(4,5)P2 vermitteln könnte (Gil et al., 2012; Stahelin et al., 2014) und den hier identifizierten Effekt einer MOBP-abhängigen Ausbildung Myelin-ähnlicher Membranen *in vitro* sowie den Einbau von MOBP in die MDL kompakten Myelins erklären könnte. Somit wäre es essentiell in Zukunft weitere Versuche hinsichtlich einer potentiellen Interaktion von MOBP mit Lipidliganden durchzuführen. Mit Hilfe des so genannten *Protein Lipid Overlay* (PLO) Assay können zum einen mögliche Interaktionspartner identifiziert werden, aber auch relative Affinitäten mit welchen ein Protein mit einem Lipidliganden interagiert erhoben werden. Im Zuge dieses Experiments müsste eine Nitrozellulose-Membran mit einer Reihe unterschiedlicher Lipide in verschiedenen Konzentrationen überzogen sowie mit den zuvor aufgereinigten Proteinen, welche ein Epitop-Tag beinhalten, inkubiert und schließlich mittels Immunoblotting analysiert werden (Dowler et al., 2002).

Die bereits durch MOBP siRNA Behandlung primärer Oligodendrozyten erzielten Ergebnisse hinsichtlich der Differenzierung oligodendroglialer Zellen, könnten erneut in Oligodendrozytenkulturen aus MOBP Knockout Mäusen analysiert werden. In einem so genannten Rescue-Experiment, könnten schließlich die einzelnen MOBP Isoformen mittels AAV-vermittelter Transduktion in die Zellen eingebracht werden und der Effekt auf zellulärer Ebene validiert werden.

Zudem könnten die in Oligodendrozytenkulturen *in vitro* erhobenen Effekte von MOBP auf die Differenzierung oligodendroglialer Zellen in einem physiologischeren *ex vivo* System wie den kortikalen Hirnschnitten aus *wildtyp* Mäusen oder auch MOBP Knockout Mäusen noch detaillierter untersucht werden. Die einzelnen MOBP Isoformen könnte mittels AAV-vermittelter Transduktion in die Oligodendrozyten der kultivierten Hirnschnitte überexprimiert beziehungsweise erneut eingebracht werden. Das Protokoll der frühzeitigen Überexpression von MOBP konnte bereits im Zuge dieser Arbeit erfolgreich etabliert werden (siehe 3.7.4, 3.8.3.2, 4.2.2.1). Nach erfolgter Fixierung könnte man in weiteren Experimenten schließlich die vorliegenden Neurofilamente, MOBP sowie MBP mit Hilfe entsprechender Antikörper immunhistochemisch visualisieren und die Effekte hinsichtlich der oligodendroglialen Zellkomplexität in MOBP überexprimierenden Zellen in Anwesenheit des neuronalen Netzwerks mit Hilfe eines konfokalen Mikroskops analysieren. In diesem *ex vivo* System könnte nachfolgend mit einem in Kooperation mit Biovoxxel bereits entwickelten Plugin „Myelination“ für ImageJ zudem der Effekt der erhöhten Bildung Myelin-ähnlicher Membranen in Abhängigkeit von MOBP anhand der Myelinsierung axonaler Segmente untersucht werden.

MOBP stellt eine reichlich in Oligodendrozyten exprimierte sowie im Laufe der Zellentwicklung komplex regulierte Proteinfamilie dar, was durch deren subzelluläre Lokalisation verdeutlicht wird. MOBP ist zum einen Bestandteil der MDL kompakten Myelins, geht eine Assoziation mit dem Zytoskelett sowie den Mitochondrien ein und konnte zudem im Nukleus nachgewiesen werden (Montague et al., 2005, 1998; Schäfer et al., 2016). Somit wäre es von essentieller Bedeutung weitere MOBP- Interaktionspartner zu identifizieren, um das Ausmaß der funktionellen Diversität verstehen zu können. Eine Möglichkeit wäre die Durchführung einer endogenen MOBP-Immunpräzipitation aus primären Oligodendrozytenkulturen mit nachfolgender Massenspektrometrie, um Ko-immunopräzipitierte Proteine und somit potentielle Interaktionspartner in Erfahrung zu bringen. Zudem könnte man eine Überexpression der einzelnen MOBP Isoformen in *Oli-neu* Zellen induzieren und somit spezifische Interaktionspartner der jeweiligen Isoformen identifizieren. Hierzu könnten die im Zuge dieser Arbeit erstellten MOBP-Expressionsvektoren, welche ein MycHis-Tag aufweisen, zunächst in *Oli-neu* Zellen überexprimiert werden und nachfolgend könnten die Proteine über ein Agarose Affinitätsgel, welches an c-Myc- Antikörper gekoppelt vorliegt, mit abschließender Elution mit Hilfe eines c-Myc- Peptids angereichert werden. Eine Alternative würde eine Anreicherung der getaggen Proteine über Dynabeads, welche speziell für die Isolierung von Proteinen mit His-Tag entwickelt wurden, darstellen. Die Eluate könnten anschließend wieder mittels Massenspektrometrie auf potentielle Interaktionspartner der einzelnen MOBP Isoformen untersucht werden.

6 Zusammenfassung

Oligodendrozyten sind die myelinisierenden glialen Zellen des zentralen Nervensystems (ZNS). Ein reifer Oligodendrozyt wickelt seine Ausläufer spiralförmig um die entsprechenden Zielaxone, wobei es zu lateralen und radialen Membranexpansionen kommt. Daran schließt sich ein Kompaktierungsvorgang der gegenüberliegenden Membranen an, bis letztlich eine kompakte multilamellare Einheit, das Myelin, entsteht. Dadurch wird eine schnelle saltatorische Reizweiterleitung im ZNS ermöglicht, sowie eine neuroprotektive Umgebung geschaffen. Die nicht-Rezeptor Tyrosin-Kinase Fyn stellt ein wichtiges Signalmolekül in Oligodendrozyten dar. Sie hat Einfluss auf die morphologische oligodendrogliale Differenzierung und ist Integrator axo-glialer Signalkaskaden, welche die lokale und temporal regulierte Translation des Myelin basischen Proteins (MBP), einem essentiellen Bestandteil der Myelinbildung, vermittelt. Die *Mbp* mRNA wird hierbei in so genannten RNA Granula mit einer Reihe RNA-bindende Proteinen, Komponenten der Translationsmaschinerie sowie der kleinen nicht-kodierenden RNA 715 (*sncRNA715*) und Argonaut Proteine, welchen zusammen eine entscheidende Rolle bei der translationellen Inhibition während der Lokalisierung zugeschrieben wird, hin zur axo-glialen Kontaktstelle transportiert. Hierbei ist hnRNP A2 für die Rekrutierung von mRNAs mit einer speziellen RNA Transportsequenz (A2RE) zuständig. Das spezifisch in Oligodendrozyten exprimierte Myelin-assoziierte Oligodendrozyten basische Protein (MOBP) gleicht MBP hinsichtlich mehrerer Aspekte. So wurde vermutet, dass auch *Mobp* im Zuge der oligodendroglialen Differenzierung als mRNA in die Peripherie transportiert wird. Die Signale, die eine lokale MOBP Synthese initiieren waren bisher ungeklärt und auch auf zellulärer Ebene war dieser basischen Myelinproteinfamilie bisher keine Funktion zugeschrieben.

In dieser Arbeit konnte eine Assoziation von MOBP mit hnRNP A2-abhängigen Transportgranula ausgemacht werden und zusätzlich eine translationelle Inhibition der *Mobp* mRNA in frühen Entwicklungsstadien, vermutlich im Zuge des Lokalisationsweges, gezeigt werden. Anhand verschiedener experimenteller Ansätze konnte die Fyn-Kinase als Signalmolekül für eine lokal und temporal regulierte MOBP Translation identifiziert werden. Darüber hinaus konnte der MOBP Proteinfamilie eine neue Funktion in der morphologischen Differenzierung von Oligodendrozyten zugeschrieben werden, was sich in einer erhöhten Komplexität des Netzwerks oligodendroglialer Zellausläufer, vermutlich ausgelöst durch eine Interaktion von MOBP mit dem Mikrotubulinnetzwerk, sowie in einer erhöhten Bildung Myelin-ähnlicher Membranen *in vitro* widerspiegelt.

7 Summary

Oligodendrocytes are the myelinating glial cells of the central nervous system (CNS). Myelin is formed by extensive wrapping meaning lateral and radial expansion of oligodendroglial processes around axonal segments which is followed by a compaction process leading to a compact multilamellar membrane, named myelin. Myelination ultimately allows a rapid saltatory conduction of action potentials within the CNS and sustains neuronal health by its neuroprotective function. The non-receptor tyrosine kinase Fyn is an important signaling molecule in oligodendrocytes. It controls the morphological differentiation of oligodendrocytes and is an integrator of axo-glial signaling cascades leading to localised synthesis of Myelin Basic Protein (MBP), an essential component for myelin formation. *Mbp* mRNA is transported from the nucleus to the axo-glial contact site in RNA granules containing a number of RNA-binding proteins, components of the protein synthesis machinery as well as the small non-coding RNA 715 (*sncRNA715*) and Argonaute proteins, which together mediate the translational inhibition of *Mbp* mRNA. The central granule protein hnRNP A2 recruits mRNAs containing a specific RNA transport sequence named A2RE. The specifically in oligodendrocytes expressed Myelin-Associated Oligodendrocytic Basic Protein (MOBP) resembles MBP in several aspects and has also been reported to be localised as mRNA in the peripheral myelin compartment. The signals initiating local MOBP synthesis were so far unidentified and the cellular function of MOBP also remained unknown.

In this thesis it could be shown that *Mobp* mRNA is associated with the hnRNP A2-dependent RNA transport machinery and is translationally repressed during the initial phases of oligodendrocyte differentiation. By several independent approaches we could identify the Fyn kinase as a signaling molecule leading to the localised synthesis of MOBP. Furthermore we reveal a novel function for MOBP in oligodendroglial morphological differentiation shown by a higher complexity of the process meshwork, possibly mediated by an interaction between MOBP and the microtubular network, as well as a higher amount of formed myelin-like membrane sheets *in vitro*.

8 Abkürzungsverzeichnis

AAV	Adeno-assoziiertes Virus
ALLN	N-Acetyl-L-leucyl-L-leucyl-L-norleucinal
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserum Albumin (<i>Bovine serum albumine</i>)
bzw.	Beziehungsweise
ca.	Zirka
CMV	Zytomegalovirus (<i>cytomegalovirus</i>)
CNP	2', 3'- zyklische Nukleotid 3' Phosphodiesterase
ddH₂O	doppelt destilliertes Wasser
dH₂O	destilliertes Wasser
d.h	das heißt
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle Grundmedium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleic acid)
DNAse	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eGFP	Verbessertes Grün-Fluoreszierendes Protein (<i>enhanced green fluorescent protein</i>)
Fyn^{WT}	Expressionskonstrukt (exprimiert die Wildtyp Fyn- Kinase)
Fyn⁻	Expressionskonstrukt (exprimiert die konstitutiv inaktive Fyn- Kinase)
GAPDH	Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase
HBSS	Hank's gepufferte Salzlösung (<i>Hank's Buffered Salt Solution</i>)
hnRNP	heterogene nukleäres Ribonukloprotein
HRP	Horseradish peroxidase
IZC	Immunzytochemie
kD	Kilodalton
MAG	Myelin- assoziierte Glykoprotein
MBP	Myelin basisches Protein (<i>myelin basic protein</i>)
MOBP	Myelin- Associated Oligodendrocytic Basic Protein
MOG	Myelin- Oligodendrozyten Glykoprotein
mRNA	Boten-RNA (<i>messenger RNA</i>)
Oli- neu	Oligodendrogliale Vorläuferzelllinie
OPC	Oligodendrozytenvorläuferzelle (<i>oligodendrocyte progenitor cell</i>)
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)

PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PI(3)P	Phosphatidylinositol-3-phosphate
PI(4,5)P2	Phosphatidylinositol- (4,5)-Biphosphat
PI(3,4,5)P3	Phosphatidylinositol- (3,4,5)-Triphosphat
PLP	Proteolipid-Protein
PNS	Peripheres Nervensystem
RNA	Ribonukleinsäure (<i>Ribonucleic acid</i>)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Realtime-PCR
TAE	Tris-Acetat-EDTA
WB	Western Blot
WPRE	woodchuck hepatitis post-transcriptional regulatory element
ZNS	Zentrales Nervensystem

9 Referenzen

- Aggarwal, S., Snaidero, N., Pähler, G., Frey, S., Sanchez, P., Zweckstetter, M., Janshoff, A., Schneider, A., Weil, M.-T., Schaap, I.A.T., Görlich, D., Simons, M., 2013. Myelin Membrane Assembly Is Driven by a Phase Transition of Myelin Basic Proteins Into a Cohesive Protein Meshwork. *PLoS Biol.* 11. doi:10.1371/journal.pbio.1001577
- Aggarwal, S., Yurlova, L., Simons, M., 2011a. Central nervous system myelin: structure, synthesis and assembly. *Trends Cell Biol.* 21, 585–593. doi:10.1016/j.tcb.2011.06.004
- Aggarwal, S., Yurlova, L., Snaidero, N., Retz, C., Frey, S., Zimmermann, J., Pähler, G., Janshoff, A., Friedrichs, J., Müller, D.J., Goebel, C., Simons, M., 2011b. A Size Barrier Limits Protein Diffusion at the Cell Surface to Generate Lipid-Rich Myelin-Membrane Sheets. *Dev. Cell* 21, 445–456. doi:10.1016/j.devcel.2011.08.001
- Ainger, K., Avossa, D., Diana, A.S., Barry, C., Barbarese, E., Carson, J.H., 1997. Transport and Localization Elements in Myelin Basic Protein mRNA. *J. Cell Biol.* 138, 1077–1087.
- Ainger, K., Avossa, D., Morgan, F., Hill, S.J., Barry, C., Barbarese, E., Carson, J.H., 1993. Transport and Localization of Exogenous Myelin Basic Protein mRNA Microinjected into Oligodendrocytes. *J. Cell Biol.* 123, 431–441.
- Allen, N.J., Barres, B.A., 2009. Glia — more than just brain glue. *Nat. Rev. Neurosci.* 457, 675–677.
- Armendáriz, B.G., Bribian, A., Pérez-Martínez, E., Martínez, A., de Castro, F., Soriano, E., Burgaya, F., 2012. Expression of Semaphorin 4F in neurons and brain oligodendrocytes and the regulation of oligodendrocyte precursor migration in the optic nerve. *Mol. Cell. Neurosci.* 49, 54–67. doi:10.1016/j.mcn.2011.09.003
- Azevedo, F.A.C., Carvalho, L.R.B., Grinberg, L.E.A.T., Farfel, Marcelo Ferretti, R.E.L., Leite, R.E.P., Filho, W.J., Lent, R., 2009. Equal Numbers of Neuronal and Nonneuronal Cells Make the Human Brain an Isometrically Scaled-Up Primate Brain. *J. Comp. Neurol.* 541, 532–541. doi:10.1002/cne.21974
- Bakhti, M., Aggarwal, S., Simons, M., 2014. Myelin architecture: zippering membranes tightly together. *Cell. Mol. Life sci.* 71, 1265–1277. doi:10.1007/s00018-013-1492-0
- Ballabh, P., Braun, A., Nedergaard, M., 2004. The blood – brain barrier: an overview Structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiol. Dis.* 16, 1–13. doi:10.1016/j.nbd.2003.12.016
- Barbarese, E., Brumwell, C., Kwon, S., Cui, H., Carson, J.H., 1999. RNA on the road to myelin. *J. Neurocytol.* 28, 263–270.
- Barbarese, E., Koppel, D.E., Deutscher, M.P., Smith, C.L., Ainger, K., Morgan, F., Carson, J.H., 1995. Protein translation components are colocalized in granules in oligodendrocytes. *J. Cell Sci.* 2790, 2781–2790.

- Barres, B.A., Lazar, M.A., Raff, M.C., 1994. A novel role for thyroid hormone, glucocorticoids and retinoic acid in timing oligodendrocyte development. *Development* 120, 1097–1108.
- Bauer, N.G., Richter-Landsberg, C., Ffrench-Constant, C., 2009. Role of the oligodendroglial cytoskeleton in differentiation and myelination. *Glia* 57, 1691–1705.
- Bauer, N.M., Moos, C., van Horssen, J., Witte, M., van der Valk, P., Altenhein, B., Luhmann, H.J., White, R., 2012. Myelin Basic Protein synthesis is regulated by small non-coding RNA 715. *EMBO Rep.* 13, 827–834. doi:10.1038/embor.2012.97
- Baumann, N., Pham-dinh, D., 2001. Biology of Oligodendrocyte and Myelin in the Mammalian Central Nervous System. *Physiol Rev* 81, 871–927.
- Besse, F., Ephrussi, A., 2008. Translational control of localized mRNAs : restricting protein synthesis in space and time. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 971–980. doi:10.1038/nrm2548
- Biname, F., Sakry, D., Dimou, L., Jolivel, V., Trotter, J., 2013. NG2 Regulates Directional Migration of Oligodendrocyte Precursor Cells via Rho GTPases and Polarity Complex Proteins. *J. Neurosci.* 33, 10858–10874. doi:10.1523/JNEUROSCI.5010-12.2013
- Bjartmar, C., Hildebrand, C., Lønder, K., 1994. Morphological Heterogeneity of Rat Oligodendrocytes : Electron Microscopic Studies on Serial Sections. *Glia* 244, 235–244.
- Boggs, J.M., 2006. Myelin basic protein : a multifunctional protein. *Cell. Mol. Life sci.* 63, 1945–1961. doi:10.1007/s00018-006-6094-7
- Bolte, S. and Cordelières, F.P., 2006. A guided tour into subcellular colocalization analysis in light. *J. Microsc.* 224, 213–232.
- Bribián, A., Esteban, P.F., Clemente, D., Soussi-Yanicostas, N., Thomas, J.-L., Zalc, B., de Castro, F., 2008. A novel role for anosmin-1 in the adhesion and migration of oligodendrocyte precursors. *Dev. Neurobiol.* 68, 1503–16. doi:10.1002/dneu.20678
- Brophy, P.J., Boccaccio, G.L., Boccaccio, G.L., Colman, D.R., Mount, T., 1993. The distribution of myelin basic protein mRNAs within myelinating oligodendrocytes. *Trends Neurosci.* 16, 515–521.
- Cai, J., Qi, Y., Hu, X., Tan, M., Liu, Z., Zhang, J., Li, Q., Sander, M., Qiu, M., 2005. Generation of oligodendrocyte precursor cells from mouse dorsal spinal cord independent of Nkx6 regulation and Shh signaling. *Neuron* 45, 41–53. doi:10.1016/j.neuron.2004.12.028
- Carson, J.H., Barbarese, E., 2005. Systems analysis of RNA trafficking in neural cells. *Biol. cell* 97, 51–62.
- Carson, J.H., Cui, H., Krueger, W., Schlepchenko, B., Brumwell, C., Barbarese, E., 2001. RNA Trafficking in Oligodendrocytes. *Results Probl Cell Differ* 34, 69–81. doi:10.1007/978-3-540-40025-7
- Carson, J.H., Gao, Y., Tatavarty, V., Levin, M.K., Korza, G., Francone, V.P., Kosturko, L.D., Maggipinto, M.J., Barbarese, E., 2008. Multiplexed RNA trafficking in oligodendrocytes and neurons. *Biochim. Biophys. Acta* 1779, 453–8. doi:10.1016/j.bbagr.2008.04.002

- Carson, J.H., Worboys, K., Ainger, K., Barbarese, E., 1997. Translocation of Myelin Basic Protein mRNA in Oligodendrocytes Requires Microtubules and Kinesin. *Cell Motil Cytoskelet.* 328, 318–328.
- Carson, M.J., Behringer, R.R., Brinster, R., McMorris, F.A., 1993. Insulin-like Growth Factor I Increases Brain Growth and Central Nervous System Myelination in Transgenic Mice. *Neuron* 10, 729–740.
- Chandran, S., Kato, H., Gerreli, D., Compston, A., Svendsen, C.N., Allen, N.D., 2003. FGF-dependent generation of oligodendrocytes by a hedgehog-independent pathway. *Development* 130, 6599–6609. doi:10.1242/dev.00871
- Chomiak, T., Hu, B., 2009. What Is the Optimal Value of the g-Ratio for Myelinated Fibers in the Rat CNS? A Theoretical Approach. *PLoS One* 4, e7754. doi:10.1371/journal.pone.0007754
- Chun, S.J., Rasband, M.N., Sidman, R.L., Habib, A. a, Vartanian, T., 2003. Integrin-linked kinase is required for laminin-2-induced oligodendrocyte cell spreading and CNS myelination. *J. Cell Biol.* 163, 397–408. doi:10.1083/jcb.200304154
- Colello, R.J., Devey, L.R., Imperato, E., Pott, U., 1995. The chronology of oligodendrocyte differentiation in the rat optic nerve: evidence for a signaling step initiating myelination in the CNS. *J. Neurosci.* 15, 7665–7672.
- Colman, D.R., Kreibich, G., Frey, A.B., Sabatini, D.D., 1982. Synthesis and Incorporation of Myelin Polypeptides into CNS Myelin. *J. Cell Biol.* 95, 598–608.
- Colognato, H., Ramachandrapa, S., Olsen, I.M., 2004. Integrins direct Src family kinases to regulate distinct phases of oligodendrocyte development. *J. Cell Biol.* 167, 365–375. doi:10.1083/jcb.200404076
- Czaplinski, K., Singer, R.H., 2006. Pathways for mRNA localization in the cytoplasm. *Trends Biochem. Sci.* 31, 687–693. doi:10.1016/j.tibs.2006.10.007
- Czopka, T., Ffrench-Constant, C., Lyons, D.A., 2013. Individual oligodendrocytes have only a few hours in which to generate new myelin sheaths in vivo. *Dev. Cell* 25, 599–609. doi:10.1016/j.devcel.2013.05.013
- Dahme, M., Bartsch, U., Martini, R., Anliker, B., Schachner, M., Mantei, N., 1997. Disruption of the mouse L1 gene leads to malformations of the nervous system. *Nat. Genet.* 17, 346–349.
- Dai, J., Bercury, K.K., Jin, W., Macklin, W.B., 2015. Olig1 Acetylation and Nuclear Export Mediate Oligodendrocyte Development. *J. Neurosci.* 35, 15875–15893. doi:10.1523/JNEUROSCI.0882-15.2015
- Denzer, K., Kleijmeer, M.J., Heijnen, H.F.G., Stoorvogel, W., Geuze, H.J., 2000. Exosome : from internal vesicle of the multivesicular body to intercellular signaling device. *J. Cell Sci.* 3374, 3365–3374.
- Dowler, S., Kular, G., Alessi, D.R., 2002. Protein lipid overlay assay. *Sci. Signal.*

- Dugas, J.C., Cuellar, T.L., Scholze, A., Ason, B., Emery, B., Zamanian, J.L., Foo, L.C., Mcmanus, M.T., Barres, B.A., 2010. Dicer1 and miR-219 are required for normal oligodendrocyte differentiation and myelination. *Neuron* 65, 597–611. doi:10.1016/j.neuron.2010.01.027.Dicer1
- Dugas, J.C., Notterpek, L., 2011. MicroRNAs in Oligodendrocyte and Schwann cell differentiation. *Dev. Neurosci.* 5125, 14–20. doi:10.1159/000323919
- Dyer, C.A., Philibotte, T.M., Billings-Gagliardi, S., Wolf, M.K., 1995. Cytoskeleton in myelin-basic-protein-deficient shiverer oligodendrocytes. *Dev. Neurosci.* 17, 53–62.
- Dziembowska, M., Tham, T.N., Lau, P., Vitry, S., Lazarini, F., Dubois-Dalcq, M., 2005. A role for CXCR4 signaling in survival and migration of neural and oligodendrocyte precursors. *Glia* 50, 258–69. doi:10.1002/glia.20170
- Emery, B., 2010. Regulation of Oligodendrocyte Differentition and Myelination. *Science* (80-.). 330, 779–783.
- Emery, B., Dugas, J.C., Emery, B., Dugas, J.C., 2014. Purification of Oligodendrocyte Lineage Cells from Mouse Cortices by Purification of Oligodendrocyte Lineage Cells from Mouse Cortices by Immunopanning. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2–16. doi:10.1101/pdb.prot073973
- Eulalio, A., Huntzinger, E., Izaurralde, E., 2008. GW182 interaction with Argonaute is essential for miRNA-mediated translational repression and mRNA decay. *Nature* 15, 346–353. doi:10.1038/nsmb.1405
- Flores, A.I., Mallon, B.S., Matsui, T., Ogawa, W., Rosenzweig, A., Okamoto, T., Macklin, W.B., 2000. Akt-Mediated Survival of Oligodendrocytes Induced by Neuregulins. *J. Neurosci.* 20, 7622–7630.
- Fox, M.A., Afshari, F.S., Alexander, J.K., Colello, R.J., Fuss, B., 2006. Growth conelike sensorimotor structures are characteristic features of postmigratory, premyelinating oligodendrocytes. *Glia* 53, 563–566.
- Fröhlich, D., Kuo, W.P., Frühbeis, C., Sun, J., Zehendner, C.M., Heiko, J., Pinto, S., Toedling, J., Trotter, J., B, P.T.R.S., Sun, J., 2014. Multifaceted effects of oligodendroglial exosomes on neurons: impact on neuronal firing rate , signal transduction and gene regulation. *Philos.trans.r.soc.l. B Biol.Sci.* 369, 20130510. doi:10.1098/rstb.2013.0510
- Frühbeis, C., Fröhlich, D., Kuo, W.P., Amphornrat, J., Thilemann, S., Saab, A.S., Kirchhoff, F., Möbius, W., Goebbels, S., Nave, K.A., Schneider, A., Simons, M., Klugmann, M., Trotter, J., Krämer-Albers, E.M., 2013. Neurotransmitter-Triggered Transfer of Exosomes Mediates Oligodendrocyte-Neuron Communication. *PLoS Biol.* 11. doi:10.1371/journal.pbio.1001604
- Fulton, D., Paez, P.M., Campagnoni, A.T., 2010. The multiple roles of myelin protein genes during the development of the oligodendrocyte. *ASN Neuro* 2, e00027. doi:10.1042/AN20090051

- Fünfschilling, U., Supplie, L.M., Mahad, D., Boretius, S., Saab, A.S., Edgar, J., Brinkmann, B.G., Kassmann, C.M., Tzvetanova, I.D., Möbius, W., Diaz, F., Meijer, D., Suter, U., Hamprecht, B., Sereda, M.W., Moraes, C.T., Frahm, J., Goebbels, S., Nave, K.-A., 2012. Glycolytic oligodendrocytes maintain myelin and long-term axonal integrity. *Nature* 485, 517–21. doi:10.1038/nature11007
- Gao, Y., Tatavarty, V., Korza, G., Levin, M.K., Carson, J.H., 2008. Multiplexed Dendritic Targeting of alpha Calcium Calmodulin-dependent Protein Kinase II, Neurogranin, and Activity-regulated Cytoskeleton-associated Protein RNAs by the A2 Pathway. *Mol. Biol. Cell* 19, 2311–2327.
- Garcion, E., Faissner, A., Ffrench-Constant, C., 2001. Knockout mice reveal a contribution of the extracellular matrix molecule tenascin-C to neural precursor proliferation and migration. *Development* 128, 2485–2496.
- Gil, J., Kim, E., Kim, I., Ku, B., Park, W.S., Oh, B., Ryu, S.H., Cho, W., Heo, W. Do, 2012. Phosphoinositides Differentially Regulate Protrudin Localization through the FYVE Domain. *J. Biol. Chem.* 287, 41268–41276. doi:10.1074/jbc.M112.419127
- Goebbels, S., Oltrogge, J.H., Kemper, R., Heilmann, I., Bormuth, I., Wolfer, S., Wichert, S.P., Möbius, W., Liu, X., Lappe-Siefke, C., Rossner, M.J., Groszer, M., Suter, U., Frahm, J., Boretius, S., Nave, K.-A., 2010. Elevated phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in glia triggers cell-autonomous membrane wrapping and myelination. *J. Neurosci.* 30, 8953–64. doi:10.1523/JNEUROSCI.0219-10.2010
- Golub, T., Caroni, P., 2005. PI(4,5)P2-dependent microdomain assemblies capture microtubules to promote and control leading edge motility. *J. Cell Biol.* 169, 151–65. doi:10.1083/jcb.200407058
- Gonsior, C., Binamé, F., Frühbeis, C., Bauer, N.M., Hoch-Kraft, P., Luhmann, H.J., Trotter, J., White, R., 2014. Oligodendroglial p130Cas is a target of Fyn kinase involved in process formation, cell migration and survival. *PLoS One* 9, e89423. doi:10.1371/journal.pone.0089423
- Gould, M., 1995. The number of Schmidt-Lanterman incisures than doubled in shiverer PNS myelin sheaths. *J. Neurocytol.* 24, 85–98.
- Gould, R.M., Freund, C.M., Barbarese, E., 1999. Myelin-Associated Oligodendrocytic Basic Protein mRNAs Reside at Different Subcellular Locations. *J. Neurochem.* 73, 1913–1924.
- Gould, R.M., Freund, C.M., Palmer, F., Feinstein, D.L., 2000. Messenger RNAs located in myelin sheath assembly sites. *J. Neurochem.* 75, 1834–1844. doi:10.1046/j.1471-4159.2000.0751834.x
- Gravel, M., Peterson, J., Yong, V.W., Kottis, V., Trapp, B., Braun, P.E., 1996. Overexpression of 2',3'-Cyclic Nucleotide 3'-Phosphodiesterase in Transgenic Mice Alters Oligodendrocyte Development and Produces Aberrant Myelination. *Mol. Cell. Neurosci.* 7, 543–466.

- Griffiths, I., Klugmann, M., Anderson, T., Yool, D., Thomson, C., McCulloch, M., Nadon, N., Nave, K.A., 1998. Axonal Swellings and Degeneration in Mice Lacking the Major Proteolipid of Myelin. *Science* (80-). 280, 1610–1613. doi:10.1126/science.280.5369.1610
- Griffiths, I.R., Schneider, A., Anderson, J., Nave, K.A., 1995. Transgenic and natural mouse models of proteolipid protein (PLP)-related dysmyelination and demyelination. *Brain Pathol* 5, 275–281.
- Han, H., Myllykoski, M., Ruskamo, S., Wang, C., Kursula, P., 2013. Review Article Myelin-Specific Proteins: A Structurally Diverse Group of Membrane-Interacting Molecules. *BioFactors* 39, 233–241. doi:10.1002/biof.1076
- Han, S.P., Friend, L.R., Carson, J.H., Korza, G., Barbarese, E., Maggipinto, M., Hatfield, J.T., Rothnagel, J.A., Smith, R., 2010. Differential subcellular distributions and trafficking functions of hnRNP A2/B1 spliceoforms. *Traffic* 11, 886–898. doi:10.1111/j.1600-0854.2010.01072.x.Differential
- Harauz, G., Ladizhansky, V., Boggs, J.M., 2009. Structural Polymorphism and Multifunctionality of Myelin Basic Protein †. *Biochemistry* 48, 8094–8104. doi:10.1021/bi901005f
- Harauz, G., and Boggs, J.M., 2013. Myelin management by the 18.5–kDa and 21.5–kDa classic myelin basic protein isoforms. *J. Neurochem.* 125, 334–361. doi:10.1210/jc.2009-1990.Glucose
- Hartline, D.K., Colman, D.R., 2007. Rapid Conduction and the Evolution of Giant Axons and Myelinated Fibers. *Curr. Biol.* 17, 29–35. doi:10.1016/j.cub.2006.11.042
- Hildebrand, C., Remahl, S., Persson, H., Bjartmar, C., 1993. Myelinated nerve fibres in the CNS. *Prog. Neurobiol.* 40, 319–384. doi:10.1016/0301-0082(93)90015-K
- Hochhaus, N., 2013. Translationsregulation des Myelin basischen Proteins in Gliazellen. Diss. am Fachbereich Biol. der Johannes Gutenberg- Univ. Mainz.
- Holz, A., Schaeren-Wiemers, N., Schafer, C., Pott, U., Colello, R.J., Schwab, M.E., 1996. Molecular and Developmental Characterization of Novel cDNAs the Myelin-Associated / Oligodendrocytic Basic Protein. *J. Neurosci.* 16, 467–477.
- Holz, A., Schwab, M.E., 1997. Developmental expression of the myelin gene MOBP in the rat nervous system. *J. Neurocytol.* 26, 467–477.
- Hu, J., Deng, L., Wang, X., Xu, X.-M., 2009. Effects of extracellular matrix molecules on the growth properties of oligodendrocyte progenitor cells in vitro. *J. Neurosci. Res.* 87, 2854–62. doi:10.1002/jnr.22111
- Hu, Q., Ang, B., Karsak, M., Hu, W., Cui, X., Duka, T., Takeda, Y., Chia, W., Sankar, N., Ng, Y., Ling, E., Maciag, T., Small, D., Trifonova, R., Kopan, R., Okano, H., Nakafuku, M., Chiba, S., Hirai, H., Aster, J.C., Schachner, M., Pallen, C.J., Watanabe, K., Xiao, Z., Louis, S., 2003. F3 / Contactin Acts as a Functional Ligand for Notch during

- Oligodendrocyte Maturation. *Cell* 115, 163–175.
- Jahn, O., Tenzer, S., Werner, H.B., 2009. Myelin Proteomics: Molecular Anatomy of an Insulating Sheath. *Mol. Neurobiol.* 40, 55–72. doi:10.1007/s12035-009-8071-2
- Johnston, M., Geoffroy, M., Sobala, A., Hay, R., Hutvagner, G., 2010. HSP90 Protein Stabilizes Unloaded Argonaute Complexes and Microscopic P-bodies in Human Cells. *Mol. Biol. Cell* 21, 1462–1469. doi:10.1091/mbc.E09
- Jonquieres, G. Von, Mersmann, N., Klugmann, C.B., Harasta, A.E., Kra, E., Lutz, B., Teahan, O., Housley, G.D., Fro, D., Klugmann, M., 2013. Glial Promoter Selectivity following AAV-Delivery to the Immature Brain. *PLoS One* 8. doi:10.1371/journal.pone.0065646
- Jungl, M., Kramer, E., Grzenkowskil, M., Tang, K., Biakemore, W., Aguzzi, A., Khazaie, K., Chiichlia, K., 1995. Lines of Murine Oligodendroglial Precursor Cells Immortalized by an Activated neu Tyrosine Kinase Show Distinct Degrees of Interaction with Axons In Wtro and In Wvo. *Eur. J. Neuroscence* 7, 1245–1265.
- Kamholz, J., Toffenetti, J., Lazzarini, R.A., 1988. Organization and Expression of the Human Myelin Basic Protein Gene. *J. Neurosci.* 21, 62–70.
- Kassmann, C.M., Lappe-Siefke, C., Baes, M., Brügger, B., Mildner, A., Werner, H.B., Natt, O., Michaelis, T., Prinz, M., Frahm, J., Nave, K.-A., 2007. Axonal loss and neuroinflammation caused by peroxisome-deficient oligodendrocytes. *Nat. Genet.* 39, 969–976. doi:10.1038/ng2070
- Kessaris, N., Fogarty, M., Iannarelli, P., Grist, M., Wegner, M., Richardson, W.D., 2006. Competing waves of oligodendrocytes in the forebrain and postnatal elimination of an embryonic lineage. *Nat. Neurosci.* 9, 173–179. doi:10.1038/nn1620
- Kessaris, N., Jamen, F., Rubin, L.L., Richardson, W.D., 2004. Cooperation between sonic hedgehog and fibroblast growth factor/MAPK signalling pathways in neocortical precursors. *Development* 131, 1289–98. doi:10.1242/dev.01027
- Klein, C., Kra, E., Cardine, A., Schraven, B., Brandt, R., Trotter, J., 2002. Process Outgrowth of Oligodendrocytes Is Promoted by Interaction of Fyn Kinase with the Cytoskeletal Protein Tau. *J. Neurosci.* 22, 698–707.
- Kosturko, L.D., Maggipinto, M.J., Korza, G., Lee, J.W., Carson, J.H., Barbarese, E., 2006. Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein (hnRNP) E1 Binds to hnRNP A2 and Inhibits Translation of A2 Response Element mRNAs. *Mol. Cell. Neurosci.* 17, 3521–3533. doi:10.1091/mbc.E05
- Kosturko, L.D., Maggipinto, M.J., Sa, C.D., Carson, J.H., Barbarese, E., 2005. The Microtubule-associated Protein Tumor Overexpressed Gene Binds to the RNA Trafficking Protein Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein A2 □. *Mol. Biol. Cell* 16, 1938–1947. doi:10.1091/mbc.E04
- Krämer, E.M., Klein, C., Koch, T., Boytinck, M., Trotter, J., 1999. Compartmentation of Fyn

- kinase with glycosylphosphatidylinositol- anchored molecules in oligodendrocytes facilitates kinase activation during myelination. *J. Biol. Chem.* 274, 29042–29049. doi:10.1074/jbc.274.41.29042
- Krämer-Albers, E.-M., Gehrig-Burger, K., Thiele, C., Trotter, J., Nave, K.-A., 2006. Perturbed interactions of mutant proteolipid protein/DM20 with cholesterol and lipid rafts in oligodendroglia: implications for dysmyelination in spastic paraplegia. *J. Neurosci.* 26, 11743–11752. doi:10.1523/JNEUROSCI.3581-06.2006
- Krämer-Albers, E.-M., White, R., Kramer-Albers, E.M., White, R., 2011. From axon-glial signalling to myelination: the integrating role of oligodendroglial Fyn kinase. *Cell. Mol. Life Sci.* 68, 2003–12. doi:10.1007/s00018-010-0616-z
- Lappe-Siefke, C., Goebbels, S., Gravel, M., Nicksch, E., Lee, J., Braun, P.E., Griffiths, I.R., Nave, K.-A., 2003. Disruption of Cnp1 uncouples oligodendroglial functions in axonal support and myelination. *Nat. Genet.* 33, 366–374. doi:10.1038/ng1095
- Laursen, L.S., Chan, C.W., French-Constant, C., 2009. An integrin-contactin complex regulates CNS myelination by differential Fyn phosphorylation. *J. Neurosci.* 29, 9174–85. doi:10.1523/JNEUROSCI.5942-08.2009
- Lee, J., Gravel, M., Zhang, R., Thibault, P., Braun, P.E., 2005. Process outgrowth in oligodendrocytes is mediated by CNP, a novel microtubule assembly myelin protein. *J. Cell Biol.* 170, 661–673. doi:10.1083/jcb.200411047
- Liang, X., Draghi, N. a, Resh, M.D., 2004. Signaling from integrins to Fyn to Rho family GTPases regulates morphologic differentiation of oligodendrocytes. *J. Neurosci.* 24, 7140–9. doi:10.1523/JNEUROSCI.5319-03.2004
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 408, 402–408. doi:10.1006/meth.2001.1262
- Lu, Q.R., Yuk, D., Alberta, J. a, Zhu, Z., Pawlitzky, I., Chan, J., McMahon, a P., Stiles, C.D., Rowitch, D.H., 2000. Sonic hedgehog--regulated oligodendrocyte lineage genes encoding bHLH proteins in the mammalian central nervous system. *Neuron* 25, 317–329. doi:10.1016/S0896-6273(00)80897-1
- Lunn, K.F., Baas, P.W., Duncan, I.D., 1997. Microtubule Organization and Stability in the Oligodendrocyte. *J. Neurosci.* 17, 4921–4932.
- Lyons, D.A., Naylor, S.G., Scholze, A., Talbot, W.S., 2009. Kif1b is essential for mRNA localization in oligodendrocytes and development of myelinated axons. *Nat. Genet.* 41, 854–858. doi:10.1038/ng.376.Kif1b
- Manders et al., 1993. Measurement of co-localization of objects in dual-color confocal images. *J. Microsc.* 169, 375–382.
- Martini, R., Mohajeri, M.H., Kasper, S., Giese, K.P., Schachner, M., 1995. Mice doubly deficient in the genes for P0 and myelin basic protein show that both proteins contribute

- to the formation of the major dense line in peripheral nerve myelin. *J. Neurosci.* 15, 4488–4495.
- Mayer, B.J., 2001. SH3 domains: complexity in moderation. *J. Cell Sci.* 114, 1253–1263.
- Mccallion, A.S., Montague, P., Griffiths, I.R., Savioz, A., Davies, R.W., 1996. The mouse gene (*Mobp*) encoding myelin-associated oligodendrocytic basic protein maps to distal Chromosome 9. *Mamm. Genome* 849, 847–849.
- Mcferran, B.W., Burgoyne, R.D., 1997. 2′3′-Cyclic nucleotide 3′-phosphodiesterase is associated with mitochondria in diverse adrenal cell types. *J. Cell Sci.* 110, 2979–2985.
- Meister, G., 2013. Argonaute proteins: functional insights and emerging roles. *Nat. Publ. Gr.* 14, 447–459. doi:10.1038/nrg3462
- Michalski, J.-P., Kothary, R., 2015. Oligodendrocytes in a Nutshell. *Front. Cell. Neurosci.* 9, 340. doi:10.3389/fncel.2015.00340
- Miller, R.H., 2002. Regulation of oligodendrocyte development in the vertebrate CNS. *Prog. Neurobiol.* 67, 451–467.
- Miron, V.E., Kuhlmann, T., Antel, J.P., 2010. Cells of the oligodendroglial lineage, myelination, and remyelination. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1812, 184–193. doi:10.1016/j.bbadis.2010.09.010
- Montague, P., Barrie, J.A., Thomson, C.E., Kirkham, D., Mccallion, A.S., Davies, R.W., Kennedy, P.G.E., Griffiths, I.R., 1998. Cytoskeletal and nuclear localization of myelin oligodendrocytic basic protein isoforms. *J. Neurosci.* 10, 1321–1328.
- Montague, P., Callion, A.S.M.C., Barrie, J.E., Edgar, J.M., Laughlin, M.M.C., Davies, R.W., 2005. Characterization of the Murine Splice Variant *Mobp* 155: Developmental CNS Expression Pattern and Subcellular Localization of Epitope-Tagged Protein. *Glia* 85, 80–85. doi:10.1002/glia.20155
- Montague, P., Dickinson, P.J., Mccallion, A.S., Stewart, G.J., Savioz, A., Davies, R.W., Kennedy, P.G.E., Griffiths, I.R., 1997. Developmental Expression of the Murine *Mobp* Gene. *J. Neurosci.* 143, 133–143.
- Montague, P., McCallion, A.S., Davies, R.W., Griffiths, I.R., 2006. Myelin-associated oligodendrocytic basic protein: a family of abundant CNS myelin proteins in search of a function. *Dev. Neurosci.* 28, 479–87. doi:10.1159/000095110
- Montague, P., Mccallion, A.S., Davies, R.W., Kennedy, G.E., Klugmann, M., Nave, K., Griffiths, I.R., 1999. Reduced Levels of a Specific Basic Protein Isoform in shiverer Myelin. *Dev. Neurosci.* 21, 36–42.
- Mouland, A.J., Xu, H., Cui, H., Krueger, W., Munro, T.P., Prasol, M., Mercier, J., Rekosh, D., Smith, R., Barbarese, E., Cohen, E.A., Carson, J.H., 2001. RNA Trafficking Signals in Human Immunodeficiency Virus Type 1. *Mol. Cell. Biol.* 21, 2133–2143. doi:10.1128/MCB.21.6.2133
- Müller, C., Bauer, N.M., Schäfer, I., White, R., 2013. Making myelin basic protein -from

- mRNA transport to localized translation. *Front. Cell. Neurosci.* 7, 169. doi:10.3389/fncel.2013.00169
- Müller, C., Schäfer, I., Luhmann, H.J., White, R., 2015. Oligodendroglial Argonaute protein Ago2 associates with molecules of the Mbp mRNA localization machinery and is a downstream target of Fyn kinase. *Front. Cell. Neurosci.* 9, 1–11. doi:10.3389/fncel.2015.00328
- Munro, T.P., Magee, R.J., Kidd, G.J., Carson, J.H., Barbarese, E., Smith, L.M., Smith, R., 1999. Mutational Analysis of a Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein A2 Response Element for RNA Trafficking *. *J Biol Chem.* 274, 34389–34395.
- Mutschler, E., Schaible, H.-G., Vaupel, P., 2007. *Anatomie, Physiologie und Pathophysiologie des Menschen.* Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart 6.Auflage, 677–689.
- Myllykoski, M., Baumga, P., Kursula, P., 2012. Conformations of peptides derived from myelin-specific proteins in membrane-mimetic conditions probed by synchrotron radiation CD spectroscopy. *Amino Acids* 42, 1467–1474. doi:10.1007/s00726-011-0911-5
- Nada, S., Yagi, T., Takeda, H., 1993. Constitutive Activation of Src Family Kinases in Mouse Embryos That Lack Csk. *Cell* 73, 1125–1135.
- Nave, K., 2010a. Myelination and the trophic support of long axons. *Nat. Publ. Gr.* 11, 275–283. doi:10.1038/nrn2797
- Nave, K., 2010b. Myelination and support of axonal integrity by glia. *Nature* 468, 244–252. doi:10.1038/nature09614
- Nave, K. a, Lai, C., Bloom, F.E., Milner, R.J., 1987. Splice site selection in the proteolipid protein (PLP) gene transcript and primary structure of the DM-20 protein of central nervous system myelin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84, 5665–5669. doi:10.1073/pnas.84.16.5665
- Nave, K., Werner, H.B., 2014. Myelination of the Nervous System: Mechanisms and Functions. *Cell Dev. Biol.* 30, 503–533. doi:10.1146/annurev-cellbio-100913-013101
- Nave, K.A., 1984. Neurological Mouse Mutants and the Genes of Myelin. *J. Neurosci. Res.* 38, 607–612.
- Nawaz, S., Kippert, A., Saab, A.S., Werner, H.B., Lang, T., Nave, K.-A., Simons, M., 2009. Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate-Dependent Interaction of Myelin Basic Protein with the Plasma Membrane in Oligodendroglial Cells and Its Rapid Perturbation by Elevated Calcium. *J. Neurosci.* 29, 4794–4807. doi:10.1523/JNEUROSCI.3955-08.2009
- Nishiyama, A., Komitova, M., Suzuki, R., Zhu, X., 2009. Polydendrocytes (NG2 cells): multifunctional cells with lineage plasticity. *Nat. Rev. Neurosci.* 10, 9–22. doi:10.1038/nrn2495
- Noble, M., Murray, K., Stroobant, P., Waterfield, M.D., Riddle, P., 1988. Platelet-derived

- growth factor promotes division and motility and inhibits premature differentiation of the oligodendrocyte/typ-2 astrocyte progenitor cell. *Nature* 333, 560–562.
- Norton, W.T., 1984. Recent Advances in Myelin Biochemistry ". *Ann N Y Acad Sci.* 436, 5–10.
- Obermeier, B., Daneman, R., Ransohoff, R.M., 2013. Development, maintenance and disruption of the blood-brain barrier. *Nat Med.* 19, 1584–1596. doi:10.1038/nm.3407.Development
- Olivier, C., Cobos, I., Maria, E., Villegas, P., Spassky, N., Zalc, B., Martinez, S., Thomas, J., 2001. Monofocal origin of telencephalic oligodendrocytes in the anterior entopeduncular area of the chick embryo. *Development* 128, 1757–1769.
- Orentas, D.M., Hayes, J.E., Dyer, K.L., Miller, R.H., 1999. Sonic hedgehog signaling is required during the appearance of spinal cord oligodendrocyte precursors. *Development* 2429, 2419–2429.
- Osterhout, D.J., Wolven, A., Wolf, R.M., Resh, M.D., Chao, M. V, 1999. Morphological Differentiation of Oligodendrocytes Requires Activation of Fyn Tyrosine Kinase. *J. Cell Biol.* 145, 1209–1218.
- Paez, P.M., Spreuer, V., Handley, V., Feng, J.-M., Campagnoni, C., Campagnoni, A.T., 2007. Increased Expression of Golli Myelin Basic Proteins Enhances Calcium Influx into Oligodendroglial Cells. *J. Neurosci.* 27, 12690–12699. doi:10.1523/JNEUROSCI.2381-07.2007
- Paolicelli, R.C., Bolasco, G., Pagani, F., Maggi, L., Scianni, M., Panzanelli, P., Giustetto, M., Ferreira, T.A., Guiducci, E., Dumas, L., Ragozzino, D., Gross, C.T., 2011. Synaptic Pruning by Microglia Is Necessary for Normal Brain Development. *Science* (80-). 333, 1456–1458.
- Parker, J.M.R., Guo, D., Hodges, R.S., 1986. New Hydrophilicity Scale Derived from High-Performance Liquid Chromatography Peptide Retention Data: Correlation of Predicted Surface Residues with Antigenicity and X-ray-Derived Accessible Sites? *Biol Chem* 5425–5432.
- Pfeiffer, S., Warrington, A., Bansal, R., 1993. The oligodendrocyte and its many cellular processes. *Trends Cell Biol.* 3, 191–197. doi:10.1016/0962-8924(93)90213-K
- Poliak, S., Peles, E., 2003. The local differentiation of myelinated axons at nodes of Ranvier. *Nat. Rev. Neurosci.* 4, 968–980. doi:10.1038/nrn1253
- Popko, B., 2003. Notch Signaling : A Rheostat Regulating Oligodendrocyte Differentiation ? *Dev. Cell* 1, 668–669.
- Popot, J., 1991. Major Myelin Proteolipid: The 4-alpha- Helix Topology. *J. Membr. Biol.* 246, 233–246.
- Pringle, N.P., Yu, W., Guthrie, S., Roelink, H., Lumsden, A., Peterson, A.C., Richardson, W.D., 1996. Determination of Neuroepithelial Cell Fate: Induction of the

- Oligodendrocyte Lineage by Ventral Midline Cells and Sonic Hedgehog. *Dev. Biol.* 177, 30–42.
- Quarles, R.H., Macklin, W.B., Morell, P., 2006. Myelin Formation, Structure, and Biochemistry. *Basic Neurochem. Mol. CellulR, ns Med. Asp.* 51–71.
- Raju, C.S., Go, C., Nord, Y., Hermanson, O., Lo, C., Visa, N., Castelo-branco, G., 2008. In Cultured Oligodendrocytes the A / B-type hnRNP CBF-A Accompanies MBP mRNA Bound to mRNA Trafficking Sequences. *Mol. Biol. Cell* 19, 3008–3019. doi:10.1091/mbc.E07
- Readhead, C., Hood, L., 1990. The dysmyelinating mouse mutations shiverer (shi) and myelin deficient (shimld). *Behav Genet* 20, 213–234.
- Relucio, J., Menezes, M.J., Miyagoe-Suzuki, Y., Takeda, S., Colognato, H., 2012. Laminin regulates postnatal oligodendrocyte production by promoting oligodendrocyte progenitor survival in the subventricular zone. *Glia* 60, 1451–67. doi:10.1002/glia.22365
- Resh, M.D., 1998. Fyn , a Src family tyrosine kinase. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2725, 1159–1162.
- Richardson, W.D., Kessaris, N., Pringle, N., 2006. Oligodendrocyte wars. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 11–18. doi:10.1038/nrn1826
- Roskoski, R., 2005. Src kinase regulation by phosphorylation and dephosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun* 331, 1–14. doi:10.1016/j.bbrc.2005.03.012
- Roskoski, R., 2004. Src protein–tyrosine kinase structure and regulation. *Biochem Biophys Res Commun* 324, 1155–1164. doi:10.1016/j.bbrc.2004.09.171
- Rowitch, D.H., Kriegstein, A.R., 2010. Developmental genetics of vertebrate glial-cell specification. *Nature* 468, 214–222. doi:10.1038/nature09611
- Rumsby, M., Afsar, i F., Stark, M., Hughson, E., 2003. Microfilament and microtubule organization and dynamics in process extension by central glia-4 oligodendrocytes: evidence for a microtubule organizing center. *Glia* 42, 118–129.
- Sakry, D., Karram, K., Trotter, J., 2011. Synapses between NG2 glia and neurons. *J. Anat.* 219, 2–7. doi:10.1111/j.1469-7580.2011.01359.x
- Salzer, J.L., 2003. Polarized Domains of Myelinated Axons. *Neuron* 40, 297–318.
- Schäfer, I., 2012. Fyn- abhängige Regulation der Translation des Myelin-Associated Oligodendrocytic Basic Proteins. Diplomarbeit am Fachbereich Biol. der Johannes Gutenberg- Univ. Mainz.
- Schäfer, I., Müller, C., Luhmann, H.J., White, R., 2016. MOBP levels are regulated by Fyn kinase and affect the morphological differentiation of oligodendrocytes. *J. Cell Sci.* Doi:10.1242/jcs.172148.
- Schindelin, J., Arganda-carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J., White, D.J., Hartenstein, V., Tomancak, P.,

- Cardona, A., 2012. Fiji - an Open Source platform for biological image analysis. *Nat. Methods* 9. doi:10.1038/nmeth.2019.Fiji
- Scholz, J., Klein, M.C., Behrens, T.E.J., Johansen-berg, H., 2009. Training induces changes in white-matter architecture. *Nat. Neurosci.* 12, 1370–1371. doi:10.1038/nn.2412
- Shah, A.A., Leidinger, P., Keller, R., Wendschlag, A., Meese, E., Blin, N., 2012. Altered miRNA expression patterns in Tff2 knock-out mice correlate with cellular pathways of neoplastic development and caloric metabolism. *Int. J. Mol. Med.* 29, 637–643. doi:10.3892/ijmm.2012.881
- Sherman, D.L., Brophy, P.J., 2005. Mechanisms of axon ensheathment and myelin growth. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 683–690. doi:10.1038/nrn1743
- Smith, R., 2004. Moving Molecules : mRNA Trafficking in Mammalian Oligodendrocytes and Neurons. *neuroscientist* 10, 495–500. doi:10.1177/1073858404266759
- Snaidero, N., Möbius, W., Czopka, T., Hekking, L.H.P., Mathisen, C., Verkleij, D., Goebbels, S., Edgar, J., Merkler, D., Lyons, D. a, Nave, K.-A., Simons, M., 2014. Myelin membrane wrapping of CNS axons by PI(3,4,5)P3-dependent polarized growth at the inner tongue. *Cell* 156, 277–90. doi:10.1016/j.cell.2013.11.044
- Song, J., Goetz, B.D., Baas, P.W., Dunca, I.D., 2001. Cytoskeletal reorganization during the formation of oligodendrocyte processes and branches. *Mol. Cell. Neurosci.* 17, 624–636.
- Spassky, N., Castro, F. De, Bras, B. Le, Heydon, K., Bloch-gallego, E., Che, A., Zalc, B., 2002. Directional Guidance of Oligodendroglial Migration by Class 3 Semaphorins and Netrin-1. *J. Neurosci.* 22, 5992–6004.
- Sperber, B.R., Boyle-Walsh, E. a, Engleka, M.J., Gadue, P., Peterson, A.C., Stein, P.L., Scherer, S.S., Mcmorris, F.A., Boyle-walsh, A., Engleka, M.J., Gadue, P., Peterson, A.C., Stein, P.L., Sperber, B.R., Scherer, S.S., Mcmorris, F.A., Boyle-Walsh, E. a, Engleka, M.J., Gadue, P., Peterson, A.C., Stein, P.L., Scherer, S.S., Mcmorris, F.A., 2001. A Unique Role for Fyn in CNS Myelination. *J. Neurosci.* 21, 2039–2047.
- Stahelin, R. V, Scott, J.L., Frick, C.T., 2014. Cellular and molecular interactions of phosphoinositides and peripheral proteins. *Chem. Phys. Lipids* 182, 3–18. doi:10.1016/j.chemphyslip.2014.02.002
- Staugaitis, S.M., Smith, P.R., Colman, D.R., 1990. Expression of Myelin Basic Protein Isoforms in Nonglial Cells. *J. Cell Biol.* 110, 1719–1727.
- Susuki, K., Chang, K., Zollinger, D., Lui, Y., Ogawa, Y., Eshed-Eisenbach, Y., Dours-Zimmermann, M., Oses-Prieto, J., Burlingame, A., Seidenbecher, C., Zimmermann, D., Oohashi, T., Peles, E., Rasband, M.N., 2013. Three mechanisms assemble central nervous system nodes of ranvier. *Neuron* 78, 469–482. doi:10.1523/JNEUROSCI.3593-07.2007.Omega-3
- Torvund-Jensen, J., Steengaard, J., Reimer, L., Fihl, L.B., Laursen, L.S., 2014. Transport

- and translation of MBP mRNA is regulated differently by distinct hnRNP proteins. *J. Cell Sci.* 127, 1550–1564. doi:10.1242/jcs.140855
- Trapp, B.D., Moench, T., Pulley, M., Barbosa, E., Tennekoon, G., Griffin, J., 1987. Spatial segregation of mRNA encoding myelin-specific proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84, 7773–7777.
- Trotter, J., Schachner, M., 1989. Cells positive for the O4 surface antigen isolated by cell sorting are able to differentiate into astrocytes or oligodendrocytes. *Brain Res Dev* 46, 115–122.
- Wake, H., Lee, P.R., Fields, R.D., 2011. Control of local protein synthesis and initial events in myelination by action potentials. *Science* (80-.). 333, 1647–1651. doi:10.1126/science.1206998.Control
- Wang, Z., Colognato, H., French-constant, C., 2007. Contrasting Effects of Mitogenic Growth Factors on Myelination in Neuron – Oligodendrocyte Co-cultures. *Glia* 55, 537–545. doi:10.1002/glia
- Wegner, M., 2008. A Matter of Identity: Transcriptional Control in Oligodendrocytes. *J Mol Neurosci* 35, 3–12. doi:10.1007/s12031-007-9008-8
- White, R., Gonsior, C., Bauer, N.M., Luhmann, H.J., Trotter, J., 2012. Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein (hnRNP) F Is a Novel Component of Oligodendroglial RNA Transport Granules Contributing to Regulation of Myelin Basic Protein. *J. Biol. Chem.* 287, 1742–1754. doi:10.1074/jbc.M111.235010
- White, R., Gonsior, C., Kr, E., St, N., Stefan, H., Trotter, J., 2008. Activation of oligodendroglial Fyn kinase enhances translation of mRNAs transported in hnRNP A2 – dependent RNA granules. *J. Cell Biol.* 181, 579–586. doi:10.1083/jcb.200706164
- White, R., Krämer-Albers, E.-M., 2014. Axon-glia interaction and membrane traffic in myelin formation. *Front. Cell. Neurosci.* 7, 284. doi:10.3389/fncel.2013.00284
- Wood, D.D., Vella, G.J., Moscarello, M.A., 1984. Interaction between human myelin basic protein and lipophilin*. *Neurochem. Res.* 9, 1523–1431.
- Yamamoto, Y., Nishimura, T., Ogawa, Y., Yoshikawa, H., Fujimura, H., Adachis, E., Kishimoto, T., Yanagihara, T., Sakodan, S., 1994. Cloning and Expression of Myelin-associated Oligodendrocytic Basic Protein. *J Biol Chem.* 16, 31725–30.
- Yamamoto, Y., Yoshikawa, H., Nagano, S., Kondoh, G., Sadahiro, S., Gotow, T., 1999. Myelin-associated oligodendrocytic basic protein is essential for normal arrangement of the radial component in central nervous system myelin. *Eur J Neurosci.* 11, 847–855.
- Yeung, M.S.Y., Zdunek, S., Bergmann, O., Bernard, S., Salehpour, M., Alkass, K., Perl, S., Brundin, L., Druid, H., Frise, J., Tisdale, J., 2014. Article Dynamics of Oligodendrocyte Generation and Myelination in the Human Brain. *Cell.* doi:10.1016/j.cell.2014.10.011
- Yin, X., J., P., M., G., Braun, P.E., Trapp, B.D., 1997. CNP overexpression induces aberrant oligodendrocyte membranes and inhibits MBP accumulation and myelin compaction. *J.*

- Neurosci. 50, 238–247.
- Yool, D., Montague, P., McLaughlin M, McCulloch, M.C., Edgar, J.M., Nave, K.-A., Davies, R.W., Griffiths, I.R., Mccallion, A.S., 2002. Phenotypic Analysis of Mice Deficient in the Major Myelin Protein MOBP , and Evidence for a Novel Mobp Isoform. *Glia* 267, 256–267. doi:10.1002/glia.10103
- Yoshikawa, H., 2001. Myelin-associated oligodendrocytic basic protein modulates the arrangement of radial growth of the axon and the radial component of myelin. *Med Electron Microsc.* 34, 160–164.
- Zhang, Y., Chen, K., Sloan, S.A., Bennett, M.L., Scholze, A.R., O’Keeffe, S., Phatnani, H.P., Guarnieri, P., Caneda, C., Ruderisch, N., Deng, S., Liddelow, S.A., Zhang, C., Daneman, R., Maniatis, T., Barres, B.A., Wu, J.Q., 2014. An RNA-Sequencing Transcriptome and Splicing Database of Glia, Neurons, and Vascular Cells of the Cerebral Cortex. *J. Neurosci.* 34, 11929–11947. doi:10.1523/JNEUROSCI.1860-14.2014
- Zhao, X., He, X., Han, X., Yu, Y., Ye, F., Chen, Y., Hoang, T., Xu, X., Li, H., Xin, M., Wang, F., Appel, B., Lu, Q.R., 2010. MicroRNA-mediated control of oligodendrocyte differentiation. *Neuron* 65, 612–626. doi:10.1016/j.neuron.2010.02.018.MicroRNA-Mediated
- Zheng, K., Li, H., Huang, H., Qiu, M., 2012. MicroRNAs and glial cell development. *neuroscientist* 18, 114–118. doi:10.1177/1073858411398322.microRNAs

10 Danksagung

11 Erklärung

11.1 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich eidesstattlich, die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen benutzt zu haben. Alle wörtlichen und sinngemäßen Entlehnungen sind unter genauer Angabe der Quelle kenntlich gemacht.

Mainz, den

Isabelle Schäfer

12 Lebenslauf

12.1 Persönliche Daten

Name:

Anschrift:

E-Mail:

Geburtsdatum:

Geburtsort:

Nationalität:

12.2 Bildungsweg

12.3 Präsentationen

12.4 Auszeichnungen

12.5 Publikationen

Schäfer I., Müller C., Luhmann H., White R.: "Myelin-associated oligodendrocytic basic protein levels are regulated by Fyn kinase and affect the morphological differentiation of oligodendrocytes." J Cell Sci. Doi:10.1242/jcs.172148

Müller C., **Schäfer I.**, Luhmann H., White R.: **"Oligodendroglial Argonaute proteins associate with molecules of the MBP mRNA localization machinery and are downstream targets of Fyn kinase."** Front Cell Neurosci. 2015 9, 1–11

Müller C., Bauer N.M., **Schäfer I.**, White R.: **„Making Myelin basic protein- from mRNA transport to localized translation."** Front Cell Neurosci.2013 Sep 27;7:16