

# **„Translationsregulation des Myelin basischen Proteins in Gliazellen“**

Dissertation  
zur Erlangung des Grades  
Doktor der Naturwissenschaften

am Fachbereich Biologie  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

von

**Nina Hochhaus**

geb. am 02.06.1984 in Bad Kreuznach

Mainz, Oktober 2013





# 1 Inhaltsverzeichnis

1	Inhaltsverzeichnis.....	1
2	Einleitung.....	5
2.1	Das Nervensystem .....	5
2.1.1	Zelltypen des zentralen Nervensystems .....	6
2.1.1.1	Embryonale Herkunft und Differenzierung von Oligodendrozyten .....	8
2.1.1.2	Funktion von Oligodendrozyten.....	11
2.1.1.3	Myelinisierung im ZNS.....	13
2.1.1.4	Myelin basisches Protein (MBP).....	16
2.1.1.5	MBP Synthese als wichtiger Bestandteil der Myelinisierung in Antwort auf axonale Eigenschaften .....	20
2.1.1.6	MBP mRNA Transport und hnRNP A2 Signalweg .....	21
2.1.1.7	Defekte der Myelinbildung im ZNS.....	23
2.1.2	Zelltypen des peripheren Nervensystems.....	27
2.1.2.1	Embryonale Herkunft und Funktion von Schwann-Zellen.....	27
2.1.2.2	Myelin und MBP im PNS.....	29
2.2	Nicht-kodierende RNAs .....	31
2.2.1	MikroRNAs.....	32
2.2.2	Biogenese von miRNAs.....	32
2.2.3	Mechanismen der Genregulation .....	35
2.2.4	MiRNAs in Schwann-Zellen und Oligodendrozyten .....	36
2.3	Zielsetzung.....	39
3	Material und Methoden.....	40
3.1	Geräte, Materialien und Reagenzien.....	40
3.1.1	Geräte.....	40
3.1.2	Materialien .....	41
3.1.3	Reagenzien .....	41
3.2	Lösungen, Puffer und Medien .....	41
3.3	Antikörper.....	43
3.3.1	Primärantikörper .....	43
3.3.2	Sekundärantikörper.....	43

3.4	Plasmide, Primer, LNA-Sonden, 715-Mimic und 715-Inhibitor .....	43
3.5	Zellkultur .....	45
3.5.1	Kultivierung von Oli- <i>neu</i> Zellen .....	45
3.5.2	Präparation und Kultivierung primärer Oligodendrozyten .....	45
3.5.3	Kultivierung der Schwann-Zelllinie IMS32 .....	46
3.5.4	Kultivierung von primären Schwann-Zellen aus der Ratte .....	46
3.6	Autopsie Material .....	46
3.7	Präparation von Ischiasnerven .....	47
3.8	Transfektion .....	47
3.8.1	SncRNA Transfektion in Oli- <i>neu</i> Zellen und primären Oligodendrozyten.....	47
3.8.2	Plasmid Transfektion in Oli- <i>neu</i> und IMS32 Zellen .....	48
3.8.3	Plasmid Kotransfektion in Oli- <i>neu</i> Zellen .....	48
3.8.4	Plasmid Transfektion in primäre Oligodendrozyten .....	48
3.9	Proteinanalyse .....	48
3.9.1	Herstellung von Zelllysaten .....	48
3.9.2	Bestimmung der Proteinkonzentration .....	49
3.9.3	SDS-PAGE.....	49
3.9.4	Western Blot.....	49
3.10	RNA Analyse .....	49
3.10.1	RNA Extraktion .....	49
3.10.2	Reverse Transkription und quantitative Real-Time-PCR.....	50
3.10.2.1	Relative Quantifizierung nach der $\Delta\Delta C_t$ -Methode .....	52
3.10.2.2	Anreicherungsfaktor.....	53
3.10.2.3	Auswertung der qPCR über Agarose-Gelelektrophorese.....	53
3.10.3	Northern Blot .....	53
3.11	Immunzytochemie .....	54
3.12	<i>In-situ</i> -Hybridisierung.....	54
3.12.1	LNA-ELF-FISH zur Detektion der sncRNA-715 .....	55
3.12.2	FISH zur Detektion der MBP mRNA.....	55
3.13	Fluorimetrischer TUNEL Versuch .....	55
3.14	Immunpräzipitation .....	56
3.14.1	Immunpräzipitation aus Oli- <i>neu</i> Zellen.....	56

3.14.2	Immunpräzipitation aus primären Schwann-Zellen.....	56
3.15	Ziel gerichtete Mutagenese .....	57
3.15.1	Plasmid-Präparation aus XL10-Gold (Mini-/ Midi-Präparation).....	58
3.16	Luziferase Versuch .....	58
4	Ergebnisse .....	59
4.1	Vorhergesagte sncRNA-715 (miR-715) Bindestellen in der MBP 3'UTR .....	59
4.2	Rolle der sncRNA-715 im zentralen Nervensystem.....	61
4.2.1	Endogene sncRNA-715 Expression in Oligodendrozyten.....	61
4.2.2	Effizienz der sncRNA-715 Transfektion .....	63
4.2.3	SncRNA-715 Expression und MBP Protein Synthese in Oligodendrozyten .....	65
4.2.4	Effekt der sncRNA-715 auf die Translation des MBP Proteins.....	68
4.2.5	SncRNA-715 beeinflusst die Morphologie und reduziert die Zellzahl .....	74
4.2.6	Lokalisation der sncRNA-715 in Oligodendrozyten.....	78
4.2.7	Nachweis der sncRNA-715 und MBP mRNA in hnRNP-A2 Granulen .....	79
4.2.8	SncRNA-715 Expression in chronischen MS Läsionen.....	81
4.3	Rolle der sncRNA-715 in peripheren Nervensystem .....	85
4.3.1	Expression von sncRNA-715, MBP mRNA und hnRNP A2 in Schwann-Zellen ...	85
4.3.2	SncRNA-715 Expression und MBP Protein Synthese in Schwann-Zellen.....	88
4.3.3	Assoziation von hnRNP A2 und sncRNA-715 in Schwann-Zellen .....	91
5	Diskussion.....	92
5.1	SncRNA-715 .....	92
5.1.1	Expression von sncRNA-715 .....	92
5.1.2	SncRNA-715 hat eine konservierte Bindestelle in der MBP 3'UTR.....	93
5.1.3	Wie wird sncRNA-715 prozessiert und reguliert?.....	94
5.2	Bedeutung der sncRNA-715 für Oligodendrozyten.....	99
5.2.1	SncRNA-715 reguliert die Translation der MBP mRNA im A2-Transportweg....	99
5.2.2	SncRNA-715 ist in zytoplasmatischen granulären Strukturen lokalisiert.....	101
5.2.3	SncRNA-715 beeinflusst die Morphologie primärer Oligodendrozyten und erhöhte Mengen induzieren Apoptose .....	103
5.2.4	Potentielle Ziel-mRNAs.....	103
5.2.5	Bedeutung der sncRNA-715 in Multiple Sklerose .....	104
5.3	Bedeutung der sncRNA-715 für Schwann-Zellen .....	107

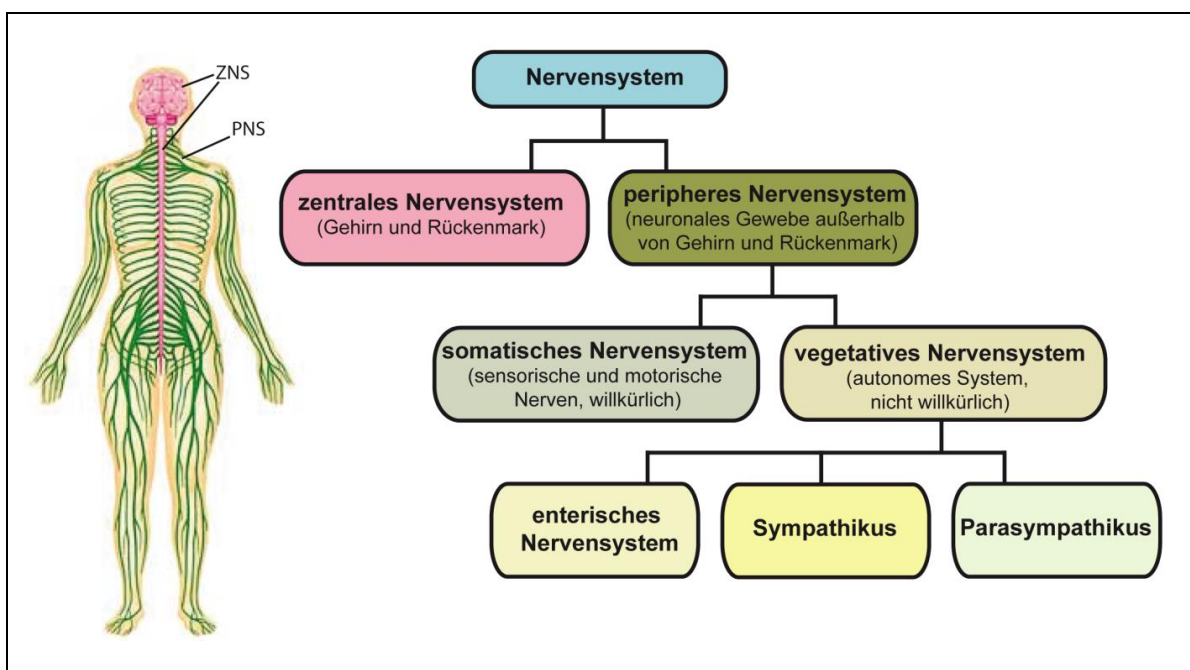
5.4	Ausblick.....	108
6	Zusammenfassung.....	111
7	Summary .....	113
8	Abkürzungen .....	114
9	Referenzen .....	115

## 2 Einleitung

### 2.1 Das Nervensystem

Das Nervensystem ermöglicht die Kommunikation des Organismus mit der Umwelt und steuert alle lebenswichtigen Vorgänge im Körper und stimmt sie aufeinander ab. Es umfasst alle Neuronen und Gliazellen und gliedert sich in das zentrale (ZNS) und das periphere Nervensystem (PNS) (Abbildung 1). Zu dem ZNS zählen das Gehirn und das Rückenmark. Es koordiniert die Funktion der inneren Organe und der Skelettmuskulatur und ist unterteilt in die weiße und graue Substanz. Die graue Substanz enthält Zellkörper von Neuronen, die weiße Substanz umfasst die Gesamtheit der Nervenzellfortsätze (Abbildung 2).

Alle neuronalen Gewebe, die nicht dem ZNS angehören, werden dem PNS zugeordnet. Das PNS leitet Informationen von den Sinnesorganen an das ZNS weiter und empfängt wiederum Informationen über die Koordination von Körperfunktionen und Bewegung vom ZNS. Entsprechend seiner Funktion, wird das PNS weiterhin in das somatische und das vegetative Nervensystem unterteilt. Während das somatische Nervensystem bewusst Reize wahrnimmt und Bewegungen steuern kann, entzieht sich das vegetative Nervensystem der unmittelbaren Kontrolle und wird daher als autonomes Nervensystem bezeichnet. Das vegetative Nervensystem teilt sich weiter in drei Subtypen: Sympathikus, Parasympathikus und enterisches Nervensystem.



**Abbildung 1: Der Aufbau des Nervensystems**

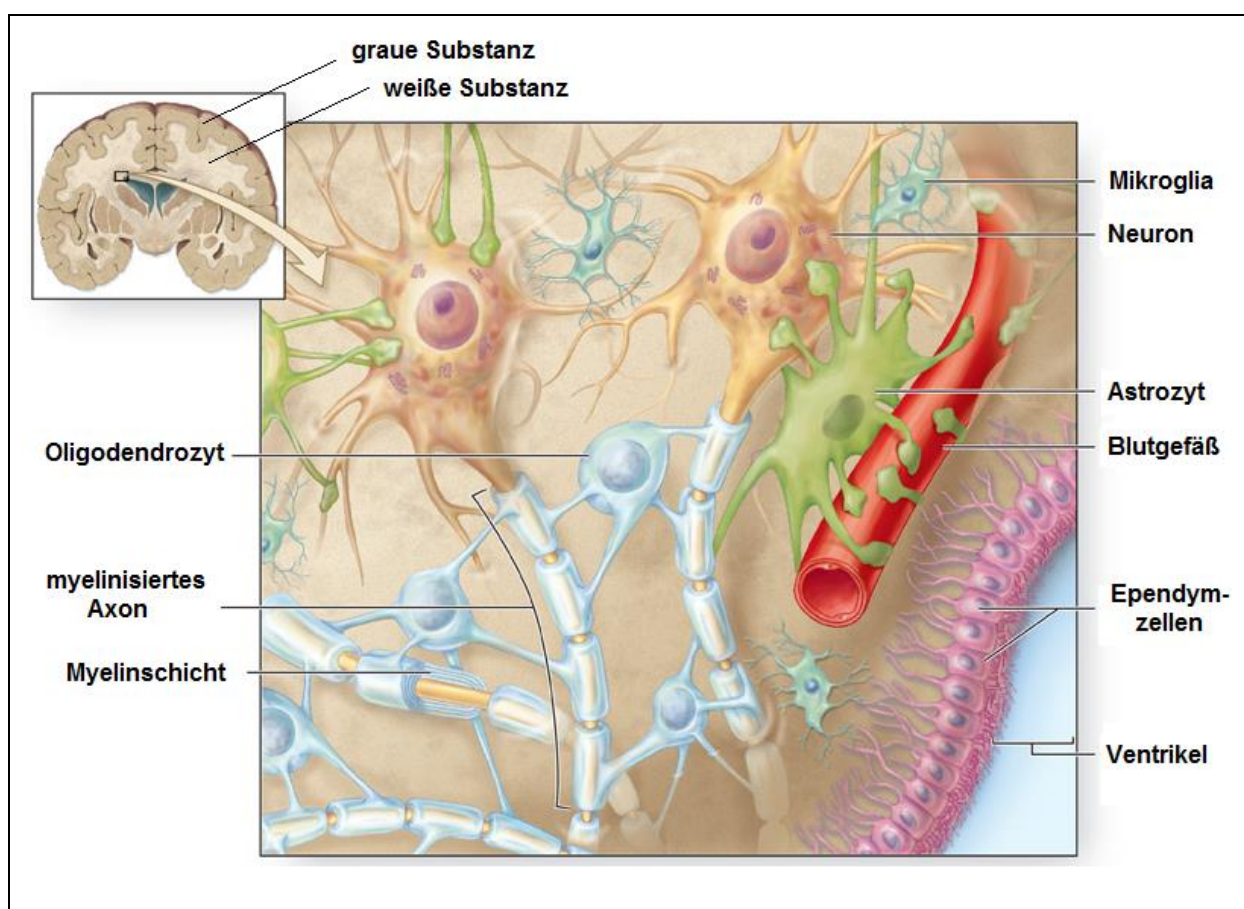
Schematisch dargestellt ist der Aufbau des Nervensystems von Vertebraten.

(Modifiziert nach: [http://195.186.85.46/media/LTH/KOERPER/nerven\\_zentral\\_1.html](http://195.186.85.46/media/LTH/KOERPER/nerven_zentral_1.html))



### 2.1.1 Zelltypen des zentralen Nervensystems

Das zentrale Nervensystem setzt sich hauptsächlich aus Neuronen und Gliazellen zusammen (Abbildung 2). Neurone sind elektrisch erregbare Zellen, die Informationen über weite Strecken entlang eines gerichteten Membranpotentials transportieren können. Es gibt viele unterschiedliche Arten von Neuronen, die Spezialisierungen in Form und Funktion entwickelt haben. Der Aufbau einer Nervenzelle hingegen bleibt immer sehr ähnlich (Abbildung 2 braun dargestellt). Jedes Neuron besitzt zwei verschiedene Arten von Fortsätzen, welche dem Zellkörper (Soma) entspringen. Die verästelten Dendriten empfangen ankommende Signale von anderen Zellen und leiten sie zum Zellkörper weiter. Über die Axone können diese Impulse an Zielzellen weiter übertragen werden. Hierbei hängt die Geschwindigkeit, mit der sich das Signal am Axon entlang fortbewegt, vom Durchmesser des Axons ab. Je dicker das Axon, desto schneller die Leitungsgeschwindigkeit (Hartline & Colman, 2007).



**Abbildung 2: Zusammenspiel der Zelltypen im ZNS**

Das ZNS besteht aus Neuronen (braun) und Gliazellen. Gliazellen werden in Mikroglia (türkis), Astrozyten (grün) und Oligodendrozyten (blau) unterteilt. Neurone bilden die funktionelle Einheit des Gehirns und arbeiten eng mit Gliazellen zusammen. Durch ihre Nähe zueinander beeinflussen Gliazellen die Plastizität von Synapsen, versorgen Neurone mit Nährstoffen und regulieren das neuronale Umgebungsmilieu. Oligodendrozyten können Axone mit einer Myelinmembran isolieren und somit die Leitungsgeschwindigkeit elektrischer Signale erhöhen.

(Modifiziert nach: [http://academic.kellogg.edu/herbrandsonc/bio201\\_mckinley/f14-6\\_cellular\\_organiza\\_c.jpg](http://academic.kellogg.edu/herbrandsonc/bio201_mckinley/f14-6_cellular_organiza_c.jpg))

Interessanterweise wurde in der Literatur jahrelang postuliert, dass das menschliche Gehirn 100 Milliarden Neurone und zehnmal so viele Gliazellen umfasst. Allerdings wurde nie eine Quelle für die Herkunft dieser Zahlen angegeben. Neueren Analysen zufolge gibt es in einem 1,5 kg schweren menschlichen Gehirn rund 86 Milliarden Neurone und mit 85 Milliarden fast genauso viele Gliazellen (Azevedo et al., 2009; Herculano-Houzel, 2009). Innerhalb der bisher analysierten Primaten konnte dieses 1:1 Verhältnis von Neuronen und Gliazellen im Gehirn bestätigt werden (Azevedo et al., 2009).

Als Entdecker der Gliazellen zählt Rudolf Virchow. 1856 beschrieb der deutsche Pathologe Zellen, die sich morphologisch von den Nervenzellen unterschieden. Er hielt sie für eine Art stützendes Bindegewebe und bezeichnete sie dementsprechend als „Glia“, griechisch für „Leim“. Anfangs nahm man an, dass es sich bei den Gliazellen um einen Zelltypen handelt, der lediglich als verklebende und stützende Einheit zwischen den Nervenzellen fungiert und dem Informationsaustausch von Neuronen nur passiv beiwohnt. Allerdings wird immer deutlicher, dass Gliazellen und Neurone eng zusammen arbeiten und Gliazellen essenziell für die Funktion des Gehirns sind. Neben der reinen Stützfunktion und der Versorgung der Nervenzellen mit Nährstoffen, sowie der Bereitstellung des richtigen Umgebungsmilieus, sind Gliazellen an der Isolation der Axone beteiligt und ermöglichen dadurch eine schnelle Informationsweiterleitung (Lee & Fields, 2009). Die Interaktion zwischen Gliazellen und Neuronen ist sehr vielfältig und erfolgt über Neurotransmitter, Ionenströme, Zelladhäsionsmoleküle und spezialisierte Signalmoleküle (Fields & Stevens-Graham, 2002). Auch Gliazellen kommunizieren untereinander innerhalb eines Netzwerkes. Der Physiologe Stephen Smith entdeckte als Erster eher zufällig, dass Astrozyten Kalzium-Ionen freisetzen können und dass sich diese Kalziumwellen über Gap Junctions von einer Gliazelle zur anderen ausbreiten können (Cornell-Bell et al., 1988; Nedergaard et al., 2010).

Gliazellen werden aufgrund ihrer Größe in Mikro- und Makroglia unterteilt (Lee et al., 2001) und werden während des gesamten Lebens gebildet. Während Makroglia, wie Neurone, aus dem Ektoderm abstammen, sind Mikroglia mesodermalen Ursprungs (Allen & Barres, 2009). Makroglia werden weiter in Astrozyten, Ependymzellen und Oligodendrozyten unterteilt.

Mikroglia (in Abbildung 2 türkis dargestellt) sind in Anlehnung an das Immunsystem die Makrophagen des Gehirns und repräsentieren das endogene Verteidigungs- und Immunsystem. Sie machen etwa 10 bis 20% der Gliazellpopulation aus (Soulet & Rivest, 2008). Während der embryonalen Entwicklung wandern Mikroglia aus dem Knochenmark in das ZNS ein. Über ihre Zellfortsätze durchsuchen sie ihre Umgebung und beseitigen dort apoptotische Neurone und Gliazellen durch Phagozytose. Darüber hinaus eliminieren sie unpassende synaptische Verbindungen, um effektive Kontakte zwischen Neuronen zu stärken (Paolicelli et al., 2011). Durch die Freisetzung von Wachstumsfaktoren und Zytokinen sind Mikroglia an der Reparatur von Hirnschäden beteiligt. Nach molekularer Aktivierung (z.B. nach einem Schädeltrauma oder einer Erkrankung wie Multiple Sklerose), können Mikroglia Antigene präsentieren und durch die Interaktion mit T-Lymphozyten schließlich die Immunantwort des Gehirns vermitteln.

Astrozyten (in Abbildung 2 grün dargestellt) machen etwa ein Drittel der Gehirnmasse aus und stellen damit den größten Teil der Gliazellen im Gehirn dar. Aufgrund ihres

sternförmigen Aussehens erhalten sie ihren Namen. Sie erfüllen wichtige Aufgaben in der Versorgung der Neurone mit Nährstoffen und Stoffwechselprodukten, regulieren extrazelluläre Ionenkonzentrationen und entfernen überschüssige Neurotransmitter aus dem synaptischen Spalt (Miller, 2002). Darüber hinaus sind Astrozyten am Aufbau der Blut-Hirn-Schranke beteiligt (Ballabh et al., 2004) und kontrollieren die Bildung und Stabilität von Synapsen (Araque & Navarrete, 2010; Ullian et al., 2001). Wie bereits beschrieben, sind Astrozyten über Gap Junctions miteinander verbunden und bilden ein funktionelles Synzytium (Brightman & Reese, 1969), indem sie in Form von Kalziumwellen kommunizieren können. Daher wird vermutet, dass Astrozyten aktiv an der Informationsverarbeitung im Gehirn beteiligt sind.

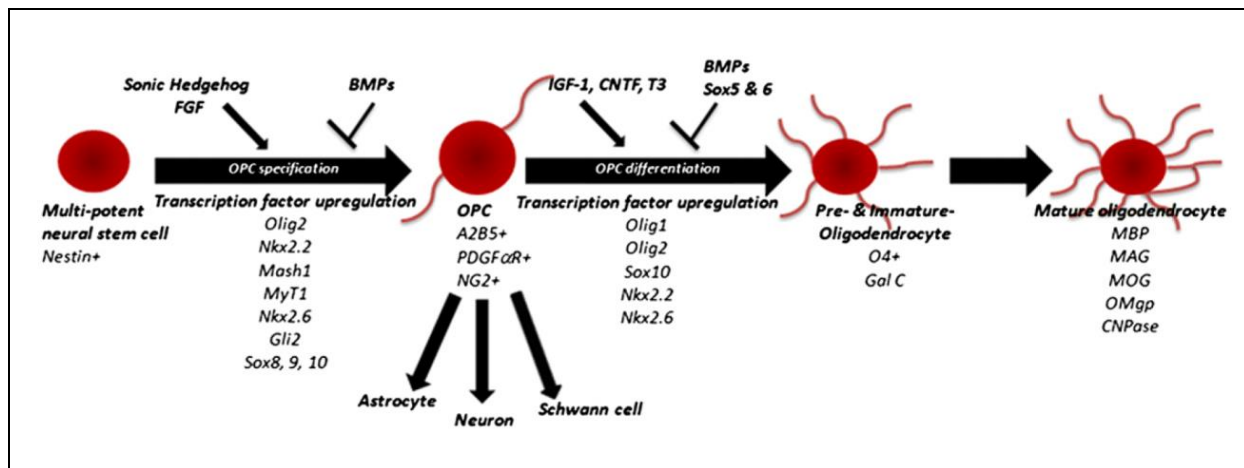
Ependymzellen kleiden die Wände der Hirnventrikel aus und trennen die Hirnflüssigkeit (Liquor) vom Hirngewebe. Außerdem scheinen Ependymzellen an der Bewegung und Bildung des Liquors beteiligt zu sein.

Da sich diese Arbeit hauptsächlich mit dem letzten Gliazelltyp, den Oligodendrozyten (in Abbildung 2 blau dargestellt) beschäftigt, werden diese in den folgenden Abschnitten näher beschrieben.

### **2.1.1.1 Embryonale Herkunft und Differenzierung von Oligodendrozyten**

Während der Entwicklung des ZNS entstehen die Oligodendrozyten aus Vorläuferzellen (*oligodendrocyte precursor cells*, OPCs), welche sich aus den Neuroepithelzellen des Neuralrohrs entwickeln. Während der embryonalen Entwicklung wandern die proliferierenden Vorläuferzellen aus den ventralen und dorsalen Bereichen des Gehirns und des Rückenmarks in die weiße Substanz des Gehirns ein und differenzieren dort zu reifen Myelin-bildenden Oligodendrozyten (Richardson et al., 2006). Einige OPCs differenzieren nicht und verbleiben als adulte OPCs in der subventrikulären Zone (SVZ). Dort stellen sie vermutlich ein Reservoir für Zellen dar, welche die Remyelinisierung initiieren können (Chang et al., 2000; Franklin & Ffrench-Constant, 2008). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass es in der SVZ verschiedene Stammzellpopulationen gibt, die entweder nur Neurone und Astrozyten, oder Oligodendrozyten und Astrozyten hervorbringen können. Dabei stimuliert der *Wnt*-Signalweg selektiv die Proliferation der OPCs *in vivo* (Ortega et al, 2013).

Der Übergang von proliferierenden Vorläuferzellen, zu differenzierten Oligodendrozyten und schließlich zu reifen, Myelin-produzierenden Oligodendrozyten ist zeitlich und räumlich strikt reguliert und wird durch eine ganze Reihe von Faktoren kontrolliert, die sowohl von Astrozyten als auch von Neuronen freigesetzt werden (Simons & Trajkovic, 2006). Neben diesen extrinsischen Faktoren spielen aber auch intrinsische Faktoren eine Rolle (Zuchero & Barres, 2013). Die Entwicklung von einer migrierenden, proliferierenden, unreifen Vorläuferzelle bis hin zum reifen, postmitotischen, myelinisierenden Oligodendrozyten ist in Abbildung 3 dargestellt.



**Abbildung 3: Entwicklungs- und Differenzierungsstadien von Oligodendrozyten**

Die Bildung von Oligodendrozyten beginnt mit einer multipotenten neuronalen Stammzelle. Der Übergang zur migrierenden und proliferierenden Vorläuferzelle und schließlich zum reifen, Myelinproduzierenden Oligodendrozyten wird durch unterschiedliche Signalwege und Transkriptionsfaktoren reguliert (Miron et al., 2011).

Die Bildung der OPCs beginnt mit einer multipotenten neuronalen Stammzelle und ist von vielen Signalmolekülen und Transkriptionsfaktoren abhängig. So werden im Neuralrohr die Morphogene *Sonic hedgehog* (Shh) und *Bone morphogenetic proteins* (BMPs) in einem dorso-ventralen Gradienten gebildet, wobei Shh die Bildung von OPCs stimuliert und BMP antagonistisch auf die Shh-induzierten Effekte wirkt. OPCs sind das früheste experimentell untersuchte Stadium der Oligodendrozytenentwicklung und sind positiv für das Zelloberflächenantigen A2B5, den Wachstumsfaktor-Rezeptor PDGFR $\alpha$  und das Proteoglycan NG2. Diese Vorläuferzellen proliferieren in Reaktion auf die Wachstumsfaktoren FGF (*Fibroblast Growth Factor*) und PDGF (*Platelet-derived growth factor*) und können in Astrozyten, Neurone, Schwann-Zellen und Oligodendrozyten differenzieren. Es ist bekannt, dass NG2<sup>+</sup>-Zellen die elektrische Aktivität von Axonen mit ihren Glutamat-Rezeptoren detektieren können und an der Aufrechterhaltung synaptischer Kontakte von Neuronen beteiligt sind (He & Lu, 2013; Trotter et al., 2010). Weiterhin stimuliert Glutamat die Proliferation (Gallo et al., 1996) und die Migration (Gudz et al., 2006) von OPCs. Darüber hinaus kontrollieren elektrisch aktive Axone die Myelinisierung (Wake et al., 2011).

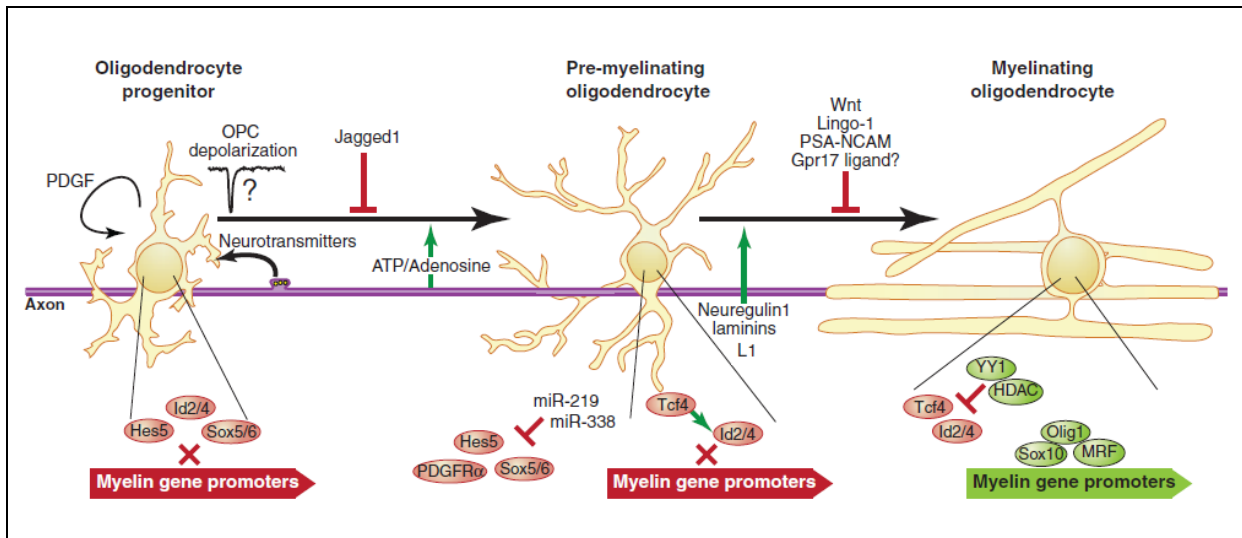
Die Entwicklung zum unreifen Oligodendrozyten ist abhängig von dem Wachstumsfaktor IGF-1 (*Insulin-like growth factor 1*), dem Cytokin CNTF (*Ciliary Neurotrophic Factor*) und dem Thyroidhormon T3 und wird durch die Transkriptionsfaktoren *Olig1*, *Olig2*, *Sox10*, *Nkx2.2* und *Nkx2.6* induziert (Miron et al., 2011). BMPs und die Transkriptionsfaktoren *Sox5* und *Sox6* wirken hingegen inhibierend. Die gebildeten unreifen Oligodendrozyten verlieren ihre migratorische Aktivität und sind positiv für das Zelloberflächen-Antigen O4 und das Galactocerebroside GalC.

Der reife Oligodendrozyt zeichnet sich durch die Expression von Myelinproteinen wie dem Myelin basischen Protein (MBP), dem Myelin-assoziierten Glykoprotein (MAG) und Myelin-Oligodendrozyten Glykoprotein (MOG) aus (Miron et al., 2011).

Um eine ausreichende Myelinisierung des ZNS sicherzustellen, werden Oligodendrozyten im Laufe der Entwicklung im Überschuss gebildet. Zu einem späteren Zeitpunkt werden die überflüssigen Oligodendrozyten durch Apoptose wieder eliminiert. Dadurch kann die genaue Anzahl der Oligodendrozyten auf die Anzahl der Axone angeglichen werden (Barres & Raff, 1994). Im optischen Nerv sterben etwa die Hälfte der Oligodendrozyten durch Apoptose aufgrund limitierender Wachstumsfaktoren (Barres et al., 1992). Das Überleben von Oligodendrozyten scheint aber auch von der elektrischen Aktivität der Neurone abhängig zu sein (Barres & Raff, 1993). So sterben Oligodendrozyten innerhalb weniger Tage, wenn sie nicht auf ein unmyelinisiertes Axon treffen (Raff et al., 1993). Hierbei spielt die Freisetzung von ATP (Adenosintriphosphat) während der axonalen Reizweiterleitung eine wichtige Rolle. ATP induziert die Freisetzung des myelinstimulierenden Zytokins LIF (Leukämie-induzierter Faktor) aus Astrozyten, welches wiederum die Differenzierung von Oligodendrozyten und schließlich die Myelinisierung fördert (Ishibashi et al., 2006). Allgemein können auch Neurotransmitter die Bildung von Myelin fördern. Die Freisetzung von Glutamat aus synaptischen Vesikeln entlang des Axons stimuliert die Bildung von Cholesterin-reichen Mikrodomänen zwischen Axon und Oligodendrozyt. Dadurch wird die Fyn-abhängige lokale Synthese eines der wichtigsten Myelinproteine MBP gesteigert und somit die Myelinisierung gefördert (Wake et al., 2011).

Das Überleben der Oligodendrozyten und die Myelinisierung der Axone hängen von weiteren Signalmolekülen ab und erfordern meist eine enge Kommunikation zwischen dem Oligodendrozyten und dem Neuron. Interessanterweise wirken einige axonal exprimierte Liganden, wie z.B. Jagged, PSA-NCAM und LINGO-1 inhibierend auf die Differenzierung von Oligodendrozyten und die Myelinisierung (Emery, 2010). Das axonale Oberflächenmolekül L1-CAM, sowie das extrazelluläre Matrixprotein Laminin2 und Proteine der Neuregulin Familie hingegen fördern die axonale Myelinisierung. Dabei spielt die Aktivierung der oligodendroglialen Fyn Kinase eine entscheidende Rolle. Die Aktivierung kann durch die Bindung von neuronalem L1-CAM an oligodendrogliales F3/Contactin erfolgen (White et al. 2008, Laursen et al., 2009). Wake und Kollegen konnten zeigen, dass die elektrische Stimulierung die Phosphorylierung von Fyn fördert und die Expression von L1 erhöht (Wake et al., 2011).

Zu den intrinsischen Faktoren zählen die Transkriptionsfaktoren, wie z.B. Olig1 und Sox10, der *Myelin Gene Regulatory Factor* (MRF) und mikroRNAs (miRNA). Durch die gezielte Inhibierung des Enzyms Dicer, welches an der Prozessierung reifer miRNAs beteiligt ist, konnte gezeigt werden, dass miRNAs in verschiedene Entwicklungsstadien der Oligodendrozytendifferenzierung eingreifen (Dugas & Notterpek, 2011; Dugas et al., 2010; Shin et al., 2009; Zhao et al., 2010). Im Jahr 2010 konnten Budde und Kollegen zeigen, dass das miR-17-92 Cluster in Oligodendrozyten angereichert ist und die Proliferation von Oligodendrozyten fördert (Budde et al., 2010) (siehe Abschnitt 2.1). In Abbildung 4 ist der Einfluss von intrinsischen und extrinsischen Faktoren auf die Differenzierung von Oligodendrozyten und die Myelinisierung von Axonen veranschaulicht.

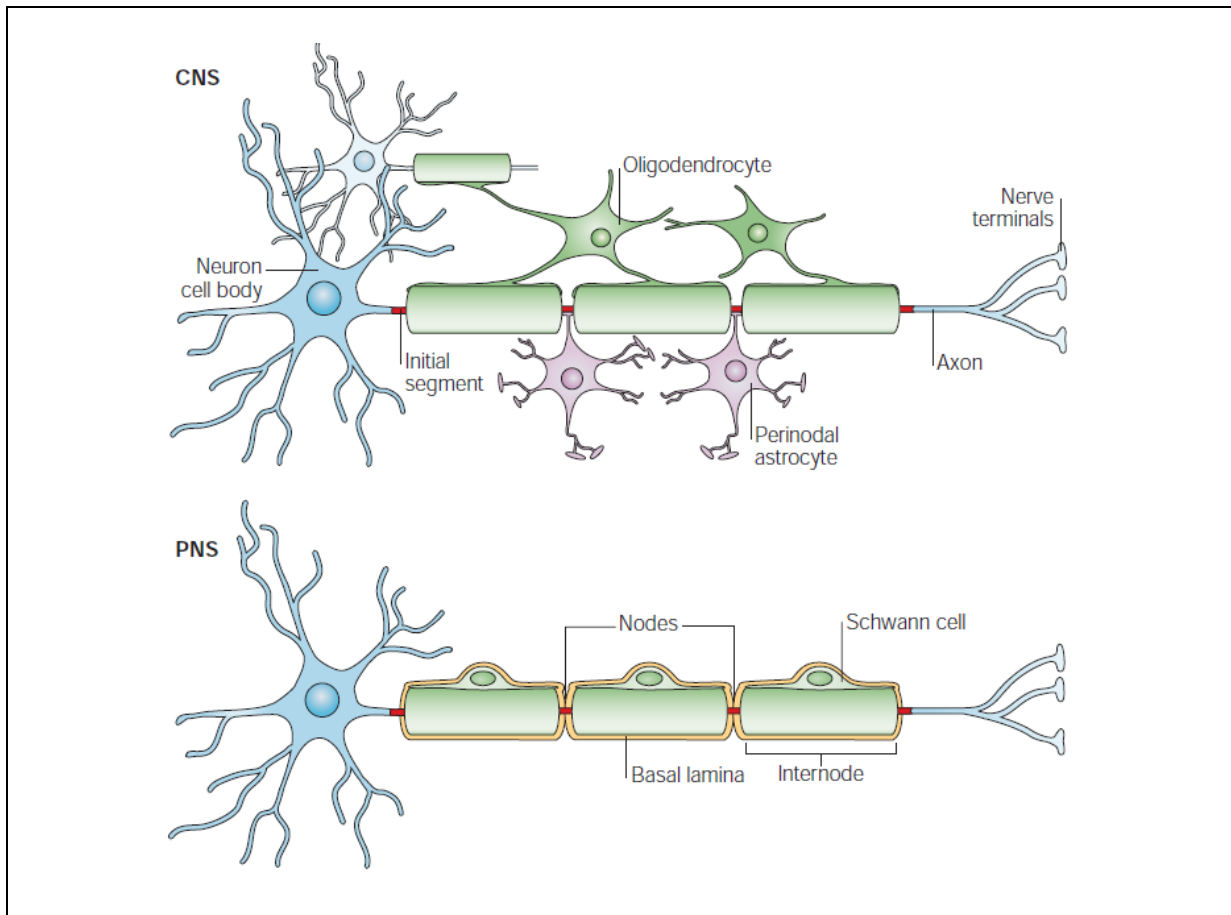


**Abbildung 4: Einfluss von intrinsischen und extrinsischen Faktoren auf die Differenzierung von Oligodendrozyten und die Myelinisierung von Axonen**

Die Myelinisierung und die Differenzierung von Oligodendrozyten hängt von positiven und negativen Modulatoren ab, wie z.B. der elektrischen Aktivität des Axons, der Expression von Adhäsionsmolekülen und Transkriptionsfaktoren, sowie der posttranskriptionellen Genregulation durch miRNAs (modifiziert nach Emery, 2010).

### 2.1.1.2 Funktion von Oligodendrozyten

Oligodendrozyten sind für die elektrische Isolation neuronaler Axone notwendig. Sie umhüllen mit ihren Fortsätzen segmentartig mehrfach bis zu 100 axonale Segmente und bilden durch Zurückziehen des Zytoplasmas die Myelinschicht. Im Gegensatz dazu können die myelinisierenden Zellen im PNS, die Schwann-Zellen, nur ein axonales Segment ummanteln (Abbildung 5).



**Abbildung 5: Myelinisierung von Axonen im ZNS und PNS**

Im zentralen Nervensystem (ZNS) werden Axone von Oligodendrozyten myelinisiert. Ein einziger Oligodendrozyt ist dabei in der Lage, mehrere axonale Segmente zu ummanteln. Eine Schwann-Zelle im PNS hingegen umhüllt nur einen Teilabschnitt eines Axons, wobei das Soma der Zelle eng mit der Myelinmembran assoziiert ist (Poliak & Peles, 2003).

Neuere Erkenntnisse deuten darauf hin, dass Oligodendrozyten nicht nur die Weiterleitung von elektrischen Impulsen erhöhen, sondern durch den engen Kontakt mit dem Axon trophische Faktoren dem Neuron zur Verfügung stellen können. Dies ist besonders wichtig, da die Myelinschicht die Axone von der Verfügbarkeit extrazellulärer Metabolite abschirmt. Dieser „gliale Support“ scheint vor allem bei langen Axonen eine Rolle zu spielen, da der Nährstofftransport zu den distalen Bereichen des Axons sehr energieaufwendig ist. Die Bereitstellung von energiereichen Metaboliten, z.B. aus der Glykolyse des Oligodendrozyten, scheint somit essenziell für das Überleben und die Funktionalität der signalleitenden Axone zu sein (Nave & Trapp, 2008; Nave, 2010a). Darüber hinaus scheinen Oligodendrozyten neuroprotektive Eigenschaften zu besitzen. In Knockout-Mausmodellen konnte beobachtet werden, dass die gezielte Ausschaltung der Myelinproteine CNP und PLP die Morphologie der Myelinschicht kaum beeinflusst, aber eine axonale Degeneration zur Folge hat (Griffiths, 1998; Lappe-Siefke et al., 2003). Ferner sind oligodendrogliale Peroxisomen nicht nur lebensnotwendig für Oligodendrozyten, sondern auch für Neurone. Das Fehlen dieser Organellen in Oligodendrozyten führt im Mausmodell innerhalb weniger Monate zu

degenerierten Axonen und entzündlichen Demyelinisierungen (Kassmann et al., 2007). Die molekularen Mechanismen des neuroprotektiven Signalwegs sind bisher nicht eindeutig erforscht. Bekannt ist, dass Oligodendrozyten und Neurone über Exosomen kommunizieren (Frühbeis et al., 2012). Exosomen sind endosomal-abgeleitete Mikrovesikel, die den Transfer von Proteinen, RNAs und miRNAs von einer Zelle zur anderen ermöglichen. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass die Ausschüttung oligodendroglialer Exosomen von der elektrischen Aktivität der Neurone abhängt. Diese Exosomen können von Neuronen aufgenommen werden und die übertragenen Moleküle sind in den Zielzellen aktiv (Frühbeis et al., 2013). Die Protein-Zusammensetzung dieser Exosomen wurde zuvor identifiziert (Krämer-Albers et al., 2007). Demnach könnten Exosomen beim axo-glialen Transfer neuroprotektiver Moleküle eine Rolle spielen. Kürzlich konnten Fünfschilling und Kollegen erstmals zeigen, dass Oligodendrozyten und Axone metabolisch in Verbindung stehen und dass Oligodendrozyten den Neuronen Laktat zur Verfügung stellen (Fünfschilling et al., 2012). Allerdings sind Oligodendrozyten auch auf die Unterstützung von anderen Zelltypen angewiesen. Wie bereits in 2.1.1.1 erwähnt, sind die Proliferation und die Migration von OPCs, sowie die Differenzierung zu myelinisierenden Oligodendrozyten, zeitlich und räumlich streng reguliert (Baumann & Pham-Dinh, 2001) und wird durch die Ausschüttung verschiedener Wachstumsfaktoren und trophischer Faktoren von Neuronen und Astrozyten kontrolliert (Simons & Trajkovic, 2006).

### 2.1.1.3 Myelinisierung im ZNS

Während der Myelinisierung kontaktieren Oligodendrozyten axonale Bereiche, die myelinisiert werden sollen. Dabei ermöglichen Zelladhäsionsmoleküle, wie z.B. NCAM (neurales Zelladhäsionsmolekül), F3/Contactin, MAG und der Notch Rezeptor die Zellerkennung (Hu et al., 2003; Popko, 2003).

Interessanterweise werden nicht alle Axone von Myelin umhüllt. Es ist bekannt, dass das Zelladhäsionsmolekül L1 auf unmyelinisierten Axonen exprimiert und im Zuge der Myelinisierung herunter reguliert wird (Barbin et al., 2004). Demnach könnte L1 dafür verantwortlich sein, ob ein Axon myelinisiert wird und wie dick die Myelinmembran sein wird. Allerdings konnten im ZNS bisher keine lokalen Signale zwischen Oligodendrozyten und Axonen identifiziert werden, die *in vivo* essentiell für die Myelinisierung sind. Es wird aber davon ausgegangen, dass positive und negative Signale existieren, welche die Myelinisierung von Axonen mit kleinen Durchmessern beeinflussen (Simons & Lyons, 2013). Lee und Kollegen konnten kürzlich in einem Kokultursystem von Oligodendrozyten mit Polystyrol-Nanofasern erstmals zeigen, dass allein der Durchmesser der Fasern die Myelinisierung initiiert (Lee et al., 2013; Lee et al., 2012). Nach diesem Modell werden nur Axone mit einem großen Durchmesser (<200 nm Axone *in vivo*, oder < 400 nm Nanofasern *in vitro*) myelinisiert.

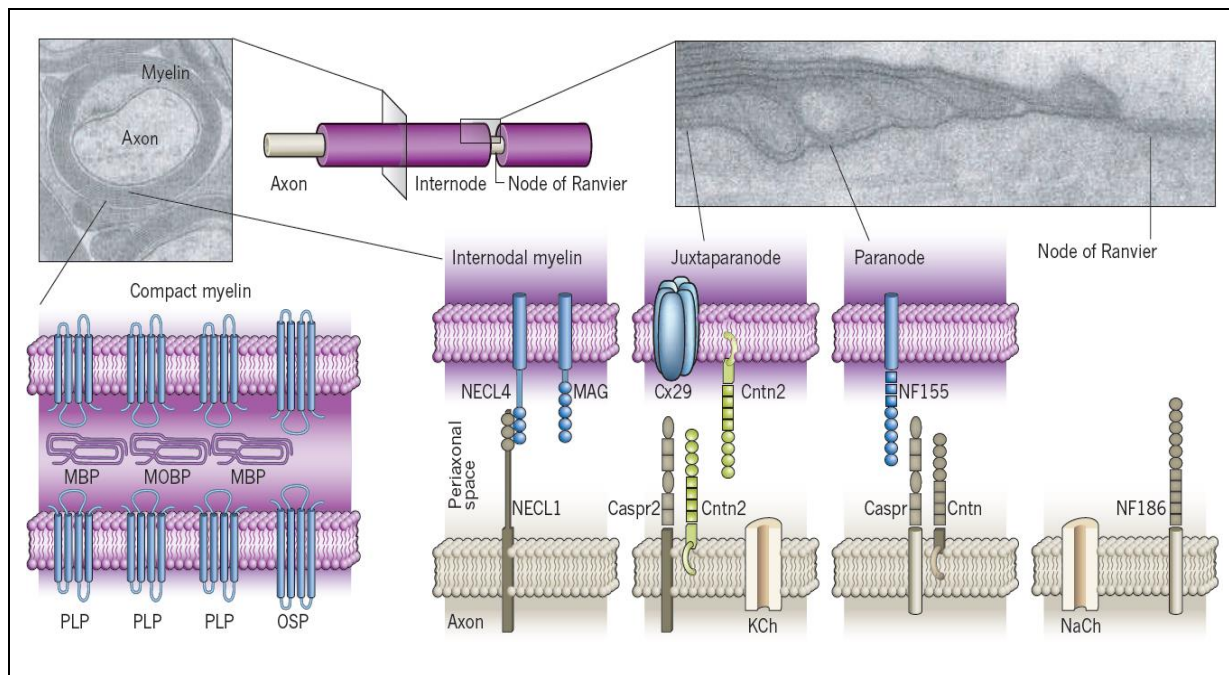
Im ZNS werden nur Axone über 0,2 µm und im PNS über 1 µm myelinisiert (Sherman & Brophy, 2005). Auch die Dicke der Myelinschicht hängt vom Durchmesser des Axons ab. Nur wenn der Durchmesser des Axons und die Dicke der Myelinschicht aufeinander abgestimmt sind, kann eine optimale Leitungsgeschwindigkeit erreicht werden. Die G-Ratio (Quotient aus



Axondurchmesser und Gesamtdurchmesser des myelinisierten Axons) beträgt im ZNS ungefähr 0,77 und im PNS 0,6 (Chomiak & Hu, 2009). Interessanterweise myelinisiert ein Oligodendrozyt seine verschiedenen axonalen Bereiche innerhalb von 8 bis 12 Stunden (Barres, 2008).

Nachdem ein Oligodendrozyt das Axon mehrfach umwickelt hat, kommt es zum Rückzug des Zytoplasmas aus dem Fortsatz. Dadurch wird das Myelin kompaktiert und die zwei gegenüberliegende Membranen verschmelzen auf der zytoplasmatischen Seite hin zur *Major Dense Line*, welche in elektronenmikroskopischen Aufnahmen elektronenreich und damit dunkel erscheint. Die *Intraperiod Line* wird durch die gegenüberliegenden extrazellulären Membranen gebildet und erscheint heller, wodurch ein typisches Bandenmuster entsteht (Abbildung 6).

Die myelinisierten Bereiche des Axons (Internodien) werden in regelmäßigen Abständen von unmyelinisierten Abschnitten (Nodien), den Ranvier'schen Schnürringen, unterbrochen (Abbildung 6). Ausschließlich in diesen Nodien wird das freiliegende Axon depolarisiert und der elektrische Impuls kann von Schnürring zu Schnürring springen (Poliak & Peles, 2003). Durch die elektrische Isolation und die saltatorische Erregungsleitung wird unter geringem Energie- und Platzaufwand die Leitungsgeschwindigkeit im Axon gegenüber der kontinuierlichen Erregungsleitung stark erhöht. Die Bildung der Myelinschicht war evolutionsgeschichtlich essenziell für die Entwicklung komplexer Nervensysteme, da dadurch der axonale Widerstand und damit der axonale Durchmesser verringert werden konnte.



**Abbildung 6: Struktur der Myelinmembran**

Ein Oligodendrozyt umwickelt mehrfach axonale Segmente. Nach Rückzug des Zytoplasmas aus den Fortsätzen entsteht das kompakte Myelin (oben links). Die myelinisierten Bereiche (Internodien) werden von unmyelinisierten Abschnitten (Nodien oder Ranvier'sche Schnürringe) unterbrochen. Durch die Akkumulation von  $\text{Na}^+$  Kanälen (NaCh) in den Schnürringen und der Akkumulation von  $\text{K}^+$ -Kanälen (KCh) in den Juxtaparanodien wird die schnelle saltatorische Erregungsleitung ermöglicht. Im Paranodium endet die Myelinmembran in Form von Zytoplasma-gefüllten, hintereinanderliegenden Schleifen. Die verschiedenen Regionen entlang des Axons unterscheiden sich durch die Expression verschiedener Zelladhäsionsmoleküle. Caspr, Contactin-assoziiertes Protein; Cntn, Contactin; Cx29, Connexin 29 kDa; KCh,  $\text{K}^+$ -Kanal; NaCh,  $\text{Na}^+$ -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 (Nave, 2010).

Myelin weist im Gegensatz zu anderen Biomembranen einen besonders hohen Lipidanteil (~70 Prozent) und einen geringen Proteinanteil (~30 Prozent) auf (Lazzarini, 2004), wodurch die Membranschicht nicht nur ihre isolierenden Eigenschaften, sondern auch ihre charakteristische weiße Färbung erhält. Die Lipide setzen sich hauptsächlich aus Glykosphingolipiden, Cholesterin und Phospholipiden zusammen. Die Hauptproteine im Myelin sind das Myelin basische Protein (MBP) und das Proteolipid Protein (PLP), sowie dessen Spleißvariante DM20. Weitere Myelinproteine sind das Myelin-associated Oligodendrocytic Basic Protein (MOBP), das Myelin-associated Glycoprotein (MAG), das Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein (MOG) und die 2', 3'- Cyclic Nucleotide 3'-Phosphodiesterase (CNP). Lange Zeit ist man davon ausgegangen, dass MBP (mit 30 Prozent) und PLP (mit 50 Prozent) etwa 80 Prozent aller Myelinproteine ausmachen (Baron & Hoekstra, 2010) und nur wenige Proteine im Myelin präsent sind. Kürzlich konnte jedoch eine weitaus höhere Komplexität des Myelinproteoms aufgedeckt und die Abundanz der

Hauptkomponenten realistischer bestimmt werden (im ZNS 17% PLP und 8% MBP; im PNS 21% PO und 8% MBP) (Jahn et al., 2009; Patzig et al., 2011).

Generell unterscheidet sich das Myelin, welches im PNS von den Schwann-Zellen und im ZNS von den Oligodendrozyten gebildet wird, bezüglich des ontogenetischen Ursprungs (Neuralleiste versus subventrikuläre Zone), der Anzahl der myelinisierten axonalen Segmente pro Gliazelle (1:1 versus 60:1) und den Hauptproteinen (PO versus PLP) (De Monasterio-Schrader et al., 2012).

### 2.1.1.4 Myelin basisches Protein (MBP)

Das Myelin basische Protein (MBP) ist ein peripheres Membranprotein, welches durch seine positive Nettoladung über elektrostatische Bindungen mit negativ geladenen Phospholipiden auf der zytoplasmatischen Seite der Myelinmembran interagiert, und somit die Kompaktierung des Myelins ermöglicht (Wood et al., 1984). Die funktionelle Rolle von MBP wird vor allem an der natürlich vorkommenden Mausmutante *Shiverer* deutlich, welche eine große Deletion im *MBP*-Gen auf Chromosom 18 trägt und kein funktionelles MBP mehr synthetisieren kann. Obwohl MBP ein Strukturprotein im ZNS und PNS darstellt, kommt es nur im ZNS zu einer Beeinträchtigung der Myelinisierung, da im PNS wahrscheinlich andere Myelinproteine wie PO und PMP22 den Defekt kompensieren können (Martini & Schachner, 1997; Rosenbluth, 1980a, 1980b). Im ZNS kann kaum kompaktes Myelin gebildet werden, wodurch die *Major Dense Line* fehlt und die Axone unmyelinisiert bleiben oder nur dünn myelinisiert werden (Privat & Jacque, 1979; Readhead & Hood, 1990). Bereits ab dem zwölften postnatalen Tag entwickeln die mutanten Tiere einen starken Tremor und schließlich vermehrt Krampfanfälle und versterben vorzeitig (Chernoff, 1981). Dieser *Shiverer*-Phänotyp kann durch die Expression eines transgenen *MBP*-Gens (Readhead et al., 1987) oder einer MBP cDNA (Kimura, 1998) teilweise überwunden werden. Eine weitere MBP-Mutante ist die *Long Evans Shaker* Ratte, welche ebenfalls eine Mutation im *MBP*-Gen trägt (Delaney et al., 1995) und auch eine Dysmyelinisierung der Axone zur Folge hat (Carré et al., 2002; Kwiecien et al., 1998). Überraschenderweise haben Mutanten, denen die Myelinproteine PLP oder CNP fehlen, eine relativ normal ausgebildete Myelinstruktur. Diese Tiere entwickeln dafür axonale Schwellungen, was durch die Akkumulation axonaler Organellen an den Nodien hervorgerufen wird, und schließlich zu Degeneration der Axone führt (Griffiths, 1998; Klugmann et al., 1997; Lappe-Siefke et al., 2003). Diese Erkenntnisse weisen darauf hin, dass Oligodendrozyten einen Einfluss auf den axonalen Transport haben (Abschnitt 2.1.1.2).

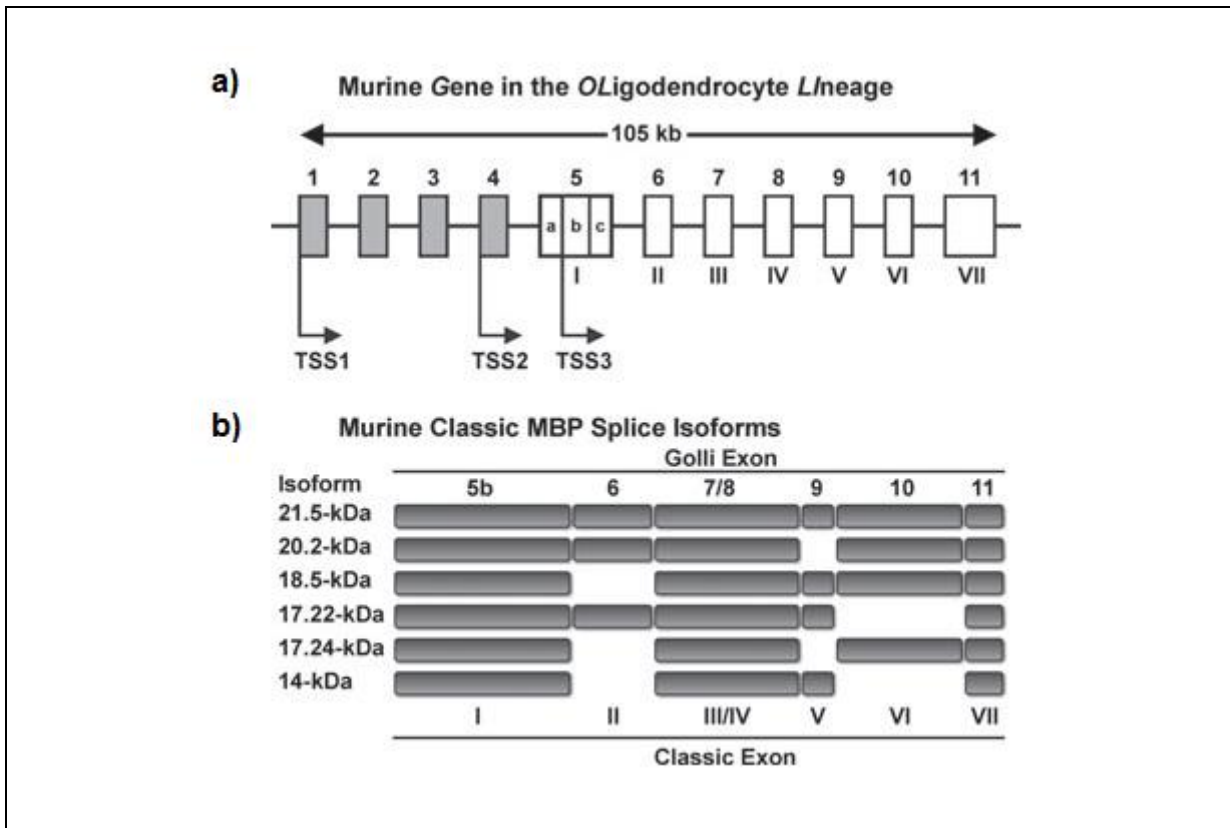
Man geht davon aus, dass die Myelinbiosynthese nicht direkt im Myelin stattfindet, sondern dass die Bestandteile in Vesikel verpackt und innerhalb der cytoplasmatischen Kanäle des Myelins transportiert werden. Nach Verschmelzen der Vesikel mit der Plasmamembran gelangen die Moleküle in das nicht-kompakte Myelin. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass MBP den Transfer der Moleküle in das kompakte Myelin kontrolliert und damit die Zusammensetzung der Lipid-reichen Myelinmembran steuert. Dabei bildet MBP eine größen-abhängige Barriere, welche nur die Diffusion von Proteinen mit einer kurzen zytoplasmatischen Domäne (< 30 Aminosäuren) in das kompakte Myelin ermöglicht. Lipide

hingegen diffundieren unabhängig von MBP in die Membran. In aufgereinigten Myelinfraktionen der *Shiverer* Maus, in denen der molekulare Filter MBP fehlt, ist das Protein-Lipid Verhältnis höher als im Wildtyp Myelin und die Myelin spezifische Proteinzusammensetzung ist verändert (Aggarwal et al., 2011; Simons et al., 2012; Simons & Trotter, 2007). Nach der Kompaktierung der Myelinmembran scheint MBP über Phenylalanin-Reste mit sich selbst zu assoziieren und ein Netzwerk auszubilden, welche die gerichtete Verteilung der Proteine in der Myelinmembran ermöglicht (Aggarwal et al., 2013). Demnach werden die Myelinproteine MAG und CNP aus dem kompakten Myelin ausgeschlossen, während PLP, MOG und MBP dort zu finden sind.

Während der Differenzierung und Myelinisierung durchlaufen Oligodendrozyten massive morphologische Veränderungen. Bei diesem dynamischen Prozess müssen die internen Mikrotubuli- und Mikrofilament-Netzwerke neu organisiert werden. Es konnte gezeigt werden, dass MBP mit Komponenten des Zytoskeletts interagiert und an dessen Zusammenbau beteiligt ist (Boggs, 2006; Boggs et al., 2011; Smith et al., 2012). Darüber hinaus kann *in vitro* das Netzwerk in Oligodendrozyten der *Shiverer* Maus nicht funktionell entwickelt werden, wodurch sich zum einen der Zellkörper stark vergrößert und zum anderen die Fortsatzlänge verändert wird und die flachen Membranbereiche (sog. Membran-Sheets, die dem kompakten Myelin *in vivo* entsprechen) nicht richtig ausgebildet werden können (Dyer et al., 1995). Weiterhin moduliert Membran-assoziiertes MBP die Kalziumantwort in der Zelle. Dabei interagiert speziell eine MBP Isoform (18,5 kDa) mit den spannungsgesteuerten Kalzium-Kanälen in der Plasmamembran, verringert den Einstrom von Kalziumionen in die Zelle und reguliert dadurch vermutlich verschiedene zelluläre Signalwege (Smith et al., 2011). Darüber hinaus kann MBP mit der membrangebundenen Phosphotyrosin-Kinase Fyn interagieren (Harauz et al., 2009; Smith et al., 2012). Diese Ergebnisse zeigen, dass MBP ein multifunktionelles Protein ist, welches durch die Interaktion mit anderen Proteinen, wie z.B. Tubulin, Aktin, Calmodulin und SH3-Domänen-Proteine (Fyn, Cortactin, ZO-1), essentiell für die Aufrechterhaltung der oligodendroglialen Homöostase und der Synthese der Myelinmembran ist.

Das *Golli-(Genes of Oligodendrocyte Lineage)* Gen ist auf Chromosom 18 lokalisiert und hat drei verschiedene Transkriptionsstartseiten von denen die klassischen MBP- und die Golli-Proteine transkribiert werden (Harauz & Boggs, 2013). Die Expression dieser beiden Untergruppen wird räumlich und zeitlich reguliert. Während die klassischen MBPs nur in den myelinbildenden Zellen exprimiert werden, kommen die Golli Proteine auch in Neuronen und Zellen des Immunsystems vor (Fulton et al., 2010). In der Maus gibt es 3 verschiedene Golli-Isoformen (BG21, J37 und TP8), die durch alternatives Spleißen einer mRNA entstehen und von der Transkriptionsstartseite 1 exprimiert werden. Golli Proteine haben je nach Zelltyp, in dem sie exprimiert werden, verschiedene Funktionen. In Oligodendrozyten werden sie vor allem während der Differenzierung, aber auch in OPCs oder reifen Oligodendrozyten gebildet. In der Zelle sind die Golli-Proteine vornehmlich mit dem Soma und dem Kern assoziiert und weniger in den Zellfortsätzen lokalisiert. Im Gegensatz zu den klassischen MBPs werden sie nicht in die Myelinmembran eingebaut (Givogri et al., 2001). Bislang ist nur wenig über die Funktion der Golli-Proteine bekannt, sie scheinen aber eine

Rolle bei der Migration und der Ausbildung der Zellfortsätze zu haben. Darüber hinaus fördern sie in einem frühen Differenzierungsstadium den Einstrom von Kalziumionen über spannungsgesteuerte Kalziumkanäle und könnten demnach auch wichtig für die Erhaltung der oligodendroglialen Homöostase sein (Paez et al., 2007). Wie bereits erwähnt, wird die intrazelluläre Kalziumkonzentration durch die klassischen MBPs nach deren Expression wieder herunter reguliert. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von Golli-Proteinen im Cuprizone-induzierten demyelinisierenden Mausmodell zu einer erhöhten OPC Proliferation im Corpus callosum und in der subventriculären Zone führt und dass diese Vorläuferzellen tatsächlich zu myelinisierenden Oligodendrozyten reifen und maßgeblich den Remyelinisierungsprozess im Corpus callosum fördern (Paez et al., 2012).



**Abbildung 7: Verteilung der Exons auf dem Maus Golli-(MBP) Gen und resultierende MBP Spleiß-Isoformen**

a) Das *Golli*-(Gene of Oligodendrocyte Lineage) Gen ist 105 kDa groß und umfasst 11 Exons. Die klassischen MBP Isoformen werden von Transkriptionsstartseite 3 (TSS3) transkribiert.

b) Durch alternatives Spleißen einer mRNA entstehen sechs klassische MBP Isoformen zwischen 14 (127 Aminosäuren) und 21,5 kDa (194 Aminosäuren). Im erwachsenen Maushirn kommt die 14 kDa Isoform und im erwachsenen Menschengehirn die 18.5 kDa Isoform am häufigsten vor. Exon-2 enthaltende Isoformen sind vor allem im Zellkern und im Zytoplasma lokalisiert, sind aber auch im Myelin zu finden. Isoformen ohne MBP sind in distalen Fortsätzen und im Myelin lokalisiert. In der *Shiverer*-Mausmutanten sind Exon 3 bis 8 deletiert (Harauz & Boggs, 2013).

In der Maus gibt es insgesamt sechs klassische MBP Spleiß-Isoformen zwischen 14 und 21,5 kDa, welche sich durch die Kombination von sieben verschiedenen Exons zusammen setzen (Harauz & Boggs, 2013). Beim Menschen gibt es dagegen nur vier Spleißvarianten (17,2 kDa, 18,5 kDa, 20,2 kDa und 21,5 kDa) (Kamholz et al., 1988). Alle Isoformen sind im Myelin zu finden, wobei diese zeitlich und räumlich unterschiedlich verteilt sind. Die Isoformen, die kein Exon 2 enthalten, werden in den späteren Entwicklungsstadien exprimiert und zur Myelinmembran transportiert. Exon 2-enthaltende Isoformen (17,22, 20,2 und 21,5 kDa) werden früh in der Entwicklung gebildet und werden aktiv in den Zellkern transportiert und könnten dort regulatorische Effekte auf die Myelinisierung haben (Pedraza et al., 1997; Staugaitis et al., 1990). Die Exon 2-enthaltende 21,5 kDa Isoform wurde aber auch im kompakten Myelin und in der Radialen Komponente gefunden (Karthigasan et al., 1996). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass die Überexpression dieser Isoform die Menge an aktiven Kinasen (ERK1/2 und Akt1) und ribosomalen Proteinen einer oligodendrozyten

Vorläuferzelllinie erhöht und damit deren Proliferation steigert. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass in Kokulturen die Überexpression der 21,5 kDa Isoform das Wachstum und die Verzweigung der Fortsätze einer neuronalen Zelllinie fördert (Smith et al., 2013). Da diese Isoform (Capello et al., 1997), genau wie die Golli-Proteine (Filipovic et al., 2002), während der Remyelinisierung in MS hochreguliert ist, scheint sie bei der Proliferation und Differenzierung der Oligodendrozyten eine Rolle zu spielen.

Die MBP Isoformen werden nach der Translation weiter modifiziert, was die Diversität dieser Familie damit erhöht. So existieren von der 18,5 kDa Isoform verschiedene Ladungs-Isomere (C1 bis C8), die durch Deaminierung, Phosphorylierung, sowie der Umwandlung von Arginin zu Citrullin, entstehen (Boggs and Harauz, 2006), und dadurch die Interaktion mit der Phospholipiddoppelschicht verändern. Schulz und Kollegen postulierten, dass phosphoryliertes MBP weniger in kompakten Myelinregionen zu finden ist, während nicht-phosphoryliertes MBP vor allem im kompakten Myelin vorkommt (Schulz et al., 1988). Die Phosphorylierung von MBP erfolgt an Serin- und Threoninresten durch verschiedene Proteinkinasen (Carnegie et al., 1974) und verringert z.B. die Fähigkeiten, Aktin zu polymerisieren und Aktinfilamente und Mikrotubuli an Lipiddoppelschichten *in vitro* zu binden (Boggs et al., 2006; Boggs et al., 2011).

### **2.1.1.5 MBP Synthese als wichtiger Bestandteil der Myelinisierung in Antwort auf axonale Eigenschaften**

Während der aktiven Myelinisierung erfahren Oligodendrozyten drastische morphologische Veränderungen, die eine enorme biosynthetische Leistung erfordern. Dabei produziert ein einziger Oligodendrozyt mindestens  $5 \times 10^3 \mu\text{m}^2$  Membranoberfläche pro Tag und ungefähr  $10^5$  Myelinproteine pro Minute (Pfeiffer et al., 1993). Die Synthese einer neuen Myelinschicht erfolgt innerhalb eines sehr engen Zeitfensters von nur fünf Stunden (Czopka et al., 2013). Wie in Abschnitt 2.1.1.3 bereits erwähnt, hängt die Synthese des Myelins von verschiedenen axonalen Eigenschaften ab. Neben dem Axondurchmesser und der Anzahl der zu myelinisierenden Segmente spielt auch die elektrische Aktivität des Axons eine entscheidende Rolle. Um auf die jeweiligen axonalen Bedingungen lokal reagieren zu können und bestimmte Proteine und Lipide zu exakt aufeinander abgestimmten Zeitpunkten in passenden Mengen produzieren zu können, werden einige Komponenten der Myelinschicht dezentral synthetisiert.

Die Myelinproteine PLP, MAG und MOG werden z.B. zunächst zur Plasmamembran transportiert, anschließend endozytiert und in Endosomen gespeichert. Durch bestimmte axonale Signale werden diese Proteine mobilisiert, zur Plasmamembran lokalisiert und schließlich in die Myelinmembran integriert (Krämer et al., 2001; Winterstein et al., 2008).

Die Myelinproteine MOBP (Holz et al., 1996) und MBP hingegen werden als mRNA zur Plasmamembran transportiert. Generell findet die Lokalisation von mRNAs statt, wenn das translatierte Proteinprodukt instabil oder sogar toxisch für die Zelle ist. Darüber hinaus kann durch mRNA Lokalisation eine schnelle orts- und zeitspezifische Synthese gewährleistet werden.

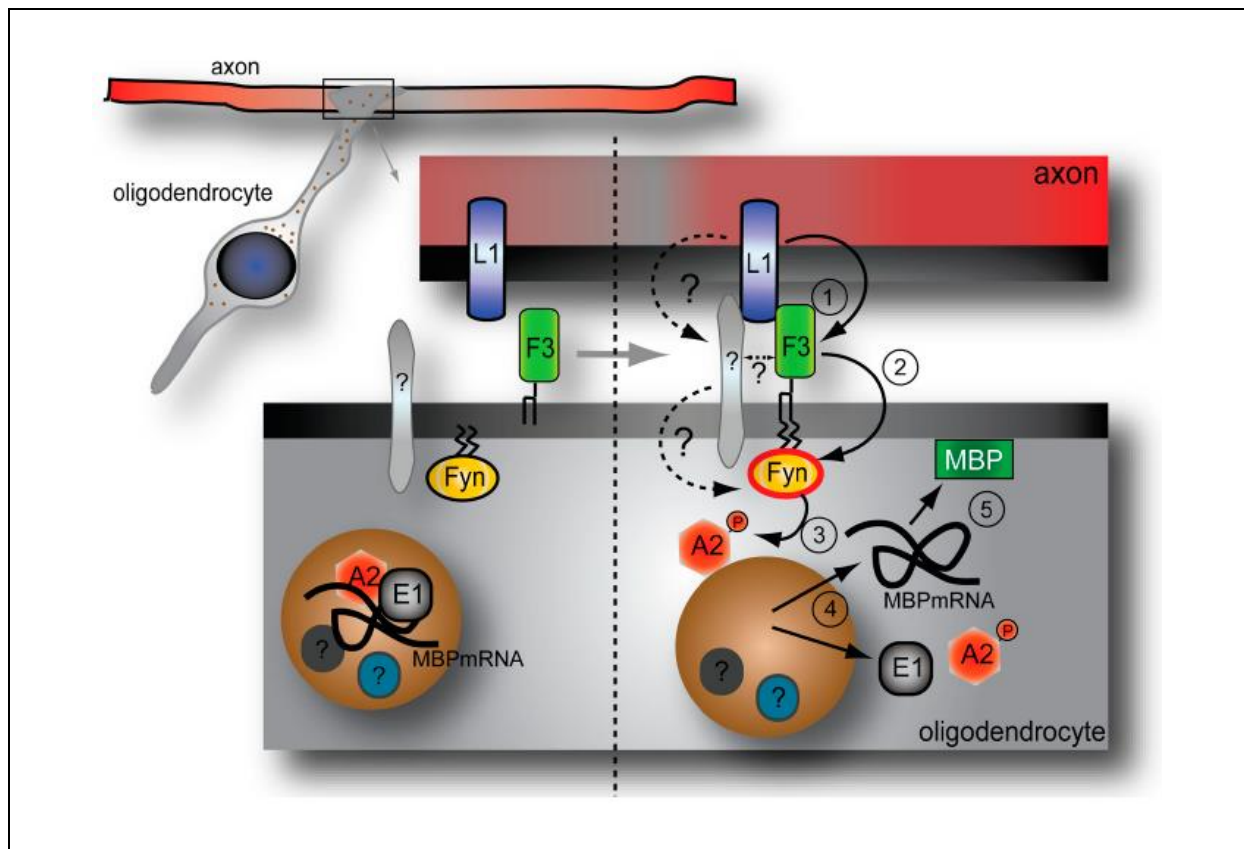
### 2.1.1.6 MBP mRNA Transport und hnRNP A2 Signalweg

MBP wird aufgrund seiner positiven Nettoladung als mRNA zur Myelinmembran transportiert, da das Protein mit intrazellulären Membranen interagieren und diese kompatieren könnte. Darüber hinaus ist es notwendig, die Synthese von MBP ortsspezifisch zu ermöglichen. Interessanterweise kann MBP mRNA in Oligodendrozyten schon ein Tag vor dem Protein nachgewiesen werden. Darüber hinaus exprimieren NG2<sup>+</sup>-Vorläuferzellen bereits MBP mRNA und kein Protein (Ye et al., 2003). Colman und Kollegen entdeckten 1982, dass MBP mRNA im Gegensatz zur PLP mRNA in Myelinfraktionen angereichert ist, und dass die Translation von MBP an freien Polysomen in den Zellfortsätzen erfolgt, die in die Myelinisierung eingebunden sind (Colman et al., 1982). In Versuchen, in denen exogene MBP mRNA durch Mikroinjektion in primäre Oligodendrozyten eingebracht wurde, konnte gezeigt werden, dass MBP mRNA in Granula vom Soma zu den Fortsätzen in die Peripherie transportiert wird und dort wieder „verschwindet“ (Ainger et al., 1993; Brophy et al., 1993). Dieser Transport hängt von einer 11 Nukleotid langen Sequenz (GCCAAGGAGCC), dem sogenannten hnRNP A2 Response Element (A2RE) in der MBP 3'UTR ab (Ainger et al., 1997; Munro, 1999) (Abbildung 8). Dieses *cis-acting element* ist in Exon VII kodiert und ist in allen MBP Isoformen zu finden (Kettenman & Ransom, Neuroglia). Darüber hinaus konnte das A2RE auch in verschiedenen anderen mRNAs, wie MOBP, Tau, Kohlensäure-Anhydrase II, CamKII $\alpha$  (*calcium/calmodulin dependent Kinase II*), Neurogranin und Arc (*activity-regulated cytoskeleton-associated protein*) lokalisiert werden. Neben dem A2RE gibt es ein weiteres *cis-acting element* in der 3'UTR der MBP mRNA, welches als *RNA localization region* (RLR) oder *RNA localization signal* (RLS) bezeichnet wird (Ainger et al., 1997; Barbarese et al., 2000).

Eine Schlüsselkomponente des hnRNP A2 Transportwegs ist das hnRNP A2 Protein. Nach der Synthese im Zytoplasma bindet hnRNP A2 an den Importrezeptor Transportin 1 und transloziert durch die Kernporen in den Zellkern (Siomi et al., 1997). Im Zellkern bindet hnRNP A2 an das A2RE in der MBP mRNA und vermittelt dadurch den Export aus dem Nukleus ins Zytoplasma. Wahrscheinlich führt allgemein die Bindung von hnRNP A2 an A2RE-enthaltene mRNAs zu einer Konformationsänderung des Proteins, wodurch eine Interaktion mit Transportin 1 und damit der Transport in den Zellkern verhindert wird (Carson & Barbarese, 2005). Im Zytoplasma wird die MBP mRNA zusammen mit anderen RNA bindenden Proteinen wie Tumor Overexpressed Gene (TOG) (Kosturko et al., 2005) und den hnRNPs F (White et al., 2012), E1 (Kosturko et al., 2006) und K (Laursen et al., 2011) in RNA-Granulen verpackt und bilden den transportablen Ribonukleoprotein- Partikel (RNP) (Czaplinski & Singer, 2006). In einem einzigen RNA-Granula können bis zu 30 mRNAs enthalten sein. Daneben sind noch Komponenten der Translationsmaschinerie wie z.B. der Elongationsfaktor 1a und ribosomale RNAs zu finden (Barbarese et al., 1995). Diese RNA-Granula werden mit Hilfe des Kinesin-Motorprotein Kif1b entlang der Mikrotubuli in Richtung der distalen Fortsätze der Oligodendrozyten transportiert (Lyons et al., 2009). Durch die Bindung von axonalem L1 an oligodendrogliales F3 wird die Plasmamembran-gebundene Kinase Fyn aktiviert und phosphoryliert die hnRNPs A2 (White et al., 2008) und F



(White et al., 2012). Dadurch wird das Transportgranula aufgelöst und die ortsspezifische Translation der MBP mRNA an der axo-glialen Kontaktstelle ermöglicht (Abbildung 8).



**Abbildung 8: A2-Transportweg**

Schematisch dargestellt ist der hnRNP A2 Transportweg. Die Bindung von neuronalem L1 an oligodendrogliales F3 führt zur Aktivierung der Fyn-Kinase. hnRNP A2 wird Fyn-abhängig phosphoryliert, wodurch hnRNP A2 vom A2RE der MBP mRNA dissoziiert und ortsspezifisch translatiert werden kann (White et al., 2008).

Während dieses Lokalisations-Prozesses ist die mRNA in einem inaktiven Zustand, d.h die Translation ist gehemmt. Der Mechanismus der translationalen Inhibition konnte bisher noch nicht im Detail aufgeklärt werden. Kosturko und Kollegen postulierten, dass durch die sequenzspezifische Bindung von hnRNP A2 an das A2RE in der MBP mRNA das Protein hnRNP E1 rekrutiert wird, und hnRNP E1 wahrscheinlich die Translation verhindert (Kosturko et al., 2006). Allerdings wurde in immunzytochemischen Analysen in Oligodendrozyten lediglich nur gezeigt, dass in 40% aller Granulen hnRNP A2 und hnRNP E1 kolokalisieren und dass in 50% der A2RE mRNA-beinhaltenen Granulen hnRNP E1 lokalisiert ist. Weiterhin führt die Überexpression oder Mikroinjektion von hnRNP E1 in neuronalen Zellen oder die Zugabe des Proteins in ein *in-vitro*-Translationssystem zur translationalen Inhibition von A2RE mRNAs. Eine direkte translationelle Inhibition von hnRNP E1 auf die MBP mRNA in Oligodendrozyten konnte dagegen nicht gezeigt werden. Am Transportprozess und der Stabilisation der MBP mRNA ist auch das RNA-Bindeprotein QKI (*quaking protein*) beteiligt, welches direkt mit der 3'UTR interagiert (Li et al., 2000). Mutationen im *QKI*-Gen führen zu

einer starken Hypomyelinisierung im ZNS, die durch die transgene Expression einer spezifischen QKI Isoform überwunden werden kann (Zhao et al., 2006). QKI kann durch die Fyn-Kinase phosphoryliert werden und dadurch die QKI vermittelte Bindung und Stabilisierung der MBP mRNA modulieren (Lu et al., 2005; Zhang et al., 2003). Die Fyn Kinase spielt eine entscheidende Rolle während des Myelinisierungsprozesses und ist in verschiedene axo-gliale Signalwege involviert (Krämer-Albers & White, 2011).

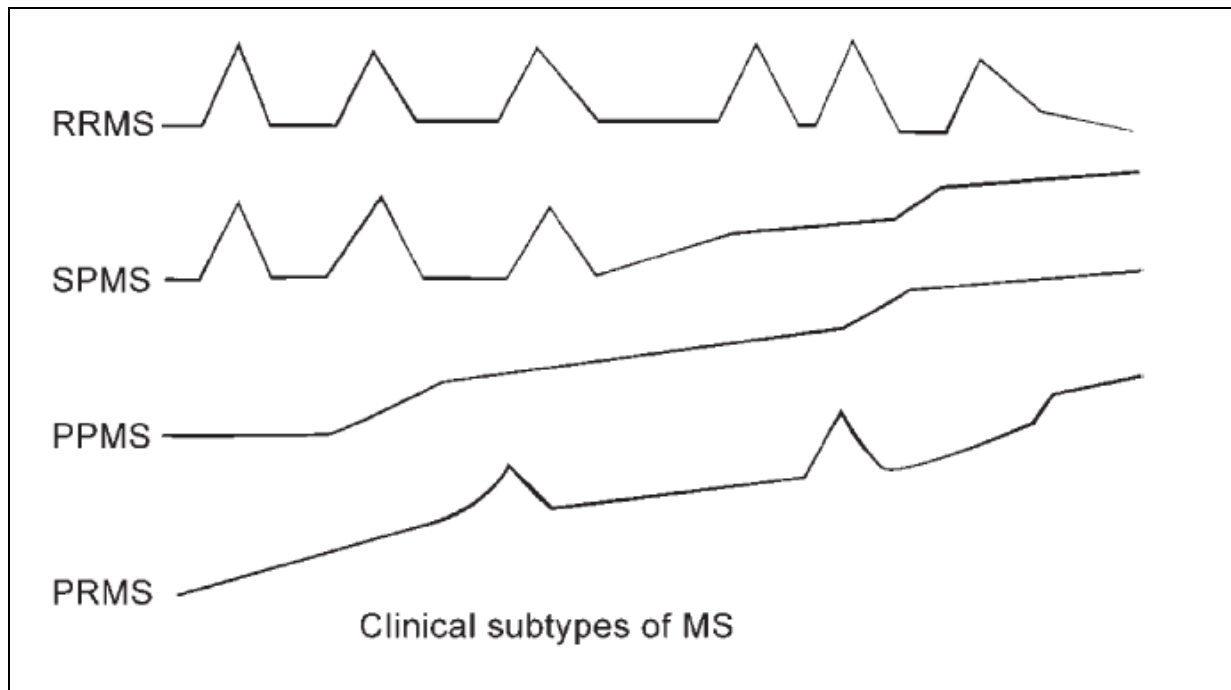
### **2.1.1.7 Defekte der Myelinbildung im ZNS**

Defekt in der Myelinbildung führen zu einer Beeinträchtigung der axonalen Reizweiterleitung und langfristig zur Degeneration der Nervenzellen. Myelinerkrankungen treten in Form von Demyelinisierungen (Zerstörung von Myelin; sekundärer Myelinverlust), Dysmyelinisierung (fehlerhaftes, instabiles Myelin) und Hypomyelinisierung (Myelin gering oder verzögert entwickelt) auf. Genetisch bedingte Myelinerkrankungen werden allgemein als Leukodystrophien bezeichnet. Eine bekannte Leukodystrophie ist die Pelizaeus Merzbacher Krankheit bzw. die schwächer ausgeprägte Form von Spastischer Paraplegie Typ 2, bei der das *PLP*-Gen mutiert ist (Krämer-Albers et al., 2006; Pham-Dinh et al., 1993). Eine fehlerhafte Myelinisierung kann auch zu psychiatrischen Erkrankungen wie Depressionen und Schizophrenie führen (Lee & Fields, 2009). Um eine normale Funktion des Myelins zu gewährleisten, reicht eine fehlerfreie Bildung nicht aus, da während des normalen Alterungsprozesses Myelin-Anomalien entstehen können. Solche Anomalien führen zu einer veränderten Isolation und gestörten Impulsweiterleitung entlang der Axone und können schließlich neuronale Schaltkreise beeinflussen. Es wird davon ausgegangen, dass dadurch die neuronale Konnektivität zwischen verschiedenen Hirnregionen und damit die kognitiven Fähigkeiten während des Alterns abnehmen (Peters, 2003). Es müssen demnach zusätzlich effiziente Reparatursysteme existieren, die während des normalen Alterungsprozesses bereits Myelin-Anomalien erkennen und erneuern können. Diese Reparatursysteme spielen auch bei entzündlichen Demyelinisierungen, wie z.B. der Multiplen Sklerose, eine entscheidende Rolle.

#### **2.1.1.7.1 Multiple Sklerose**

Die Multiple Sklerose (MS) ist die am häufigsten vorkommende neurologische Erkrankung junger Erwachsener. 1868 veröffentlichte der französische Neurologe Jean-Martin Charcot unter dem Titel "Histologie de la Sclérose en plaques" erstmals eine umfassende Beschreibung der MS. Anhand pathologischer Untersuchungen von MS Patienten beschrieb er die Infiltration von Zellen in die weiße Substanz, die Ausbildung entzündlicher Bereiche (Läsionen), die Vermehrung von Geweben und Zellkernen (Glial scar formation) sowie der Verlust von Axonen und Neuronen. Trotz intensiver Studien sind die Gründe, sowie die exakten pathogenen Mechanismen der Krankheit nicht verstanden, da scheinbar verschiedene Faktoren eine Rolle spielen. Dazu zählen neben dem Alter, dem Geschlecht und geographischen Aspekten, auch genetische Dispositionen und verschiedene virale Infektionen (z.B. Epstein-Barr Virus und Herpes Viren).

Bislang geht man davon aus, dass sich im frühen Stadium dieser Autoimmunerkrankung eine T-Zell-vermittelte entzündliche Reaktion gegen das Myelin im ZNS richtet und eine Demyelinisierung und Degeneration der Axone nach sich zieht (Martin et al., 1992). Grundsätzlich unterscheidet man bei der MS vier Verlaufstypen, die in Abbildung 9 dargestellt sind (Guo et al., 2012).

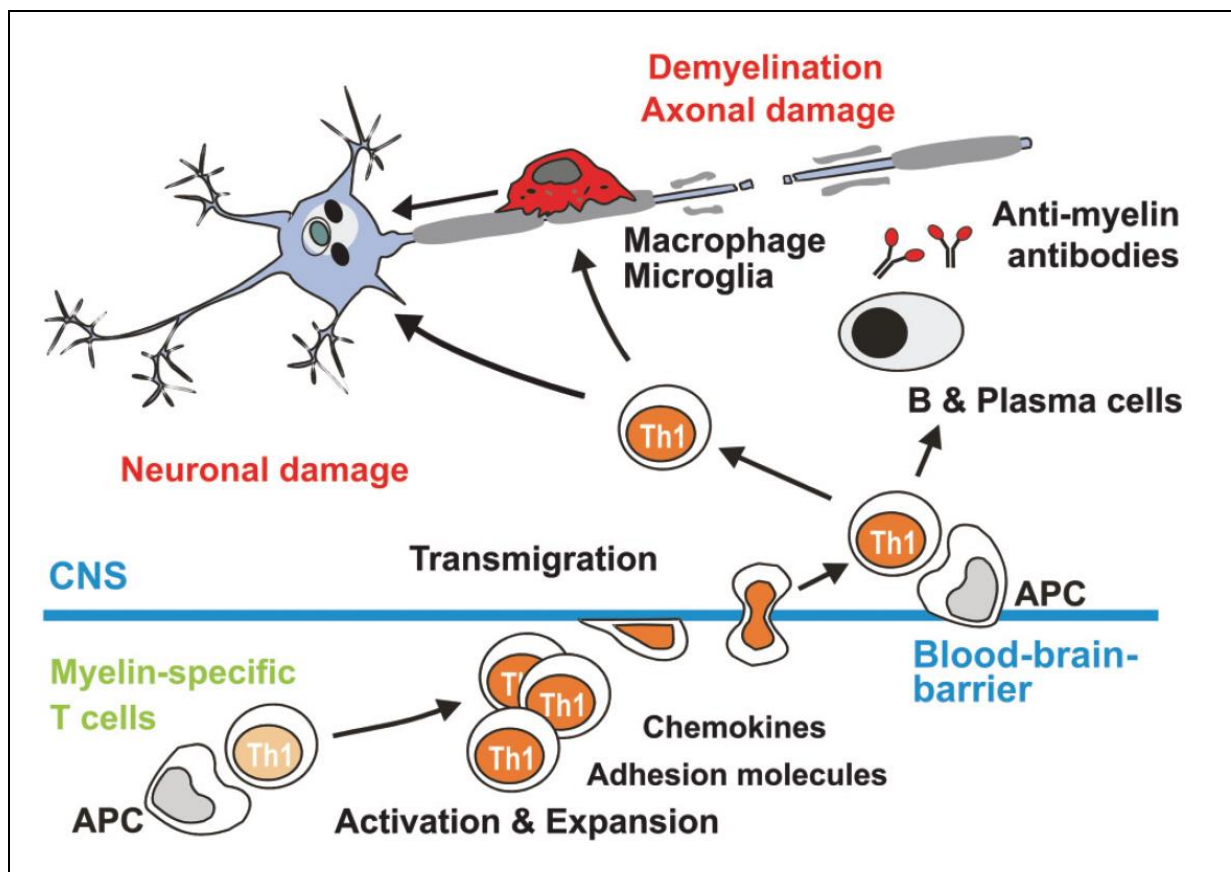


**Abbildung 9: Klinische Verlaufstypen der Multiplen Sklerose**

Die möglichen Krankheitsverläufe der MS sind in folgende Phasen unterteilt: schubförmige remittierende MS (RRMS), sekundäre progrediente MS (SPMS), primäre progrediente MS (PPMS) und progrediente schubförmige MS (PRMS) (Guo et al., 2012).

Die schubförmige remittierende MS (RRMS) kommt bei über 80% der Patienten vor und beginnt mit einem schubförmigen Verlauf, bei dem sich die Symptome nach einem Schub wieder komplett zurück bilden können. Nach einer bestimmten Zeit leiden die Patienten an der sekundären progredienten MS (SPMS), die durch das langsame, kontinuierliche Fortschreiten der Krankheit charakterisiert ist. In seltenen Fällen beginnt die Krankheit ohne Schübe direkt mit einem chronisch-voranschreitenden Verlauf und wird dann als primär progrediente MS (PPMS) bezeichnet. Bei der progredienten schubförmigen MS (PSMS) wird der chronisch-voranschreitenden Verlauf der Krankheit durch einzelne Schübe unterbrochen. Bislang geht man davon aus, dass in der Peripherie zirkulierende Myelin-spezifische T-Zellen (Th1) aktiviert und expandiert werden (Abbildung 10). Diese T-Zellen exprimieren auf der Zelloberfläche Adhäsionsmoleküle und Chemokinrezeptoren, die das Überwinden der Blut-Hirn-Schranke in das ZNS ermöglichen. Dort werden die T-Zellen durch lokale antigenpräsentierende Zellen, welche das Antigen über MHC präsentieren, reaktiviert und es kommt zu einer entzündlichen Autoimmunreaktion gegenüber Bestandteilen des Myelins. Darüber hinaus schütten reaktivierte T-Zellen proinflammatorische Zytokine (IFN $\gamma$ )

und  $TNF\alpha$ ) aus, die weitere Immunzellen rekrutieren. Schließlich tragen B-Zellen, periphere Makroglia und residente Mikroglia auch zur Immunantwort bei (Aktas et al., 2006). Allerdings ist die Degeneration der Axone nicht nur primär auf die Demyelinisierung und Zerstörung der Oligodendrozyten zurück zu führen. Es ist bekannt, dass Neurone und Axone auch direkt von den Immunzellen attackiert werden können. Hierbei spielen scheinbar neurotoxische Substanzen, wie z.B. reaktive Sauerstoffmoleküle, die von T-Zellen oder Makrophagen ausgeschüttet werden, eine entscheidende Rolle (Herz et al., 2010).

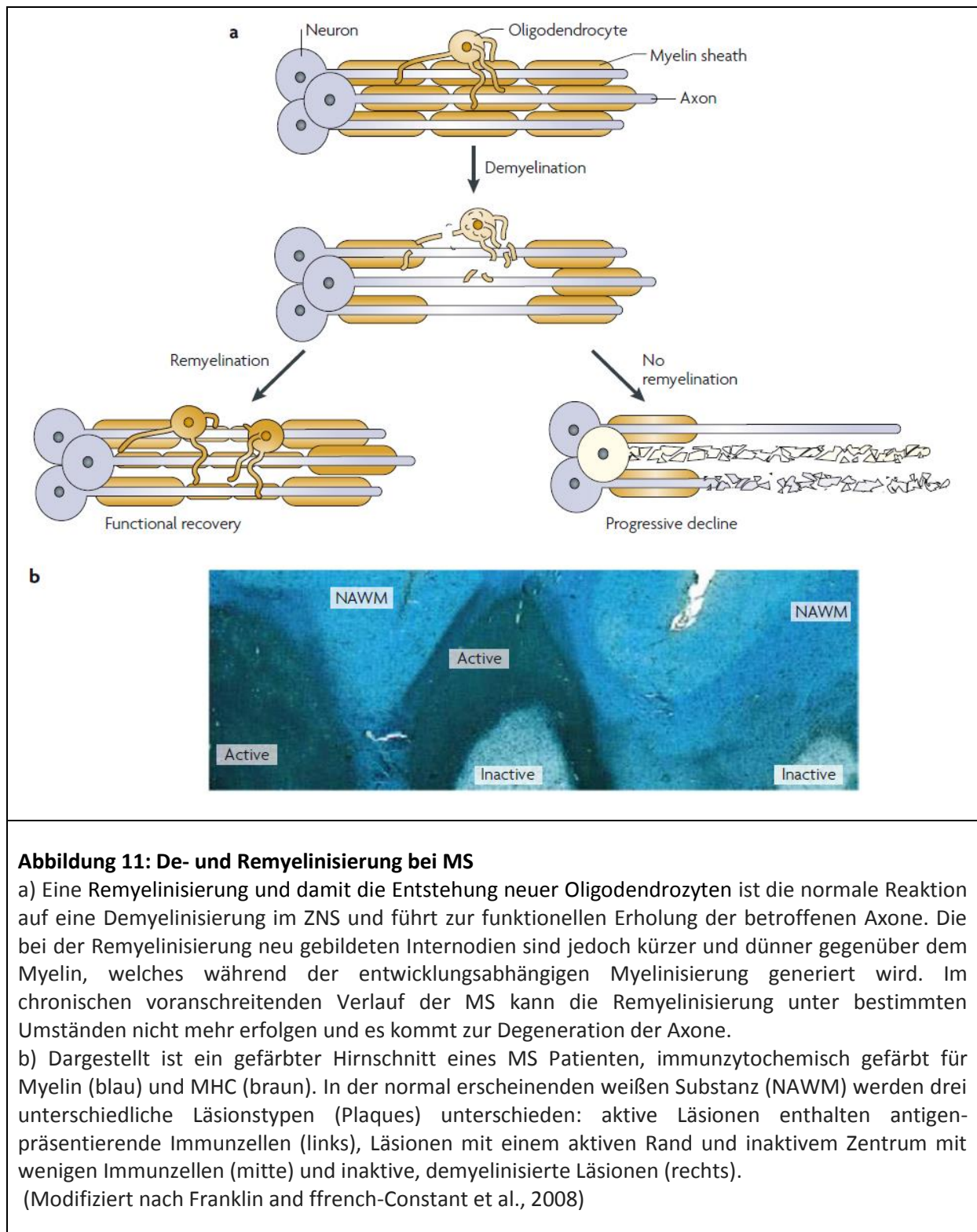


**Abbildung 10: Pathogeniemodell der Multiplen Sklerose**

Bei der Multiplen Sklerose sind verschiedene Aspekte von Bedeutung: Produktion von Antikörpern gegen Myelinproteine (MBP, PLP, MOG oder MAG); Öffnung der Blut-Hirn-Schranke, gefördert durch Chemokine und Adhäsionsmoleküle; Antigenpräsentation; Aktivierung von T-Zellen und residenten Antigen-präsentierenden Zellen; Rekrutierung von residenten Mikroglia, peripheren Makroglia sowie B-Zellen; Ausschüttung von Zytokinen ( $IFN\ \gamma$  und  $TNF\alpha$ ). Die dadurch bedingte ausgelöste Immunantwort führt zur Zerstörung von Oligodendrozyten, zur Demyelinisierung und schließlich zur Degeneration der Axone (Aktas et al., 2006).

Die oben beschriebenen zellulären und molekularen Vorgänge laufen hauptsächlich in der akuten Phase der Erkrankung ab und werden als Schub bezeichnet (siehe Abbildung 9). In akuten Läsionen kann die Demyelinisierung zum Teil durch Remyelinisierung kompensiert werden. Diese Bereiche mit dünnem, neu gebildetem Myelin werden als *Shadow Plaques* bezeichnet (Noseworthy et al., 2000). Wie in Abbildung 9 dargestellt, kann es dann zu einer Verbesserung der Krankheitszeichen kommen. Ab einem bestimmten Zeitpunkt ist das

Remyelinisierungspotenzial jedoch ausgeschöpft und es kommt schließlich zur Verschlechterung der Symptome und einem chronischen Krankheitsverlauf (Abbildung 11).



Generell lassen sich unabhängig des Krankheitsstadiums aktive und inaktive Läsionen unterscheiden. Lucchinetti und Kollegen konnten zeigen, dass in 70% der Fälle in akuten Läsionen die Anzahl an Oligodendrozyten reduziert ist, wohingegen in inaktiven Läsionen

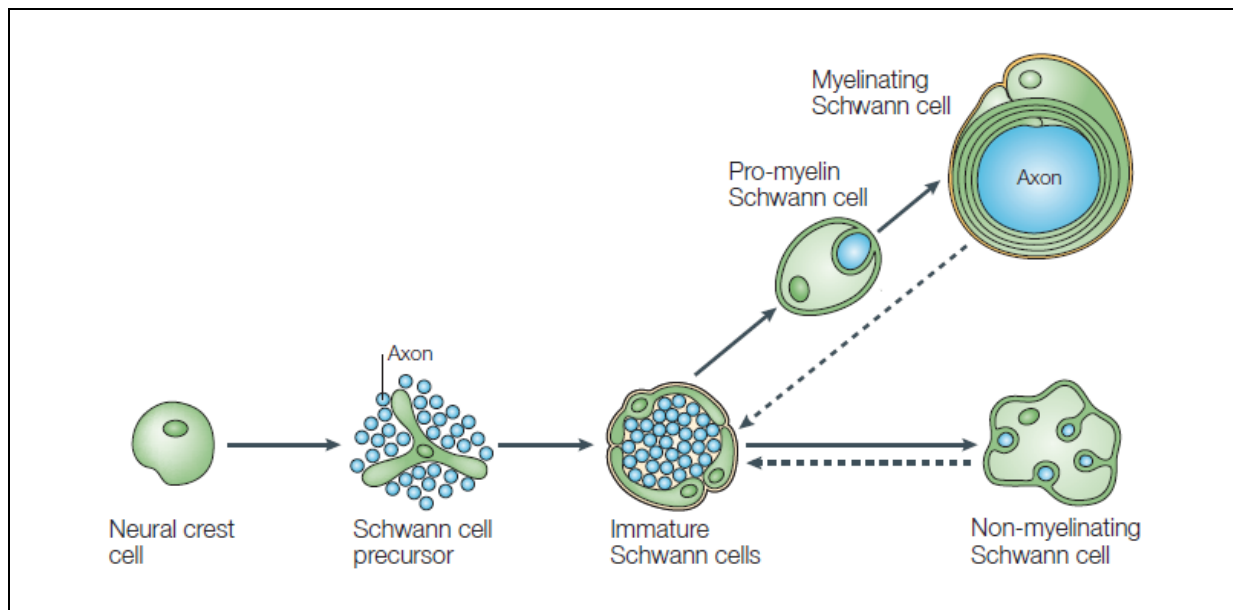
und in remyelinisierenden Bereichen Oligodendrozyten nachweisbar waren. Darüber hinaus scheinen die Oligodendrozyten sich wahrscheinlich aus Vorläuferzellen entwickelt zu haben. In den verbleibenden 30% der Fälle konnten in aktiven und inaktiven Läsionen weder Anzeichen einer Remyelinisierung noch Oligodendrozyten gefunden werden (Lucchinetti et al., 1999). Zusätzlich zeichnen sich aktive Läsionen durch die Infiltration aktivierter Makrophagen und der Phagozytose von Myelinbestandteilen aus und zeigen eine starke Demyelinisierung der Axone. In chronischen inaktiven Läsionen sind hingegen keine Makrophagen oder Immunzellen vorhanden und die Demyelinisierung ist abgeschlossen und zeichnet sich durch eine massive Astrogliose aus (Hauw et al., 1992).

### **2.1.2 Zelltypen des peripheren Nervensystems**

Das periphere Nervensystem (PNS) besteht aus Neuronen und einer Vielzahl verschiedener Gliazellen, die mit verschiedenen Bereichen eines Neurons oder spezifischen neuronalen Zelltypen assoziiert sind. Astrozyten kommen zwar im ZNS zahlenmäßig am häufigsten vor, sind aber im PNS nicht anzutreffen. Mantelzellen, auch als Satellitenzellen bezeichnet, sind das Pendant der Astrozyten im ZNS. Sie ummanteln neuronale Perikarya peripherer Ganglienzellen mit einer einschichtigen Lage und wirken unterstützend auf den Zellkörper. Myelinisierende und nicht-myelinisierende Schwann-Zellen ummanteln hingegen Axone und zählen zu den bekanntesten peripheren Gliazellen. Ein weiterer Gliazelltyp sind die olfaktorischen Hüllzellen, die die Axone der Geruchsnerve ummanteln (Kristjan R Jessen, 2004). Axonale Endigungen an der motorischen Endplatte werden von terminalen Gliazellen (Teloglia) umhüllt.

#### **2.1.2.1 Embryonale Herkunft und Funktion von Schwann-Zellen**

Während der Entwicklung zu myelinisierenden bzw. nicht-myelinisierenden Schwann-Zellen durchlaufen die Zellen verschiedene Entwicklungsstadien. Dabei sind die potentiellen Schwann-Zellen mit Axonen verbunden und auf deren Überlebens-Faktoren, Mitogene und Differenzierungssignale angewiesen (Jessen & Mirsky, 2005).



**Abbildung 12: Entwicklungs- und Differenzierungsstadien von Schwann-Zellen**

Die Reifung myelinisierender bzw. nicht-myelinisierender Schwann-Zellen verläuft durch verschiedene Entwicklungsstadien. Die Embryonalphase der Schwann-Zellen Entwicklung besteht aus drei transienten Zellpopulationen und beginnt mit einer multipotenten, migrationsfähigen Neuralleistenzelle. Die Schwann-Zell Vorläuferzelle (SCP; *Schwann-cell precursor*) ist mit auswachsenden sensorischen und motorischen Neuronen assoziiert und differenziert in unreife Schwann-Zellen, mit epithelähnlicher Morphologie. Axonale Signale entscheiden zum Zeitpunkt der Geburt, ob eine nicht-myelinisierende oder eine myelinisierende Schwann-Zelle gebildet wird. Dieser letzte Schritt ist reversibel und spielt bei der Nervenverletzungen und Remyelinisierungsprozessen eine Rolle (Jessen & Mirsky et al., 2005).

Schwann-Zellen entstehen aus einer multipotenten Neuralleistenzelle. Induziert werden die Neuralleistenzellen durch Bone Morphogenetic Proteine (BMP-4 und BMP-7), die vom epidermalen Ektoderm sezerniert werden (Liem et al., 1995). Um den Embryonaltag 10-11 (E10-11) fördert BMP-2 die Ablösung der Neuralleistenzellen vom Neuralrohr und deren Migration in die Peripherie (Correia et al., 2007). Interessanterweise sind die migrationsfähigen Neuralleistenzellen eng mit einer Vielzahl auswachsenden sensorischen und motorischen Neuronen assoziiert. Sie begleiten diese Neurone zu ihrem Zielgewebe und differenzieren dort an E11-12 in Schwann-Zell Vorläuferzellen (SCP). Sie exprimieren wie die Neuralleistenzellen z.B. den Neuregulin Rezeptor ErbB3, das neurale Zelladhäsionsmolekül L1, den Neurotrophinrezeptor p75, das Aktivatorprotein AP $\alpha$ 2, das Transmembranprotein Integrin  $\alpha$ 4, das Zelladhäsionsmolekül N-Cadherin und den Transkriptionsfaktor Sox10. Darüber hinaus werden die Myelinproteine P0 (P0), das periphere Myelinprotein 22 (PMP22) und PLP, sowie das Wachstums-assoziierte Protein 43 (GAP43), das Desert-Hedgehog Protein (DHH) und das Brain Fatty Acid-binding Protein (BFABP) gebildet. Um E15/16 differenzieren die SCP's in unreife Schwann-Zellen mit flacher, epithelähnlicher Morphologie und exprimieren den oktameren Transkriptionsfaktor 6 (Oct-6), das Kalzium-bindende Protein S100, das saure Gliafaserprotein (GFAP) und das Oberflächenantigen O4 (Jessen & Mirsky, 2005). Die Differenzierung in reife Schwann-Zellen erfolgt kurz nach der Geburt. Dabei

stellen die Zellen ihre Proliferation mit der Zeit ein (Stewart et al., 1993). In Kokultursystemen von Schwann-Zellen und Neuronen konnte bisher gezeigt werden, dass die Dicke des Axons darüber entscheidet, ob sich eine unreife Schwann-Zelle zu einer myelinisierenden oder nicht-myelinisierenden Schwann-Zelle entwickelt (Birchmeier & Nave, 2008). Diese beiden reifen Schwann-Zelltypen zeichnen sich durch die Expression verschiedener Proteine aus. Nicht-myelinisierende Schwann-Zellen können eine Gruppe von Axonen umschließen und die sogenannten Remakbündel ausbilden und haben in erster Linie eine nutritive Funktion. Die Leitgeschwindigkeit solcher ummantelter Fasern ist vergleichsweise niedrig. Die myelinisierenden Schwann-Zellen bilden die Myelinschicht der peripheren Axone und sind für die schnelle Leitung der Aktionspotentiale entlang der Axone essentiell. Im Gegensatz zu den nicht-myelinisierenden Schwann-Zellen werden die Myelinproteine PO, MBP, PMP-22, MAG, PLP, MAL (*myelin and lymphocyte protein*) und Plasmalipin, sowie der Transkriptionsfaktor Krox-20, das Gap Junction Protein Connexin 32 und die Galaktosylceramidase GALC stark hochreguliert (Mirsky et al., 2008). Dafür wird die Synthese bestimmter Proteine, wie z.B. NCAM, GFAP sowie der Nervenwachstumsfaktor Rezeptor NGFR, reduziert (Jessen & Mirsky, 1992).

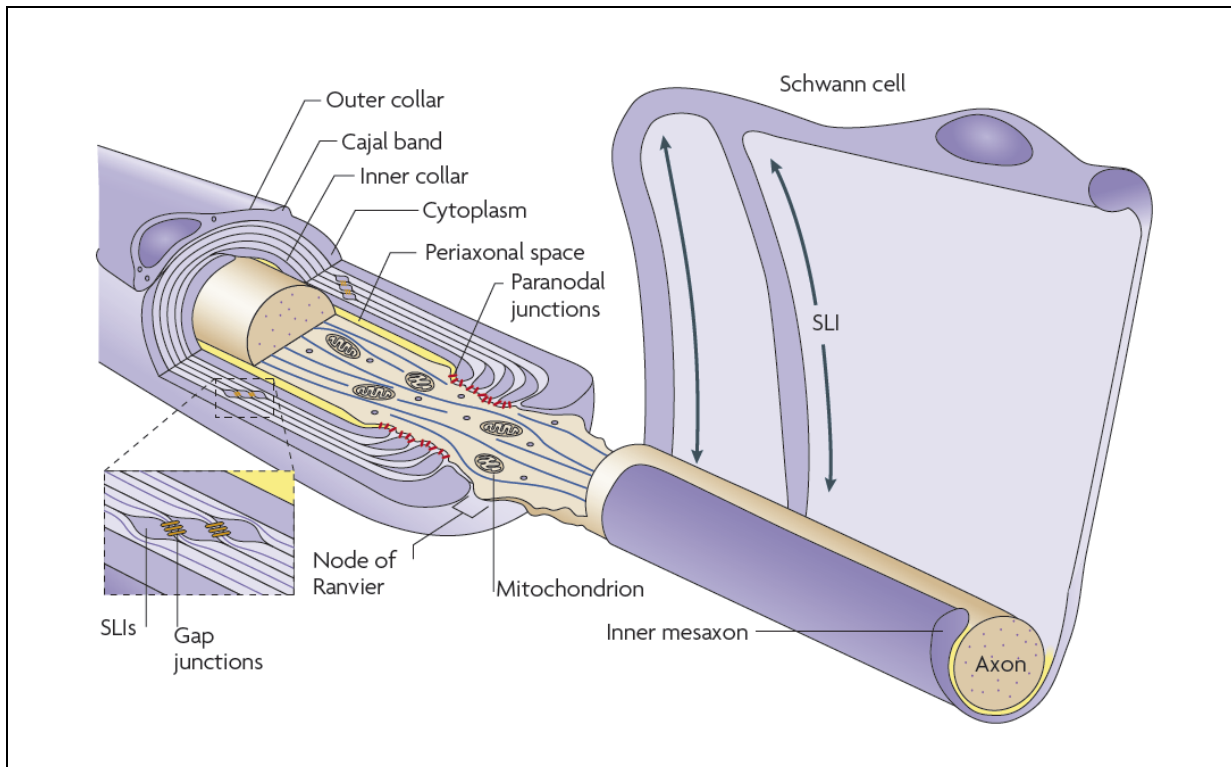
Interessanterweise ist die Differenzierung zu myelinisierenden bzw. nicht-myelinisierenden Schwann-Zellen reversibel. Nach Verlust des axonalen Kontaktes (z.B. nach einer Nervenverletzung) dedifferenzieren die reifen Schwann-Zellen zu unreifen proliferationsfähigen Schwann-Zellen und nehmen nach Auswachsen des Nervs wieder Kontakt auf (Bhatheja & Field, 2006). Das Axon selbst vermittelt schließlich über den Durchmesser und axonale Signale den Phänotypen der reifen Schwann-Zelle (Toy & Namgung, 2013). Als Schlüsselkomponente für das Überleben und die Differenzierung von Schwann-Zellen konnte das axonale Neuregulin 1 Typ III (NRG1-III) identifiziert werden, welche jede einzelne Schwann-Zell-Entwicklungsstufe kontrollieren (Nave & Salzer, 2006). Neureguline sind Wachstumsfaktoren, die mit ihrer EGF-ähnlichen Domäne membranständige ErbB-Rezeptoren aktivieren und verschiedene Second-Messenger-Kaskaden in der Zelle auslösen können. In Schwann-Zellen führt die Bindung von axonalem NRG1-III an den glialen ErbB2/3 Rezeptor zur Migration, Proliferation, Myelinisierung und zum Überleben der Zelle (Nave, 2010; Taveggia et al., 2010). Kürzlich konnten Arthur-Farraj und Kollegen zeigen, dass die intrazelluläre Konzentration des Second-Messenger zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) reguliert, ob NRG1 die Proliferation oder die Differenzierung stimuliert (Arthur-Farraj et al., 2011).

## 2.1.2.2 Myelin und MBP im PNS

Im Gegensatz zum ZNS werden im PNS nur Axone mit einem Durchmesser über 1 µm myelinisiert, kleinere Axone werden von nicht-myelinisierenden Schwann-Zellen ummantelt (Sherman & Borphy, 2005). Nach Auswahl des zu myelinisierenden Axons legt sich das Zytoplasma der Schwann-Zelle um das Axon herum. Schließlich nähern sich die Membranränder und es entsteht das Mesaxon, welches sich spiralig mehrfach um das Axon wickelt und das kompakte Myelin bildet (Quarles, 2002). Der Zellkern, sowie das Zytoplasma der Schwann-Zelle liegen auf der Außenseite der Myelinmembran an (Abbildung 5). Das



Zytosol der Schwann-Zelle ist mit dem periaxonalen Raum (zwischen Axon und Myelinmembran) über lange und cytoplasmahaltige Kanäle, wie z.B. den Cajal-Bändern oder Schmidt-Lantermann-Einkerbungen, verbunden (Nave, 2010b)(Abbildung 13). Entlang des Mikrotubuli-Zytoskeletts können in den Cajal-Bändern mRNA Moleküle vom Zellkern in die Peripherie transportiert werden (Sherman & Brophy, 2005). Die Schmidt-Lantermann-Einkerbungen, sowie die paranodalen Bereiche sind Bereiche des nicht-kompakten Myelins und ermöglichen wahrscheinlich über Gap Junctions den Austausch von Molekülen zwischen der Myelinmembran und dem Axon (Campana, 2007).



**Abbildung 13: Aufbau der Myelinmembran in PNS**

Dargestellt ist ein myelinisiertes Axon im PNS mit einer aufgerollten Myelinmembran. Das Myelin ist eine multilamellare Membran, die sich spiralförmig um das Axon windet. Das kompakte Myelin (blau) dient als isolierende Hülle peripherer Axone und steht in engem Kontakt mit dem Axon. Das nicht-kompakte Myelin (dunkelblau) besteht aus zytoplasmatischen Kanälen, die als Schmidt-Lantermann-Einkerbungen (SLI, *Schmidt-Lantermann incisures*) und Cajal-Bänder bezeichnet werden. Die SLI sind durch Gap Junctions miteinander verbunden (Nave 2010b).

Die Myelinmembran im PNS ist wie im ZNS sehr lipidreich und besteht nur aus 15-30% Proteinen (Quarles et al., 2006). Eine Besonderheit peripherer Myelinproteine ist, dass sie etwa 60% Glykoproteine (P0, PMP22, MAG, Periaxin und E-Cadherin), 20 bis 30% basische Proteine (MBP und P2) und nur etwa 10 bis 20% andere Proteine (CNP, PLP/DM20 und Cx32) umfassen (Garbay et al., 2000). Kürzlich konnte jedoch gezeigt werden, dass das periphere Myelinproteom weitaus komplexer ist als bisher angenommen und dass die Hauptmyelinproteine P0, Periaxin und MBP zu 21, 16 und 8% vorkommen (Patzig et al., 2011).

Obwohl MBP auch im PNS ein Strukturprotein der Myelinmembran darstellt, kann bei MBP-defizienten *Shiverer* Mausmutanten weitgehend normales kompaktes Myelin gebildet werden kann (Kirschner & Ganser, 1980; Rosenbluth, 1980a). Man geht davon aus, dass im PNS andere Myelinproteine den Defekt kompensieren können, da MBP nicht alleine an der Kompaktierung der Myelinmembran beteiligt ist. Das positiv geladene Myelinprotein P2 ist wie MBP in der *Major Dense Line* lokalisiert und besitzt auch eine strukturelle Funktion. P2 interagiert dort mit den negativ geladenen Phospholipiden der Myelinmembran und ist an Stabilisierung und der Kompaktierung der Myelinmembran beteiligt (Quarles, 2002; Suresh et al., 2010). Darüber hinaus kann die positiv geladene cytoplasmatische Domäne des Glykoproteins P0 ebenfalls die Membran kompaktieren (Ding & Brunden, 1994; D'Urso et al., 1990). Weitere morphologische Studien zeigten, dass MBP die Anzahl an zytoplasmatischen Kanälen, den Schmidt-Lantermann-Einkerbungen, im Myelin kontrolliert (Gould et al., 1995). In der *Shiverer* Maus ist nicht nur die Anzahl an Schmidt-Lantermann-Einkerbungen verdoppelt, sondern die beiden Komponenten dieser Kanäle, MAG und Connexin 32 (Cx32), werden verstärkt exprimiert, während andere Komponenten des kompakten Myelins, P0 und PMP22, konstant bleiben. Da der mRNA Gehalt von P0, PMP22, MAG und Cx32 unverändert bleiben, scheint MBP posttranslational die Expression von MAG und Cx32 zu regulieren (Smith-Slatas & Barbarese, 2000).

Bereits 1987 konnten Trapp und Kollegen zeigen, dass in Schwann-Zellen MBP mRNA um den Zellkern konzentriert ist und im Zuge der Myelinisierung in die Fortsätze transportiert wird. Die mRNAs der Myelinproteine P0 und PLP sind hingegen während des gesamten Myelinisierungsprozesses in der Nähe des Zellkerns zu finden (Trapp et al., 1987). Der Transport der MBP mRNA erfolgt entlang der Mikrotubuli in den zytoplasmagefüllten Kanälen, den Cajal Bändern (Court et al., 2004). Über den genauen Transportprozess der MBP mRNA in Schwann Zellen ist bislang nur wenig bekannt (Masaki, 2012). Das RNA-Bindeprotein QKI, welches am Transport und der Stabilisation der MBP mRNA in Oligodendrozyten beteiligt ist (Li et al., 2000), scheint auch in Schwann-Zellen an diesen Prozessen beteiligt zu sein. In QKI defizienten Mäusen kann kein kompaktes Myelin gebildet werden und die Menge an MBP mRNA ist reduziert (Larocque et al., 2009).

## 2.2 Nicht-kodierende RNAs

Lange Zeit galt in der Molekularbiologie das zentrale Dogma, dass der Fluss genetischer Information von DNA über RNA zum Protein verläuft und dass Proteine an der Steuerung aller biochemischen Prozesse in der Zelle verantwortlich sind. Die RNA Moleküle stellten lediglich eine Brücke zwischen DNA und Proteinen dar. Die messenger RNA (mRNA) dient als Informationstransportmittel und wird mit Hilfe kleiner nukleärer RNAs (snRNAs) gespleißt. Die transfer RNAs (tRNAs) und die ribosomalen RNAs (rRNAs) sind an der Translation beteiligt. Den Bereichen zwischen den proteinkodierenden Genen wurde keine Bedeutung zugeordnet und sie wurden als „Junk DNA“ bezeichnet. Die Entschlüsselung des menschlichen Genoms 2001 ergab, dass Protein-kodierende Regionen nur etwa 1,5% des Gesamtgenoms ausmachen. Dabei ist es schwierig sich vorzustellen, dass der Rest des Genoms ungenutzt bleibt, da er im Laufe der Evolution hätte entsorgt werden müssen.

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass etwa 80% der DNA in RNA umgeschrieben wird. Die RNA Moleküle, die nicht für ein Protein kodieren, werden als nicht-kodierende RNAs (ncRNA, *non-coding RNAs*) bezeichnet. Man geht davon aus, dass die Mehrheit des Genoms in ncRNAs transkribiert und schließlich in kleine RNA Moleküle prozessiert wird (Mattick & Makunin, 2006; Pennisi, 2010). Diese kleinen, nicht-kodierenden RNAs (sncRNA, *small non-coding RNAs*) umfassen eine große Gruppe strukturell und funktionell unterschiedlicher RNA Moleküle, die zell- und entwicklungsspezifisch verschiedene Vorgänge regulieren. SncRNAs können in infrastrukturelle und regulatorische RNAs unterteilt werden. Die infrastrukturellen RNAs umfassen neben den snRNAs auch die kleine nukleolären RNAs (snoRNA, *small nucleolar RNAs*), kleine Cajal-Körper spezifische RNAs (scaRNA, *small Cajal body-specific RNAs*) und Y RNA. Regulatorische Funktionen in der Zelle übernehmen Piwi-interacting RNAs (piRNA), small interfering RNA (siRNA), transcription initiation RNAs (tiRNA) und mikroRNAs (miRNA) (Esteller, 2011).

## 2.2.1 MikroRNAs

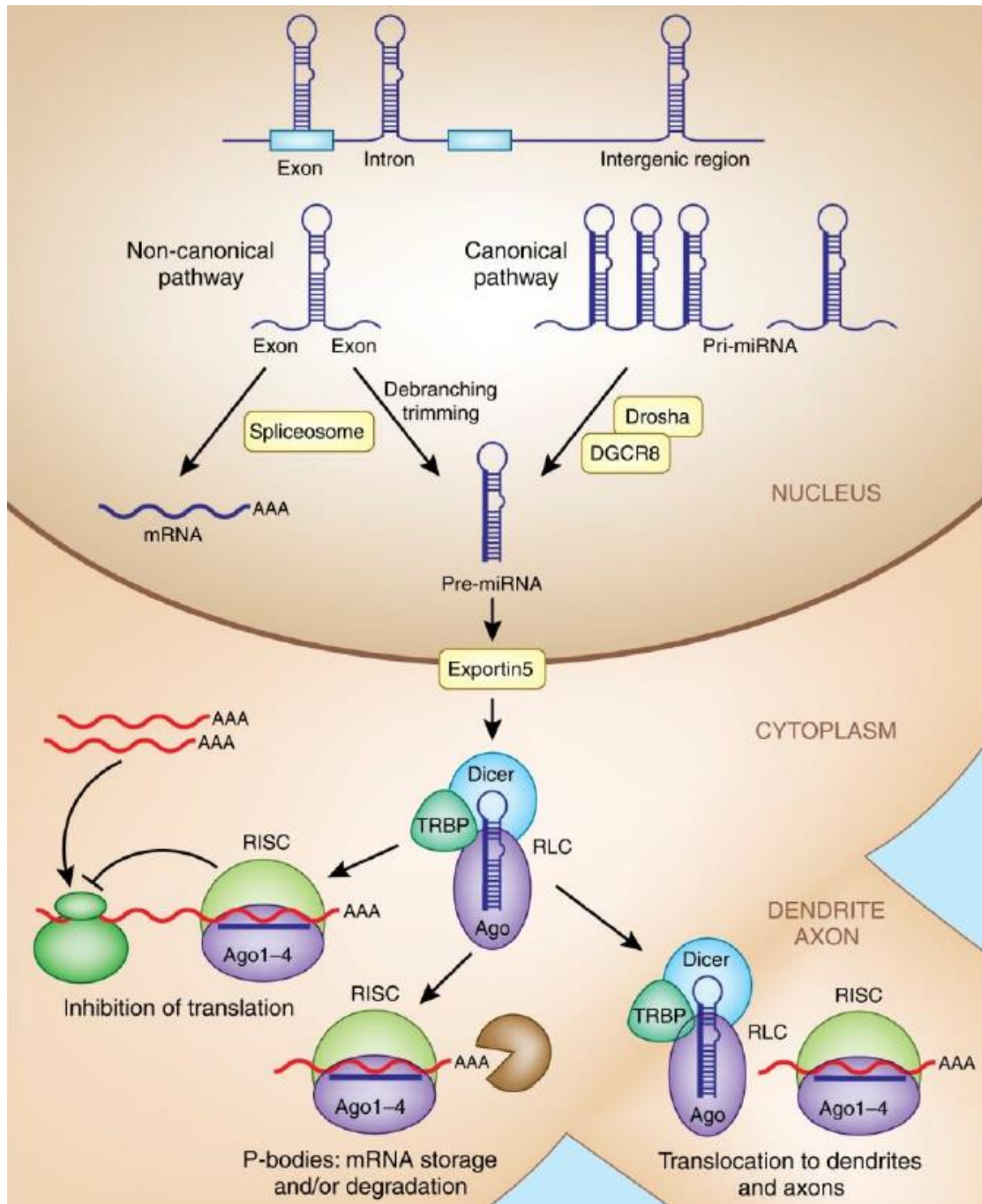
Bereits im Jahr 1993 wurde das Gen *lin-4* entdeckt, welches bei der Entwicklung der Larve des Nematodenwurms *C. elegans* eine Rolle spielt. Dieses Gen kodiert nicht nur für ein Protein, sondern bringt auch eine kleine RNA hervor, die einen komplementären Bereich in der 3'UTR des *Lin-4* Gens hat. Es konnte gezeigt werden, dass diese kleine RNA sich an die 3'UTR der *lin-4* mRNA lagert und die Translation des Proteins verhindert (Lee et al., 1993). 2001 wurden schließlich von verschiedenen Gruppen unabhängig voneinander weitere kleine RNAs entdeckt und als neue Familie der miRNAs zusammengefasst (Ruvkun, 2001).

MiRNAs sind 19-22 Nukleotid-lange, endogene, einzelsträngige RNA Moleküle, welche die Stabilität und/oder die Translationseffizienz einer mRNA beeinflussen können (Flynt & Lai, 2008). Im humanen Genom konnten bislang über 45000 potentielle miRNA Bindestellen in der 3'UTR von mRNAs identifiziert werden. Es kann davon ausgegangen werden, dass mindestens 60% der Protein-kodierenden Gene durch miRNAs beeinflusst werden (Friedman et al., 2009). MiRNAs regulieren fast jeden zellulären Prozess, wie z.B. den Zellzyklus (Bueno & Malumbres, 2011), die Proliferation (Bueno et al., 2008), diverse Signalkaskaden (Inui et al., 2010) und die Differenzierung (Bentwich, 2005). Zudem ist bekannt, dass die Dysregulation von miRNAs zur Entwicklung verschiedener Krankheiten führt (Esteller, 2011).

## 2.2.2 Biogenese von miRNAs

Die Biogenese der reifen einzelsträngigen miRNAs ist in Abbildung 14 dargestellt und kann auf zwei verschiedenen Wegen erfolgen. Zum einen können miRNAs von unabhängigen miRNA Genen durch die RNA Polymerase II transkribiert werden (Lee et al., 2004). MiRNA Gene kommen im Genom entweder einzeln vor oder können sogenannte Cluster formen, die zusammen als polycistronische Transkriptionseinheit transkribiert werden. Die *primary miRNA* (pri-miRNA) kann aus über 1000 Nukleotiden bestehen und trägt wie die meisten eukaryotischen mRNAs einen Poly-A-Schwanz am 3'-Ende, sowie ein 7-Methylguanosin-Cap am 5'-Ende (Kim, 2005). Sie wird durch den Drosha-DGCR8 Komplex in die ~70 Nukleotid lange *precursor miRNA* (pre-miRNA) weiter verarbeitet. Pre-miRNAs können auch durch

Spleißen aus Introns Protein-kodierender Gene (Mirtrons) entstehen. Die pre-miRNA wird über Exportin-5 in Anwesenheit von Ran-GTP aus dem Zellkern ins Zytoplasma transportiert und dort durch die RNase III Endonuklease Dicer in einen ~20 Nukleotid langen miRNA/miRNA\* Doppelstrang (dsRNA) prozessiert. Diese kurzlebige dsRNA wird durch eine Helikase entwunden und der reife miRNA Strang wird zusammen mit Proteinen der Argonaut (AGO1-4)-Familie in den sogenannte *miRNA-induced silencing complex* (miRISC) eingebaut, wobei der komplementäre miRNA (miRNA\*) Strang abgebaut wird. Manchmal bleiben jedoch beide Stränge erhalten und werden funktionell genutzt. Im RISC werden miRNAs zu den Ziel mRNAs gebracht und vermitteln dort die translationale Inhibition oder den Abbau der mRNA in P-Bodies (*processing bodies*) im Zytoplasma (Krol et al., 2010). Allerdings ist auch bekannt, dass miRNAs die Translation von mRNAs aktivieren und die mRNA stabilisieren können (Fabian et al., 2010).



**Abbildung 14: MiRNA Biogenese**

Im Zellkern erfolgt die Transkription der miRNA kodierenden Gene. Die pri-mRNA wird durch den Enzymkomplex Drosha-DGCR8 in die pre-miRNA prozessiert. Aus Mirtrons entsteht durch Spleißen die pre-miRNA, die durch Exportin-5 ins Zytoplasma exportiert und dort von Dicer im *RISC loading complex* (RLC) geschnitten wird. Der miRNA/miRNA\* Doppelstrang wird durch Proteine der Argonaut (AGO) Familie entwunden und über das RNA-binde Protein TRBP in den *RNA-induced silencing complex* (RISC) geladen. Die Genregulation erfolgt durch die Bindung der miRNA an die mRNA und führt zur Hemmung oder Aktivierung der Translation, dem Abbau der mRNA oder der Translokation der mRNA in die Peripherie (O'Carroll & Schaefer, 2013).

### 2.2.3 Mechanismen der Genregulation

MiRNAs interagieren mit der Ziel-mRNA über exakte Basenpaarung in der sogenannten *seed* Region (Basen 2 bis 7, beginnend vom 5' Ende) (Bartel, 2009). Die komplementären miRNA-Bindestellen sind meistens in der 3'UTR der mRNA lokalisiert (Lai, 2002). Kürzlich konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass miRNAs auch in der 5'UTR oder der kodierenden Region binden können und dass diese miRNAs meistens die Translation der mRNA aktivieren (Da Sacco & Masotti, 2012).

In Abbildung 15 sind die verschiedenen Mechanismen der miRNA-vermittelten Genregulation dargestellt. Der Translationsprozess kann in drei Phasen eingeteilt werden: Initiation, Elongation und Termination. Die Initiation stellt hierbei den komplexesten Prozess dar. Der Translations-Initiationsfaktor eIF4E erkennt das 5'Cap der mRNA, rekrutiert den eIF4G und bildet den Initiationskomplex. Darüber hinaus bindet eIF4G Poly(A)-Bindeproteine (PABP) und führt eine Zirkularisierung der mRNA herbei. Die Rekrutierung der ribosomalen Untereinheiten 60S und 40S am 5'Ende der mRNA ermöglichen schließlich die Translation der mRNA ausgehend vom AUG Startcodon.

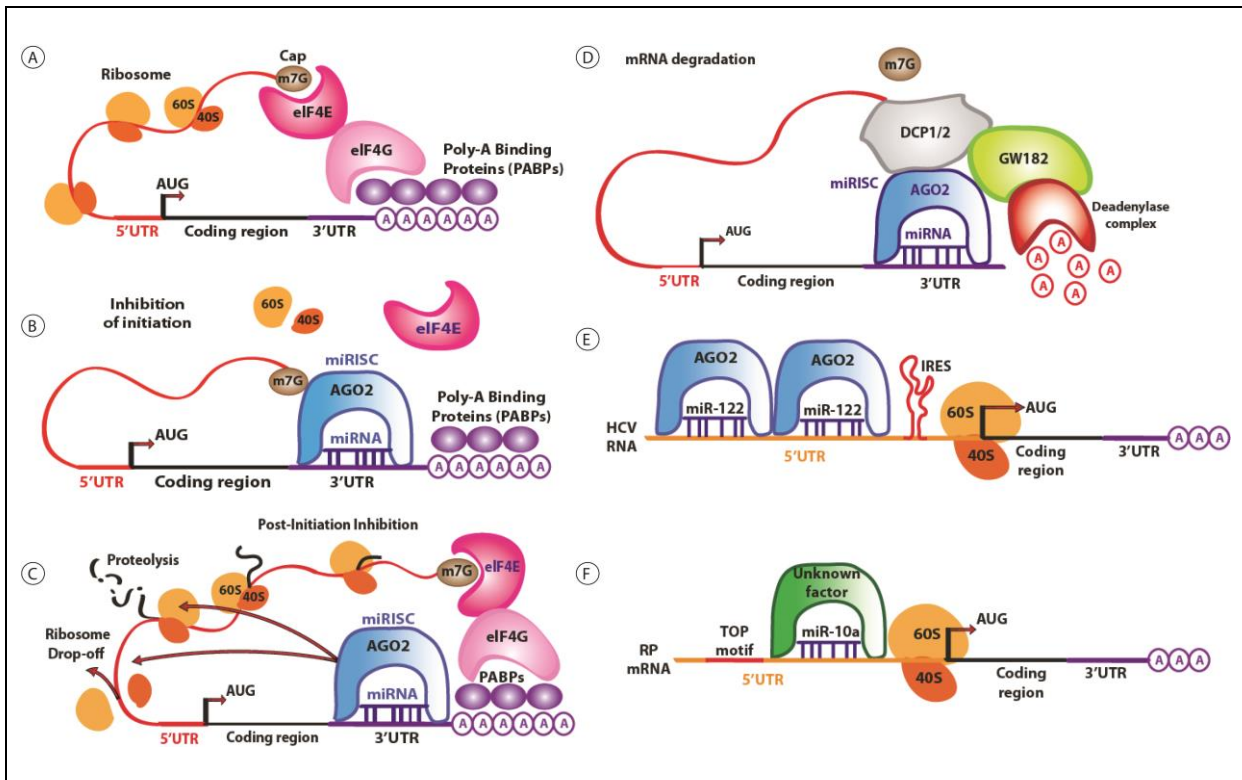
Nach der Bindung des miRISCs an die mRNA kann das AGO2-Protein mit dem eIF4E um die Bindung an der 5'Cap konkurrieren und verhindert somit die Rekrutierung der ribosomalen Untereinheiten und damit die Translation (Abbildung 15 B).

MiRNAs können die Translation aber auch an einem Post-Initiierungsschritt regulieren, indem sie ein vorzeitiges Abfallen der Ribosomen von den mRNAs induzieren. Dieser Ribosomen *Drop-off* führt zu einer frühzeitigen Termination der Translation und einem Abbau des unvollständig synthetisierten Proteins (Abbildung 15 C).

Der Abbau der mRNA erfolgt durch die Assoziation von verschiedenen Proteinen mit AGO2. Das Enzym DCP1/2 entfernt die 5'Cap der mRNA, GW182 interagiert mit dem Deadenylase Komplex und verstärkt die Deadenylierung, was schließlich zum Abbau der mRNA führt (Abbildung 15D). Man geht davon aus, dass der Abbau der mRNAs in P-Bodies und Stress-Granula erfolgt (Peters & Meister, 2007). In diesen cytoplasmatischen Aggregaten können reprimierte mRNAs auch gelagert und so der Translationsmaschinerie entzogen werden.

MiRNAs können die Translation einer mRNA auch stimulieren. Die leberspezifische miR-122 kann zum Beispiel in der 5'UTR einer Virus mRNA binden und durch eine interne Ribosomen-Eintrittsstelle (IHRES) die Translation vermitteln. Dabei begünstigt die miRNA vermutlich die Bildung des Translations-Initiationskomplexes (Henke et al., 2008). Weiterhin scheinen AGO2 Proteine und miR-122 kooperativ die mRNA vor dem Abbau zu schützen, bzw. den Abbau zu verlangsamen und die mRNA zu stabilisieren (Shimakami et al., 2012)(Abbildung 15E).

Weiterhin kann die Translation einer Ribosomen-kodierenden mRNA durch die Bindung von miRNA-10a an das stromabwärts gelegene 5'TOP Motiv in der mRNA verstärkt werden (Abbildung 15F).



**Abbildung 15: Mechanismen der miRNA-vermittelten Genregulation**

Dargestellt sind miRNA-vermittelte Mechanismen der Genregulation. Die Bindung der miRNA erfolgt in der Regel in der 3'UTR der mRNA und führt zur Inhibition der Translation (A, B und C) oder zum Abbau der mRNA (D). Die Bindung der miRNA in der 5'UTR der mRNA kann zur Stabilisation der mRNA beitragen (E) oder die Translation verstärken (F). Details siehe text. (Modifiziert nach Da Sacco & Masotti, 2012)

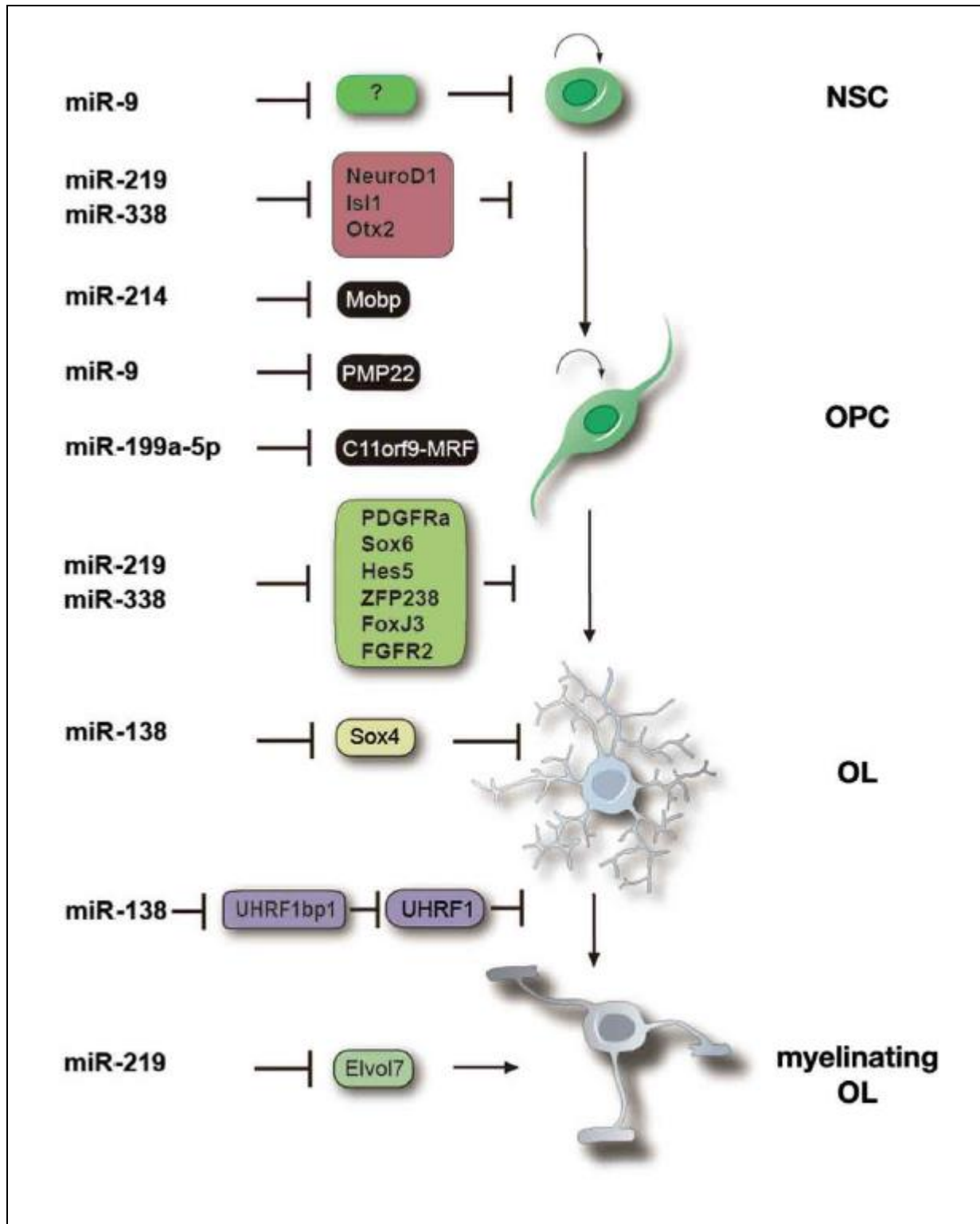
### 2.2.4 MiRNAs in Schwann-Zellen und Oligodendrozyten

Oligodendrozyten und Schwann-Zellen durchlaufen während ihrer Entwicklung verschiedene Differenzierungsstadien. Bislang konnten extrazelluläre Signale und intrinsische Faktoren identifiziert werden, die positiv oder negativ die Differenzierung beeinflussen (siehe 2.1.1.1). In der Regel werden sowohl in Oligodendrozyten als auch in Schwann-Zellen negative Regulatoren im Zuge der Differenzierung herunter reguliert, während positive Regulatoren induziert werden. Dabei ist es wichtig, dass bestimmte Moleküle zu einem bestimmten Zeitpunkt an einer definierten Stelle exprimiert werden. Die Entdeckung der sncRNAs und damit auch der miRNAs ermöglicht die Kontrolle der Genexpression auf posttranskriptioneller Ebene.

In Knockout-Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass die Deletion des miRNA prozessierenden Enzyms Dicer schon im Embryo letal und damit essentiell für die Entwicklung des Organismus ist (Bernstein et al., 2003). Um die allgemeine Wirkung von miRNAs auf differenzierende Oligodendrozyten und Schwann-Zellen zu untersuchen, wurde Dicer in diesen Zellen spezifisch ausgeschaltet. Die Deletion von Dicer in Oligodendrozyten und Schwann-Zellen führt zu einer vermehrten Proliferation an glialen Vorläuferzellen und

einer Demyelinisierung bzw. abnormalen Ausbildung des Myelins (Bremer et al., 2010; X. Zhao et al., 2010). In der letzten Zeit konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass viele Gene in myelinisierenden Gliazellen von miRNAs posttranslational reguliert werden (Barca-Mayo & Lu, 2012; Dugas & Notterpek, 2011; Emery, 2010; He et al., 2012; Zhao et al., 2010). Microarray Profilanalysen von primären Oligodendrozyten aus humanen embryonalen Stammzellen und neonatalen Rattengehirnen zeigten, dass die Expression vieler miRNAs während der Differenzierung zeitlich verändert ist (Lau et al., 2008; Letzen et al., 2010). In Abbildung 16 sind einige miRNAs dargestellt, die verschiedene Entwicklungsstadien der Oligodendrozyten beeinflussen. Die Expression von miR-9 in OPCs gegenüber reifen Oligodendrozyten ist stark erhöht. Darüber hinaus scheint miR-9 in Oligodendrozyten mit der 3'UTR von PMP22 zu interagieren und die Translation der mRNA zu unterdrücken. Obwohl die PMP22 mRNA in Oligodendrozyten zu finden ist, kann das Protein nicht detektiert werden. In Schwann-Zellen hingegen kann miR-9 nicht nachgewiesen werden (Lau et al., 2008). Dort ist miR-29a an der posttranslationalen Regulation von PMP22 beteiligt (Verrier et al., 2009). Man geht davon aus, dass miR-9 nicht nur die Expression von GFAP (Krichevsky et al., 2006), sondern auch von anderen nicht-oligodendroglialen Proteinen reprimiert und die oligodendrogliale Entwicklungslinie aufrechterhält. MiR-138, miR-219 und miR-338 fördern die Differenzierung von Oligodendrozyten, indem sie die Expression von Differenzierungs-Inhibitoren (z.B. Hes5, Sox6 und Sox4), sowie Proliferationsmolekülen (z.B. PDGFR $\alpha$  und FGFR) und neuronalen Differenzierungsfaktoren (z.B. Zfp238 und FoxJ3) inhibieren (Dugas et al., 2010; Zhao et al., 2010). Die 3'UTR des humanen C11orf9 enthält 3 potentielle Bindestellen für miR-199-5p. C11orf9 gehört zur MRF-Familie und ist an der Expression der Myelinproteine MBP und MOG beteiligt. Da miR-199-5p während der Differenzierung der Oligodendrozyten herunter reguliert wird, könnte diese miRNA die Expression der Myelinproteine und die Myelinisierung initiieren (Letzen et al., 2010). Das Myelinprotein MOBP könnte durch miR-214 reguliert werden. Diese miRNA wird während der Oligodendrozytendifferenzierung herunterreguliert und besitzt eine potentielle Bindestelle in der 3'UTR der MOBP mRNA (Letzen et al., 2010). Allerdings müssen noch Studien durchgeführt werden, die eine direkte Interaktion und Regulation von miR-199-5p und miR-214 auf C11orf9 und MOBP nachweisen.





**Abbildung 16: MiRNAs kontrollieren verschiedene Stadien der Oligodendrozyten-Differenzierung und Myelinisierung**

Dargestellt sind spezifische miRNAs, die den Übergang einer neuronalen Vorläuferzelle (NSC) zur Oligodendrozyten-Vorläuferzelle (OPC), die Differenzierung zum Oligodendrozyten (OL) und schließlich die Reifung zum myelinisierenden Oligodendrozyten kontrollieren. Das Expressionsmuster der miRNAs korreliert meist mit der Funktion im jeweiligen Entwicklungsstadium des Oligodendrozyten (Barca-Mayo & Lu, 2012).

Die umfassende Bedeutung der miRNAs im Nervensystem, einschließlich der myelinisierenden Zellen im ZNS und PNS, weist darauf hin, dass diese kleinen Regulatoren nicht nur während der Entwicklung eine Rolle spielen, sondern auch an der Aufrechterhaltung eines gesunden Nervensystems beteiligt sind. In demyelinisierenden Krankheiten, wie z.B. der Multiplen Sklerose, ist unter anderem die Differenzierung der Oligodendrozyten gestört, sodass kein funktionelles Myelin mehr gebildet werden, welches für die Remyelinisierung nötig wäre. Um neue Behandlungsmöglichkeiten zu entwickeln, müssen neue miRNA Targets identifiziert werden und Veränderungen der miRNA Expression in MS Patienten untersucht werden. Es gibt bereits verschiedene Datenbanken, die eine Vielzahl potentieller miRNA Bindestellen in mRNAs identifizieren, welche aber noch experimentell validiert werden müssen. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass die am häufigsten vorkommenden miRNAs in reifen Oligodendrozyten, miR-219 und miR338, in chronischen inaktiven MS Läsionen stark herunter reguliert sind (Junker et al., 2011). Diese beiden miRNAs sind, wie bereits beschrieben, an der Differenzierung von Oligodendrozyten und der Myelinisierung beteiligt. Allerdings muss hier noch geklärt werden, ob die reduzierten miRNA Mengen zur Pathogenese von MS beitragen. Weiterhin könnten miRNAs als Biomarker eingesetzt werden um bei der Diagnose von Krankheiten beizutragen (Gandhi et al., 2013).

### **2.3 Zielsetzung**

Um den Prozess der (Re)-Myelinisierung besser zu verstehen, soll in dieser Arbeit die differentielle Genregulation des essentiellen Myelinproteins MBP (Myelin basische Protein) in Gliazellen untersucht werden. Im ZNS wird MBP mRNA in Oligodendrozyten zur axo-glialen Kontaktstelle in RNA Granula in einem inaktiven Zustand transportiert, lokal translatiert und schließlich in die Myelinmembran eingebaut. Die molekularen Mechanismen der translationalen Hemmung während des zytoplasmatischen Transports ist bislang nur unzureichend verstanden. In dieser Arbeit soll eine kleine regulatorische RNA (sncRNA) untersucht werden, die an der Regulation des MBP Proteins beteiligt sind und die Translation der MBP mRNA während des Transports inhibiert. Da im Gegensatz zum ZNS, im PNS nur wenig über die Lokalisation von MBP mRNA bekannt ist, sollen dort in Schwann-Zellen mögliche Transportmechanismen identifiziert werden. In demyelinisierenden Krankheiten wie der Multiplen Sklerose ist unter anderem die Reifung von glialen Vorläufermolekülen gestört, sodass kein Myelin mehr gebildet werden kann.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Geräte, Materialien und Reagenzien

##### 3.1.1 Geräte

Tabelle 1: Verwendete Geräte

	Hersteller	Bezeichnung
Zentrifugen	Eppendorf	Centrifuge 5415R
	Heraeus	Labofuge 6000
		Megafuge 1.0R
Mikroskop	Olympus	40x Objektiv (UPlanFLN; NA= 0,75)
		60x Ölobjektiv (UPlanSApo; NA= 1,35)
		IX81 Mikroskop
		Fluoreszenz CCD-Kamera XM10
		cell^F Software
PCR-Gerät	Eppendorf	Mastercycler Personal
RT-PCR-Gerät	Roche Applied Science	Light Cycler 1.5
Agarosegel Imager	Biorad	Chemi Doc XRS+
Western Blot Imager		
SDS-Page/ Western Blot Kammer		
Heizblock	Techne	DRI-Block DB2D
Spectrophotometer	PeqLab	Nanodrop 2000
Mikrotiterplatten-Leser	TECAN	Infinite F200
		Infinite M1000
Thermomixer	Eppendorf	Thermomixer comfort
Rotationsrad	LabNet	Revolver Rotator
Zellinkubator	Thermo Scientific	HeraCell 240
Hybridisierungsoven und Crosslinker	UVP	HL-2000 HybriLinker Hybridization Oven
Transfektionsgerät	Lonza	4D Nucleofector mit Y-Unit
Software	Microsoft	Excel
	Universität Bielefeld BiBiServ	RNAhybrid tool
	Adobe	Photoshop CS4
		Illustrator CS4
	Pfaffl, Horgan, Vainstein, Avery	REST- gene regulation
	BioRad	ImageLab 2.0

### 3.1.2 Materialien

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

### 3.1.3 Reagenzien

Tabelle 2: verwendete Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller
Sieve GP Agarose	Biozym
Agarose NEEO Ultra-Qualität	Roth
NuPAGE LDS Sample Buffer (4x)	Invitrogen
Roti Stock 20x SSC	Roth
Papain-Suspension	Whirlington
Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP Substrate	Millipore
Roti Histofix (PFA)	Roth
ELF 97 mRNA <i>In-situ</i> -Hybridization Kit	Molecular Probes
Staurosporin	Sigma Aldrich
Ampicillin Natriumsalz	AppliChem
Milchpulver	Roth
ECL Lösung	Immobilon (Promega)
RNaseZap	Roth
ULTRAHyp	Ambion

### 3.2 Lösungen, Puffer und Medien

Tabelle 3: Verwendete Lösungen, Puffer und Medien

Allgemeine Puffer und Lösungen	
PBS	150 mM NaCl; 8 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 1,7 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; pH 7,2
TBS	150 mM NaCl ; 50 mM Tris , pH 7,2
TBST	TBS + 0,1% (v/v) Tween 20
Allgemeine Medien	
SOC-Medium	2% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl <sub>2</sub> ; 10 mM MgSO <sub>4</sub> ; 20 mM Glucose
LB-Medium	20 g Trypton; 20 g NaCl; 10 g Hefe-Extrakt; mit H <sub>2</sub> O auf 2 l auffüllen
Molekularbiologie	
50 x TAE Puffer	242 g Tris (2M); 100 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 (50mM); 57,1 ml Essigsäure; auf 1l mit ddH <sub>2</sub> O auffüllen
4% Agarosegel	3% Sieve GP Agarose; 1% Agarose NEEO Ultra-Qualität; in 1x TAE aufkochen
Proteinbiochemie	
Lyse Puffer	50mM Tris; 150mM NaCl; 1mM EDTA; 1%(v/v) Triton X-100
Western Blot Transfer	24 mM Tris; 192 mM Glycine; 20% Ethanol abs.; in ddH <sub>2</sub> O

Puffer	
Blockierlösung	4% (w/v) Milchpulver in TBST
SDS Laufpuffer	10x Rotiphorese von Roth 1:10 mit ddH <sub>2</sub> O verdünnen
<b>Zellkultur</b>	
10 x Poly-L-Lysine (PLL)	1 g Poly-L-Lysin wird in 1 l sterilem dH <sub>2</sub> O gelöst
Sato (Oli-neu)	13,4 g/l DMEM; 2 g/l NaHCO <sub>3</sub> ; 0,01 g/l Transferrin; 100 µg/l; Insulin; 100 µM Putrescine; 200 nM Progesteron; 500 nM TIT; 220 nM Na-Selenite; 520 mM L-Thyroxin; 0,05% Gentamycin; 2% (v/v) HS
Super-Sato: (primäre Oligodendrozyten)	13,4 g/l DMEM; 2 g/l NaHCO <sub>3</sub> ; 20 ml/l B27 Zusatz; 0,011 % Pyruvate; 500 nM TIT; 520 mM L-Thyroxin; 0,05 % Gentamycin; 1% (v/v) HS oder FCS
Papain-Lösung	30 U/ml Papain; 0,24 mg/ml L-Cystein, 40µg/ml DNaseI Typ IV; in 1x MEM verdünnen und steril filtrieren mit 0,2 µm Filter
DMEM+HS/FCS+P/S	DMEM; 10% FCS (Ratte) oder HS (Maus); 1% P/S
Kultivierungsmedium (primäre Schwann-Zellen)	DMEM/F-12; 10 µg/ml Insulin; 20 ng/ml NRG1 Typ III; 100 µM dbcAMP; 0,5% HS (Maus) oder FCS (Ratten); 0,035% BSA; 4 mM Glutamin; 100U/ ml Pen/Strep; 1 µM Sodium Selenite; 18,2 µM Putrescin; 0,2 µM Progesteron; 0,1 mg/ml Transferrin; 38 ng/ml Dexamethasone, 15 nM TIT, 0,5 µM L-Thyroxin
Differenzierungsmedium (primäre Schwann-Zellen)	Proliferationsmedium + 2 mM dbcAMP
Kultivierungsmedium IMS32	DMEM; 4 mM Glutamin; 10% FCS
Trypsin/ EDTA	0,01% Trypsin, 0,02% EDTA in HBSS <sup>-</sup>
DMEM 10%HS	DMEM + 10% HS
Mowiol	7,2 g Mowiol 4-88; 18 g Glycerol; 18 ml H <sub>2</sub> O; 36 ml 0,2 M Tris
<b>In-Situ Hybridisierung</b>	
Hybridisierungspuffer (sncRNA FISH)	25% Formamid; 0,05 M EDTA; 4x SSC; 10% Dextransulfat; 1x Denhardt's Solution; 0,5 mg/ml Yeast tRNA; 10 mM RVC
Post-fixation Solution (sncRNA FISH)	4% Formamid; 0,5% BSA; 1x PBS
Waschpuffer (Stellaris FISH)	2x SSC; 10% Formamid; DEPC
Hybridisierungspuffer (Stellaris FISH)	1g Dextarnsulfat; 1 ml 20x SSC; 1 ml Formamid; mit DEPC auf 10 ml auffüllen
<b>Northern Blot</b>	
UltraPure™ TBE Puffer	1x UltraPure™ TBE Puffer in DEPC
Tween Puffer	150 mM NaCl ; 100 mM Tris,/HCl; 1% Tween20; in DEPC, pH 7,5
AP Puffer	100 mM Tris/HCl; 100 mM NaCl; 5 mM MgCl <sub>2</sub> in DEPC
Blockierpuffer	100 mM Tis/HCL; 150 mM NaCl; pH7,5; 1% Blockierreagenz

### 3.3 Antikörper

#### 3.3.1 Primärantikörper

Tabelle 4: Verwendete Primärantikörper

Antigen	Spezies	Verdünnung	Hersteller
MBP	Ratte	1:1000 WB; 1:100 IZC	Serotec
MOG	Maus	1:1000 WB; 1:100 IZC	C. Linington, Glasgow
GAPDH	Kaninchen	1:5000 WB;	Bethyl
NG2	Ratte	1:100 WB	J. Trotter, Mainz
CNP	Maus	1:500 WB; 1:100 IZC	Sigma
MAG 513	Maus	1:50 IZC	J. Trotter, Mainz
Sox10	Meerschweinchen	1:2000 IZC	M. Wegner, Erlangen
hnRNP A2/B1	Maus	1:1000 WB; 1:200 IZC	Sigma
hnRNP A2 (Ef-67)	Maus	3,2 µg (Schwann-Zell-IP)	Santa Cruz
		22,5 µg (Oli-neu-IP)	W. Rigby, Hannover
IgG <sub>2A</sub>	Maus	3,2 µg IP	Invitrogen

WB: Western Blot; IZC: Immunzytochemie; IP: Immunpräzipitation;  
ISH: In-situ-Hybridisierung

#### 3.3.2 Sekundärantikörper

Tabelle 5: Verwendete Sekundärantikörper

Spenderspezies	Zielspezies	Konjugation	Verdünnung	Hersteller
Ziege	Ratte	HRP	1:10000 WB	Dianova
Ziege	Maus	HRP	1:10000 WB	Dianova
Ziege	Kaninchen	HRP	1:10000 WB	Dianova
Ziege	Maus	Alexa568	1:400 IZC	Invitrogen
Ziege	Ratte	Cy5	1:300 IZC	Dianova
Ziege	Ratte	Cy3	1:300 IZC	Dianova
Ziege	Meerschweinchen	Cy5	1:100 IZC	Dianova
Schaf	Digoxigenin	AP	1:200 ISH; 1:7500 NB	Roche
Ziege	Biotin	AP	1:2000	Cell signalling

WB: Western Blot; IZC: Immunzytochemie; NB: Northern Blot; ISH: In situ Hybridisierung

### 3.4 Plasmide, Primer, LNA-Sonden, 715-Mimic und 715-Inhibitor

Die verwendeten Primer für die *QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis* wurden von der Firma Invitrogen bezogen.

Tabelle 6: Verwendete Mutagenese-Primer

Primer-Sequenz	Name
5'GACTCCGGAGGTTTCAGGTGAATTCACACCCTCCAAGTTCACC3'	Mutation (fw) Primer
5'GGTGAAGGTTGGAAGGGTGTGAATTCACCTGAACCTCCGGAGTC3'	Mutation (rev) Primer

Die qPCR Primer (Invitrogen) und die dazugehörige Sonde (Roche Applied Science) sind in der folgenden Tabelle aufgeführt und wurden mit Hilfe des Universal ProbeLibrary Assay Design Center (Roche Applied Science) entworfen.

**Tabelle 7: Verwendete qPCR Primer und Sonden**

Primer-Sequenz	Primer Name	Primer Spezies	Sonde	Amplikonlänge bp
5' AACATTGTGACACCTCGAACA3'	MBP	Maus	58	88
5' TGTCTCTTCTCCCCAGCTA3'				
5' GAA-AGCAGAGTGAGCCCTTC3'	G6PDH	Maus	78	81
5' CATAGGAATTACGGGCAAAGA3'				
5' AAATTCTGTGACTACGGGAAGG3'	CNP	Maus	29	75
5' GCCATACGATCTTCCACCAC3'				
5' TGACAGGATGCAGAAGGAGA3'	β-Aktin	Maus	106	75
5' CGCTCAGGAGGAGCAATG3				
5' AAGGGATTCAAGGGAGTCG3'	MBP	Mensch	37	78
5' TCCAGAGCGACTATCTTCTCCT3'				
5' CCAACCGCGAGAAGATGA3'	β-Aktin	Mensch	64	97
5' CCAGAGGCGTACAGGGATAG3'				
5' TGAGTACTTCGAAATGTCCGTTTC3'	<i>Firefly</i> Luziferase		29	60
5' GTATTCAGCCATATCGTTTCAT3'				
5' GGAGAATAACTTCTTCGTGGAAAC3'	<i>Renilla</i> Luziferase		145	75
5' GCTGCAAATTCTTCTGGTTCTAA3'				

Die verwendeten Sonden und sncRNAs sind in der folgenden Tabelle dargestellt. Die Kontroll-siRNA *AllStars Negative Control* wurde von der Firma Qiagen bezogen.

**Tabelle 8: Verwendete Sonden und sncRNAs**

Sequenz der sncRNA und Sonde	Name	Hersteller
5' C-UCCGUGCACACCCCCGCGUG3'	715-Mimic	Qiagen
5' CACGCGGGGGTGTGCACGGAG3'	715-inhibitor	Qiagen
5' CACGCGGGGGTGTGCACGGAG3'	3'DIG-715-LNA-Sonde	Exiqon

Alle verwendeten Plasmide sind in der folgenden Tabelle dargestellt. Zusätzlich wurde mit dem *QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis* Kit ein *Firefly* Luziferase Reporter Konstrukt mit mutierter sncRNA-715 Bindestelle in der MBP 3'UTR hergestellt (3.15).

**Tabelle 9: Verwendet Plasmide**

Plasmid	Hersteller
715-GFP-hairpin Plasmid (Mmir3110-MR04)	GeneCopoeia
Kontroll-GFP-hairpin (Plasmid CmiR0001-MR04)	GeneCopoeia
pEGFP-C3	Clontech
MBP14-IRES-GFP (MBP14-3'UTR)	M. Simons, Göttingen
Wildtyp <i>Firefly</i> Luziferase Reporter mit Teilen der MBP 3'UTR	R. White, Mainz
<i>Renilla</i> Luziferase Reporter	Promega

## 3.5 Zellkultur

### 3.5.1 Kultivierung von Oli-*neu* Zellen

Oli-*neu* ist eine oligodendrogliale immortalisierte Vorläuferzelllinie. Zur Herstellung wurden primäre Oligodendrozyten aus der Maus mit einem replikationsdefekten Retrovirus infiziert, welcher aus dem Überstand der Zelllinie *GPE-neu* stammte und den Transfer des *t-neu* Onkogens vermittelte (Jung et al., 1995). Oli-*neu* Zellen exprimieren das *t-neu* Onkogen und können sich im Gegensatz zu primären Oligodendrozyten häufig teilen und lassen sich in Zellkultur mit dem entsprechenden Medium nahezu unbegrenzt vermehren.

Die Kultivierung der Oli-*neu* Zellen erfolgte in Sato Medium bei 37 °C und 7,5% CO<sub>2</sub> (Trotter and Schachner, 1989). Die Zellen wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Jaqueline Trotter (Molekulare Zellbiologie, Mainz) zur Verfügung gestellt. Zum Passagieren der Zellen wurden diese in 0,01% Trypsin-EDTA inkubiert und anschließend mit 4°C kaltem DMEM/10% HS von dem Kulturgefäß abgelöst. Dieser Schritt stoppt die Reaktion der Protease und verhindert die Schädigung der Zellen. Die Zellsuspension wurde bei 900rpm und 4°C für 10 min pelletiert. Das Zellpellet wurde in diesem Kultivierungsmedium aufgenommen und auf PLL-beschichtete Kulturgefäße plattiert.

### 3.5.2 Präparation und Kultivierung primärer Oligodendrozyten

Zur Präparation primärer Oligodendrozyten wurden 6 neugeborene oder ein Tag alte Mäuse oder Ratten getötet und dekapitiert. Nach der Öffnung des Schädels wurden die Gehirne steril entnommen und in ein mit kaltem HBSS gefülltes Gefäß gelegt. Nach der sorgfältigen Entfernung der Meningen wurden das Mittelhirn und die beiden Hemisphären in 1x MEM überführt und gewaschen. Anschließend wurden die Gehirne in 4 ml Papain Lösung bei 37°C für 90 min inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Gehirne mit 10 ml DMEM+HS/FCS+P/S gewaschen und bei 900rpm für 5 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in DMEM+HS/FCS+P/S aufgenommen und vorsichtig 4-mal mit einer Nadel der Größe 19 Gauge und 4-mal mit einer Nadel der Größe 23 Gauge trituriert. Diese Zellsuspension wurde auf zwei (Maus) bzw. auf vier (Ratten) PLL-beschichtete T75 Flaschen verteilt und bei 37 °C und 7,5% CO<sub>2</sub> inkubiert. In den Flaschen bildete sich nach ungefähr 10 bis 12 Tagen ein dichter Astrozytenrasen, auf dem sich Mikroglia-Zellen und Oligodendrozyten-Vorläuferzellen absetzen. Die Mikroglia wurden durch mikroskopische Kontrolle in dem Kultivierungsmedium abgeklopft und abgesaugt. Die restlichen Zellen in der Kultivierungsflasche wurden mit 10 ml frischem BME<sup>+</sup> Medium einmal gewaschen. Nach der Zugabe von frischem BME<sup>+</sup> Medium wurden die Oligodendrozyten durch horizontales kräftiges schütteln von dem Astrozytenrasen gelöst. Um eine möglichst reine Oligodendrozytenkultur zu erreichen, musste bei diesem Schritt darauf geachtet werden, dass sich der Astrozytenrasen nicht vom Flaschenboden löst. Der Überstand wurde durch ein 100 µm Zellsieb getropft und anschließend bei 900rpm für 10 min bei RT zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 2 ml Super-Sato Medium aufgenommen, resuspendiert und für 30s in eine 3,5 cm Zellkulturschale zum Absetzen der Mikroglia pipettiert. Der Überstand wurde abgenommen, gezählt und in ein mit PLL-beschichtetes



Kulturgefäß oder Deckglas in Super-Sato Medium plattiert und bei 37 °C und 7,5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

### 3.5.3 Kultivierung der Schwann-Zelllinie IMS32

IM32 ist eine spontan immortalisierte Schwann-Zelllinie aus der Maus (Watabe et al, 1995). Die Zellen wurden freundlicherweise von Dr. Xavier Fontana (MRC-LMCB, London) zur Verfügung gestellt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in DMEM (4mM L-Glutamin + 10% FCS) bei 37 °C und 7,5% CO<sub>2</sub> im Inkubator. Zum Passagieren der Zellen wurden diese in 0,25% Trypsin-EDTA inkubiert und anschließend mit 4°C kaltem DMEM/10% FCS von dem Kulturgefäß abgelöst. Die Zellsuspension wurde bei 900rpm und 4°C für 10 min pelletiert. Das Zellpellet wurde in das Kultivierungsmedium aufgenommen und auf Kulturgefäße plattiert.

### 3.5.4 Kultivierung von primären Schwann-Zellen aus der Ratte

Primäre Schwann-Zellen aus der Ratte wurden freundlicherweise von Dr. Xavier Fontana (MRC-LMCB, London) zur Verfügung gestellt. Zur Proliferation wurden die Zellen im Proliferationsmedium bei 37 °C und 7,5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Zum Passagieren der Zellen wurden diese in 0,25% Trypsin-EDTA inkubiert und anschließend mit 4°C kaltem DMEM/10% FCS von dem Kulturgefäß abgelöst. Die Zellsuspension wurde bei 900rpm und 4°C für 10 Minuten pelletiert. Das Zellpellet wurde in das Kultivierungsmedium aufgenommen und auf PLL-beschichtete Kulturgefäße plattiert.

Im Gegensatz zu primären Oligodendrozyten differenzieren Schwann-Zellen in Kultur nicht in Abwesenheit von Neuronen zu reifen, MBP-produzierenden Zellen. Weder NRG1-III noch cAMP alleine können die Differenzierung der Schwann Zellen in Kultur induzieren. Dabei ist die Konzentration an intrazellulärem cAMP entscheidend, ob NRG1-III die Proliferation oder die Differenzierung von Schwann-Zellen fördert. Niedrige cAMP Mengen induzieren NRG1-III vermittelte Proliferation von Schwann-Zellen, während die Erhöhung des cAMP Mengen die Differenzierung einleitet (Arthur-Farraj et al., 2011). Das Kultivierungsmedium der undifferenzierten, primären Schwann-Zellen enthielt 20ng/ml NRG1-III und 100µM dbcAMP. Die Differenzierung der Schwann-Zellen wurde von Dr. Xavier Fontana (MRC-LMCB, London) durchgeführt. Dazu wurde Konzentration von dbcAMP im Kultivierungsmedium auf 2mM erhöht. In diesem Differenzierungsmedium wurden die Zellen für 5 Tage kultiviert. Anschließend wurden die Zellen lysiert bzw. in Qiazol aufgenommen und nach Mainz versendet und die Proteine im Western Blot bzw. die RNA mit Hilfe der quantitativen Realtime-PCR analysiert.

### 3.6 Autopsie Material

Die Entnahme des Autopsie Materials erfolgt von Mitarbeitern der Niederländische Hirnbank unter der Leitung von Dr. I Huitinga (Niederländische Hirnbank, Amsterdam). Es wurden die Gehirne von 4 verstorbenen MS Patienten direkt nach der Autopsie entnommen und in Formalin fixiert. Die MS Gewebeproben wurden aufgrund eines postmortalen MRI (*Magnetic Resonance Imaging*) identifiziert. Die Klassifizierung erfolgte nach histopathologischen Standardkriterien (van der Valk and de Groot, 2000). Alle Patienten oder die nächsten

Verwandten des Verstorbenen haben der Autopsie und der Entnahme der Gehirne für Forschungszwecke zugestimmt. Die einzelnen Sektionen wurden von M. Witte unter der Leitung von J. van Horssen (Institut für Molekulare Zellbiologie und Immunologie, Universitätsmedizin Amsterdam) gefärbt (Witte et al., 2009). Um chronische inaktive MS-Läsionen in der weißen Substanz von der normal erscheinenden weißen Substanz (NAWM) zu unterscheiden, wurden Hirnschnitte angefertigt und mit den Antikörpern PLP und MHC II gefärbt. Chronische MS Läsionen sind demyelinisiert und beinhalten keine aktivierten Mikroglia oder infiltrierte Leukozyten. Dementsprechend sind in diesen Bereichen keine PLP<sup>+</sup>- und MHC II<sup>+</sup>-Zellen zu finden. Die NAWM weist in der Regel keine Entzündungszeichen auf und ist normal myelinisiert. Dort sind nur PLP<sup>+</sup>-Zellen vorhanden. Anschließend wurden diese Bereiche in einem weiteren Hirnschnitt gegen Olig2 und MBP immunhistologisch gefärbt. Die Aufnahme der Färbungen erfolgte mit einem Objektiv Plan-Apochromat (1,25x, NA= 0,04 oder 20x, NA=0,7) mit einem Leica DM4000B Mikroskop. Die Detektion erfolgte mit einer DC500 Kamera und der IM50 Software. Alle Geräte wurden von der Firma Leica bezogen. Die Bilder wurden mit Photoshop CS4 (Adobe) bearbeitet.

Zur RNA-Analyse wurden die definierten Bereiche von M. Witte mit einem Skalpell heraus gelöst. Es wurde mindestens 10mg Material gesammelt und bei -80°C gelagert. Die RNA wurde isoliert und gekühlt nach Mainz versendet. Hier wurde dann die cDNA über die Reverse Transkription synthetisiert und die mRNA bzw. sncRNA Mengen in den Proben über quantitative Real-Time PCR bestimmt.

### **3.7 Präparation von Ischiasnerven**

Zur Präparation der Ischiasnerven wurden 1, 4 und 9 Tage alte Mäuse getötet und dekaptiert. Die Ischiasnerven wurden entnommen und direkt in kaltes 1x PBS gelegt. Je nach Versuch wurden die Ischiasnerven entweder in Qiazol (RNA-Analyse, Abschnitt 3.10) oder in Lysepuffer (Protein-Analyse, Abschnitt 3.9) aufgenommen und weiter verarbeitet.

### **3.8 Transfektion**

In diesem Abschnitt sind verschiedene Methoden aufgeführt, mit denen sncRNAs und Plasmide in Zellen eingebracht wurden. Die Transfektionen wurden nach den Protokollen der jeweiligen Hersteller durchgeführt.

#### **3.8.1 SncRNA Transfektion in Oli-*neu* Zellen und primären Oligodendrozyten**

Primäre Oligodendrozyten aus der Maus ( $10^5$ ) bzw. Oli-*neu* Zellen ( $7 \times 10^4$ ) wurden in einer 24-well Platte in 500  $\mu$ l Kultivierungsmedium ausplattiert. Ein Tag später erfolgt die Transfektion der sncRNAs (715-Mimic, 715-Inhibitor oder Kontroll-siRNA) mit den Transfektionsreagenzien Lipofectamine 2000 (Invitrogen) oder Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers. Zuerst wurden pro Ansatz 50  $\mu$ l DMEM mit 1  $\mu$ l Transfektionsreagenz gemischt und 5 min inkubiert. In dieser Zeit wurden 40 pmol der sncRNA in 50  $\mu$ l DMEM verdünnt und nach der Inkubation mit dem Transfektionsansatz gemischt. Nach einer 20 minütigen Inkubation wurde der Ansatz auf die Zellen pipettiert. Nach 6 h wurde ein halber Medienwechsel mit frischem Medium durchgeführt und nach

weiteren 48 h wurden die Zellen entweder fixiert, um mit spezifischen Antikörpern gefärbt zu werden, oder lysiert und mittels Western Blot analysiert.

### 3.8.2 Plasmid Transfektion in *Oli-neu* und IMS32 Zellen

Die Transfektion von *Oli-neu* Zellen und der IMS32 Zelllinie mit Plasmiden wurde mit dem Transfektionsreagenz Fugene HD (Roche Applied Science bzw. Promega) durchgeführt. Dazu wurden pro Ansatz  $7 \times 10^4$  Zellen in 500  $\mu$ l Medium in eine 24-well Platte ausplattiert. Nach 6 h Inkubation wurden die Zellen mit den Plasmiden transfiziert. Dazu wurden 25  $\mu$ l DMEM mit 1  $\mu$ l Fugene und 0,75  $\mu$ g Plasmid-DNA gemischt. Die Ansätze wurden 15 min inkubiert und dann auf die Zellen getropft. Nach 48 h wurden die Zellen entweder fixiert, um immunzytochemisch untersucht zu werden, oder lysiert, um mittels Western Blot analysiert zu werden.

### 3.8.3 Plasmid Kotransfektion in *Oli-neu* Zellen

Im Luziferase Versuch wurden  $10^5$  *Oli-neu* Zellen in einer 6-well Platte in 1,5 ml Medium ausplattiert und 6 h inkubiert. Pro Reaktion wurden 100 ng *Renilla* Luziferase, 250 ng *Firefly* Luziferase und 1650 ng 715-GFP-hairpin oder Kontroll-GFP-hairpin Plasmid zusammen mit 3  $\mu$ l Fugene HD (Roche Applied Science, Promega) und 100  $\mu$ l DMEM gemischt, 15 min inkubiert und anschließend tropfenweise auf die Zellen pipettiert. Nach 48 h wurde der Luziferase Versuch durchgeführt (3.16).

### 3.8.4 Plasmid Transfektion in primäre Oligodendrozyten

Primäre Oligodendrozyten aus der Ratte ( $10^5$ ) wurden in einer 24-well Platte für 3 Tage (3 TIV) kultiviert. Die adhärenen Zellen wurden mit Hilfe des 4D-Nucleofactors (Lonza) nukleofiziert. Dazu wurden 350  $\mu$ l der Nucleofektor Lösung AD1 (Lonza) mit 15  $\mu$ g Plasmid-DNA gemischt und in einem 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß vorinkubiert. Nach Abnahme des Kultivierungsmediums wurde das Gemisch auf die Zellen pipettiert. Anschließend wurde die *Dipping* Elektrode luftblasenfrei in die Lösung getaucht und zusammen mit der 24-well Platte in die Y-Unit des 4D Nucleofactors gestellt. Die Nucleofektion erfolgte mit dem Programm ED158. Nach der Nucleofektion wurde die Elektrode entfernt und die Lösung abgenommen. Auf die nukleofizierten Zellen wurden 250  $\mu$ l konditioniertes und 250  $\mu$ l frisches Medium pipettiert. Nach 6 h wurde ein halber Medienwechsel mit frischem Medium durchgeführt. Nach 48 h wurden die Zellen fixiert und mit spezifischen Antikörpern gefärbt.

## 3.9 Proteinanalyse

### 3.9.1 Herstellung von Zelllysaten

*Oli-neu* Zellen, IMS32 Zellen, primäre Oligodendrozyten und primäre Schwann-Zellen wurden in definierte Mengen an Lyse Puffer (mit Phosphatase- und Protease-Inhibitoren) mit einem Zellschaber aufgenommen. Nach der Präparation des Ischiasnervs und des optischen Nervs wurden diese in Lyse Puffer aufgenommen und mit einem TissueRuptor (Qiagen) zerkleinert. Die Lyse erfolgte auf einem Rotationsrad bei 4°C für 45 min. Nach vollständiger Lyse wurden

die Kernfragmente bei 5000 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde entweder für Immunpräzipitationen oder für Western Blot Analysen verwendet.

### **3.9.2 Bestimmung der Proteinkonzentration**

Die Proteinkonzentration in den einzelnen Lysaten wurde mit Hilfe des BCA-Proteintests (Pierce) bestimmt. Dazu wurden in einer 96-well Platte zunächst eine BSA-Standardreihe (0 bis 1000 µg/ml) in Triplikaten angesetzt. Das Lysat wurde 1:5 verdünnt und ebenfalls in die Platte pipettiert. Die Messung der Proteinkonzentration erfolgte in dem Mikrotiterplatten-Leser M1000 (Tecan) mit der Magellan Software.

### **3.9.3 SDS-PAGE**

Die Proteinlysate wurden mit der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt. Die Gele wurden mit Hilfe des Biorad-Systems selbst hergestellt. Dazu wurde ein 12 %iges Trenngel gegossen. Nach dem Aushärten wurde ein 4 %iges Sammelgel auf das Trenngel gegossen. Die Proben wurden auf das Gel geladen und bei 175 Volt für 50 min aufgetrennt. Als Größenstandard wurde der Precision Plus Protein™ Dual Color Standard (Biorad) verwendet.

### **3.9.4 Western Blot**

Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurden die Proteine mit der Wet-Blot Methode auf eine PVDF Membran übertragen. Zunächst wurde die Membran mit Methanol aktiviert, einmal mit destilliertem Wasser gespült und in Transferpuffer gelegt. Die anderen Bestandteile des Wet-Blots, sowie das Proteingel wurden ebenfalls in Transferpuffer getränkt. Nach Angaben des Herstellers wurde der Blot aufgebaut und bei 120 Volt für 90 min oder 30 Volt ÜN geblottet. Um die Proteine auf der Membran zu detektieren, wurde die Membran in 4% Milchpulver in TBST für 30 min geblockt. Die Primärantikörper wurden in bestimmten Konzentrationen auf die Membran gegeben und 1 h bei RT oder ÜN bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die Membran 3-mal mit TBST gewaschen. Der Sekundärantikörper wurde 1:10000 verdünnt und 30 min mit der Membran inkubiert. Danach wurde die Membran 2-mal mit TBST und 1-mal mit TBS für jeweils 10 min gewaschen. Zur Herstellung der ECL-Lösung wurden ein Teil Luminol Reagenz mit einem Teil Peroxid Reagenz (beides Millipore) gemischt. Die fertige ECL-Lösung wurde auf die Membran pipettiert. Die Detektion der Proteine erfolgte im ChemiDoc Imager (Biorad). Die densitometrische Auswertung erfolgte mit dem Programm Quantity One Version 4.3.0 von BioRad.

## **3.10 RNA Analyse**

### **3.10.1 RNA Extraktion**

Die zu untersuchenden mRNAs und sncRNAs wurden aus primären Oligodendrozyten, primären Schwann-Zellen, Oli-*neu* Zellen, IMS32 Zellen, Astrozyten, Mikroglia und Neuronen sowie aus dem Ischiasnerv und dem optischen Nerven mit dem miRNeasy Mini Kit von Qiagen oder mit dem High Pure miRNA Isolation Kit (Roche Applied Science) nach Angaben

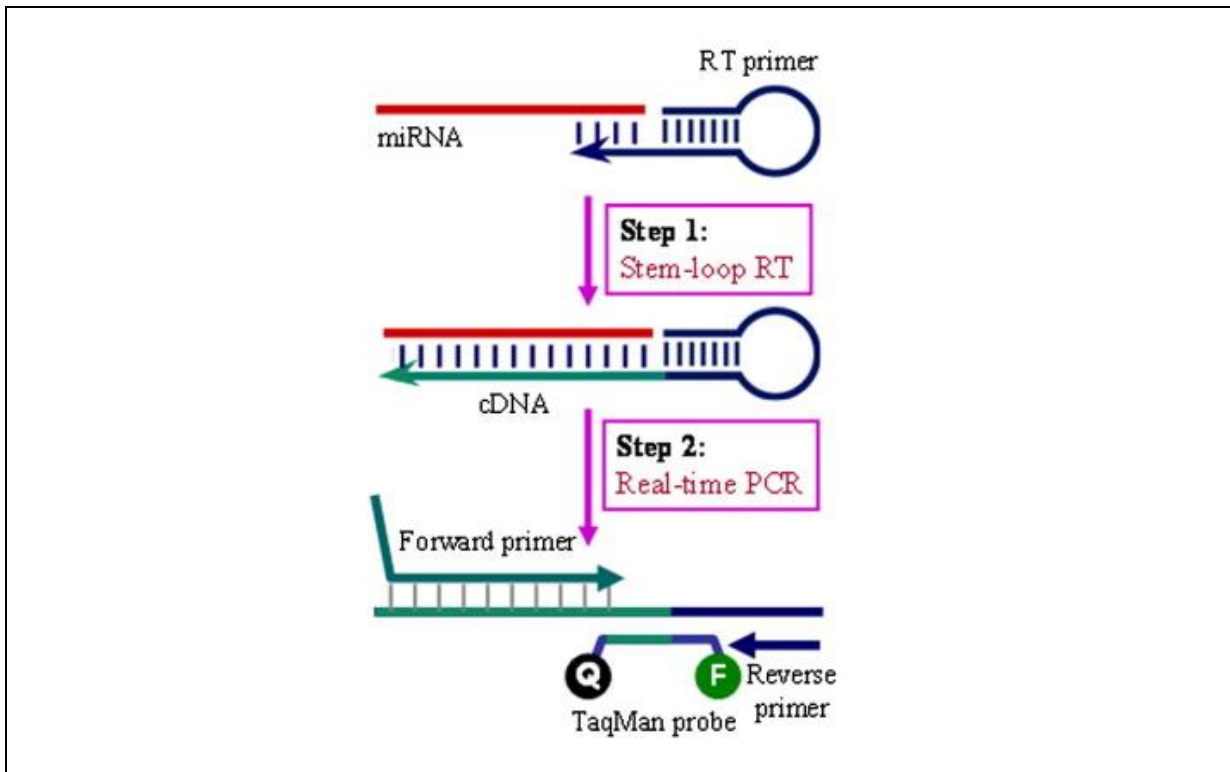
des Herstellers extrahiert. Die Elution erfolgte in 30 µl DEPC. Um eine Verunreinigung mit genomischer DNA zu vermeiden, wurde ein DNase Verdau mit der DNase I (Qiagen) durchgeführt.

Die Mikroglia wurde aus der Oligodendrozyten-Präparation gewonnen (siehe 3.5.2). Dazu wurden die Mikroglia von dem Astrozytenrasen abgeklopft und bei 900 rpm und 4°C für 10 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 700 µl Qiazol aufgenommen und in die RNA Extraktion eingesetzt. Die primären Astrozyten wurden freundlicherweise von Diplom Biologin E. Pietrowski und die primären Neurone von N. Knauer zur Verfügung gestellt. Das Pellet der Astrozyten und Neurone wurde ebenfalls in Qiazol resuspendiert und in die RNA Extraktion eingesetzt. Die Gewebeproben wurden ebenfalls in Qiazol aufgenommen und mit einem TissueRuptor (Qiagen) homogenisiert.

### **3.10.2 Reverse Transkription und quantitative Real-Time-PCR**

Die extrahierte mRNA wurde mit dem Transkriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche Applied Science) mit Random Hexameric Primern in cDNA nach Angaben des Herstellers umgeschrieben. Die quantitative Real-Time PCR (qPCR) wurde mit dem Taqman Universal Master Mix (Roche Applied Science) und spezifischen Primern und Sonden (Tabelle 7) in einem LightCycler 1.5 System (Roche Applied Science) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

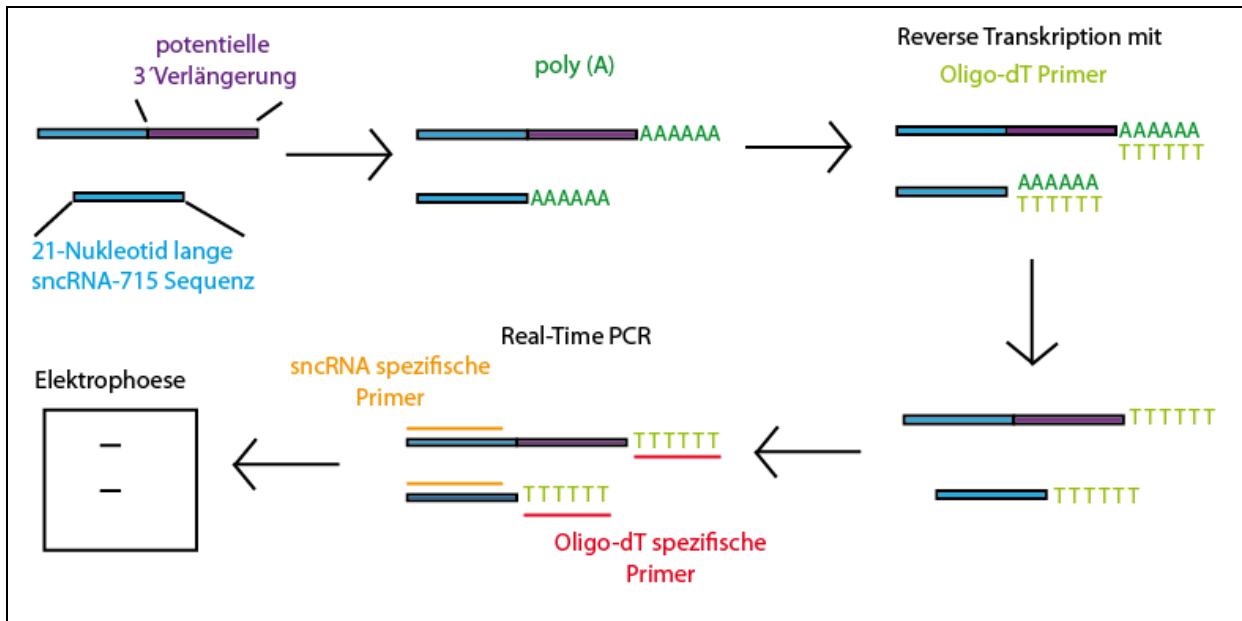
SncRNAs wurden mit dem TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit mit spezifischen *Stem-loop*-RT-Primern für sncRNA-715, miR-124a oder snoRNA-135 (Applied Biosystems) nach Angaben des Herstellers revers transkribiert. Wie in Abbildung 17 dargestellt, entsteht in der Reversen Transkription ein längeres PCR Produkt, welches dann in der Realtime-PCR mit sncRNA spezifischen *Forward* Primern und *Stem-loop* spezifischen *Reverse* Primern amplifiziert wird. Diese Amplifikation erfolgte mit dem TaqMan Universal Master Mix (Roche Applied Science) mit spezifischen Primern und Sonden für die jeweilige sncRNA (Applied Biosystems). Werden die PCR Produkte auf einem Agarosegel aufgetrennt, ist das PCR Produkt länger als die reife miRNA, da zu den Nukleotiden der miRNA noch die Länge der verwendeten RT-Primer kommen. Nach Rücksprache mit Silke Decker des technischen Supports der Herstellerfirma des verwendeten TaqMan™ MicroRNA Versuchs konnte die genaue Länge der Amplikons nicht erfahren werden, da diese der Geheimhaltung unterliegen. Im Durchschnitt liegen die Amplicon längen zwischen 50 und 80 Basenpaaren.



**Abbildung 17: Schematische Darstellung des TaqMan™ MicroRNA Versuchs**

Die Reverse Transkription erfolgt mit sncRNA spezifischen *Stem-loop* RT Primern. Die cDNA wird mit miRNA spezifischen *Forward* Primern und *Stem-loop* spezifischen *Reverse* Primern und einer TaqMan Sonde amplifiziert (Schmittgen et al., 2008).

Um potentieller 3'Verlängerungen der sncRNA-715 zu identifizieren, wurde eine Reverse Transkription mit dem miScript PCR System (Qiagen) durchgeführt. Dieser Schritt beinhaltet eine 3'Polyadenylierung und schreibt mit Hilfe von Oligo-dT Primern die komplette RNA, inklusive der reifen und Vorläufer sncRNAs und der mRNAs, in cDNA um. Die cDNA wurde mit SYBR Green (Qiagen), Oligo-dT spezifischen Reverse Primern (Qiagen) und sncRNA-715 oder 5s spezifische Forward Primern (Exiqon) amplifiziert (Abbildung 18).



**Abbildung 18: Strategie zum Nachweis potentieller 3' Verlängerungen der sncRNA-715**

Alle RNAs werden polyadenyliert und in der Reversen Transkription mit Oligo-dT Primern in cDNA umgeschrieben. Die Realtime-PCR erfolgte mit Oligo-dT spezifischen *Reverse* Primern, sncRNA-715 spezifischen *Forward* Primern und einer sncRNA-715 spezifischen Sonde. Die PCR Produkte wurden auf ein Agarose-Gel aufgetragen. Potentielle 3' Verlängerungen der sncRNA-715 sollten durch eine höhere Bande detektiert werden.

### 3.10.2.1 Relative Quantifizierung nach der $\Delta\Delta C_t$ -Methode

Zur relativen Quantifizierung wurden die Crossingpoints ( $C_t$ -Wert) mit Hilfe der Relativen Expressions Software REST und der  $\Delta\Delta C_t$ -Methode ausgewertet (Pfaff et al, 2002). Als Referenzgene wurden snoRNA-135, 5S, *Renilla* Luziferase,  $\beta$ -Aktin und Glucose-6-phosphate Dehydrogenase (G6PDH) eingesetzt.

Mit der  $\Delta\Delta C_t$ -Methode kann die relative Expression eines Zielgens in einer Probe auf die Expression in der Kontrollprobe bezogen werden. Im ersten Schritt wird der  $C_t$ -Wert bestimmt. Der  $C_t$ -Wert ist der PCR-Zyklus, bei dem das Fluoreszenzsignal aus dem Hintergrund tritt. Die Berechnung der relativen Expression setzt sich wie folgt zusammen:

$$\Delta C_t = C_t (\text{Zielgen}) - C_t (\text{Referenzgen})$$

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t (\text{behandelte Probe}) - \Delta C_t (\text{Kontroll - Probe})$$

Für jede untersuchte Probe wird der  $C_t$ -Wert des Zielgens von dem  $C_t$ -Wert des Referenzgens subtrahiert. Um das  $\Delta\Delta C_t$ -Berechnungsmodell zu erhalten, wurde der  $\Delta C_t$ -Wert der Kontroll-Probe von dem  $\Delta C_t$ -Wert der behandelten Probe abgezogen. Der relative Expressionsunterschied des Zielgens in der Probe im Vergleich zur Kontrolle (Ratio), normalisiert auf das Referenzgen ergibt sich aus der Formel  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ . Im Falle einer perfekten PCR verdoppelt sich mit jedem Zyklus die DNA Menge. Ein  $C_t$ -Wert, der um eine Einheit

geringer ist, entspricht einer doppelten Menge an eingesetzter cDNA. Die relative Expression kann als Logarithmus zur Basis 2 (log<sub>2</sub>) berechnet werden. Das Zielgen ist reguliert, wenn die relative Expression über oder unter dem Wert 1 bzw. dem log<sub>2</sub> Wert 0,5 liegt.

### 3.10.2.2 Anreicherungsfaktor

Um die Anreicherung eines Zielgens in der A2-IP zu bestimmen, wurde der Anreicherungsfaktor F durch folgende Formel bestimmt (White et al., 2012):

$$F = \frac{E1 \times E2}{E3}$$

$$E1 = 2^{-(Ct \text{ Wert (A2-IP)} - Ct \text{ Wert (Input)})}$$

$$E2 = 2^{-(Ct \text{ Wert (A2-IP)} - Ct \text{ Wert (Kontroll-IP)})}$$

$$E3 = 2^{-(Ct \text{ Wert (Kontroll-IP)} - Ct \text{ Wert (Input)})}$$

Dabei entspricht E1 der Anreicherung des Zielgens in der A2-IP gegenüber dem Input (Lysat), E2 der Anreicherung des Zielgens in der A2-IP gegenüber der Kontroll-IP und E3 der Anreicherung des Zielgens in der Kontroll-IP gegenüber dem Input.

Der Anreicherungsfaktor wurde auch für das Referenzgen bestimmt und auf 1 gesetzt. Der Anreicherungsfaktor des Zielgens wurde auf den Anreicherungsfaktor des Referenzgens bezogen.

### 3.10.2.3 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 1 h aufgetrennt und anschließend im ChemiDoc Imager (Biorad) detektiert.

### 3.10.3 Northern Blot

Der Northern Blot ist eine Methode, bei dem zunächst RNA in der Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend auf eine Nylonmembran übertragen wird. Durch die Hybridisierung mit spezifischen Sonden können die RNA Sequenzen visualisiert werden.

Die RNA (13 µg) von primären Oligodendrozyten Vorläuferzellen wurde zusammen mit 5 µl Novex® TBE-Urea 2x Sample Buffer in einem Endvolumen von 10 µl für 5 min bei 70°C aufgeköcht. 7 µl des MicroRNA Markers (NEB) wurde bei 95°C für 1 min aufgeköcht. Die Proben und der Marker wurden in einem 15 %igen Novex TBE-Ures Gel (Invitrogen) bei 160°C für 60 min aufgetrennt. Die Elektrophoresekammer wurde zuvor mit RNaseZap (Roth) gereinigt. Der 10x UltraPure™ TBE Buffer wurde mit DEPC verdünnt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel 5 min mit 1x UltraPure™ TBE Buffer gewaschen. Die positiv-geladene Nylonmembran (Roche Applied Science), sowie die Schwämme und die Filterpapiere (Roth) wurden in 0,5x UltraPure™ TBE Buffer 5 min voräquiliert. Die Blotkammer wurde innen mit 0,5 x UltraPure™ TBE Buffer und der Blotbehälter (außen) mit destilliertem Wasser gefüllt. Geblottet wurde bei 30 Volt für 60 min. Danach wurde die Nylonmembran mit der RNA Seite nach oben auf ein Stück Papier gelegt und an der Luft etwas getrocknet. Durch UV-Licht wurde die RNA im Crosslinker (UVP) auf der Membran



fixiert. Um freie Bindestellen auf der Nylonmembran zu blockieren, wurde die Membran mit 10 ml Hybridisierungspuffer ULTRAHyp (Ambion) bei 42°C für 30 min im Hybridisierungssofen vorinkubiert. Die sncRNA-715 spezifische 3'DIG-LNA -Sonde wurde bei 95°C für 1 min aufgeköcht. Bei dieser Sonde handelt es sich um Locked Nucleic Acid (LNA) Sonde. Im LNA Nukleosid befindet sich in der Ribose eine zusätzliche Verbindung zwischen dem 2'Sauerstoff und dem 4'Kohlenstoff, wodurch der Zucker in der 3'-endo Konformation fixiert und damit stabiler wird. LNA Sonden sind bindungsstärker und werden vor allem bei kurzen Zielsequenzen, wie sncRNAs, eingesetzt. 10 µl der 3'Biotin Marker Sonde und 1 nM der sncRNA-715 spezifische 3'DIG-LNA-Sonde wurden in 10 ml ULTRAHyp ÜN bei 42°C im Hybridisierungssofen inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran in eine Schale gelegt und 2-mal mit 2xSSC/ 0,1%SDS jeweils 15 min bei RT gewaschen. Anschließend wurde die Membran für 1 h mit Blockierpuffer blockiert. Zur Detektion der hybridisierten 3'DIG-LNA Sonde wurde die Membran für 1h bei RT mit dem anti-DIG-AP Antikörper (1:7500) inkubiert. Die 3'Biotin Marker Sonde wurde mit dem anti-Biotin-AP Antikörper (1:2000) visualisiert. Die Antikörper wurden in Blockierpuffer verdünnt. Nach der Inkubation wurde die Membran 3-mal mit Tween-Puffer für jeweils 10 min und 1-mal mit AP-Puffer für 3 min gewaschen. Die Signale wurden mit dem CDP-Star Substrat (Roche Applied Science) und dem ChemiDoc Imager (Biorad) detektiert.

### 3.11 Immunzytochemie

Zur immunzytochemischen Analyse wurden die Zellen auf den Deckgläsern 2-mal mit 1x PBS gewaschen und anschließend mit 4% PFA für mindestens 15 min fixiert. PFA quervernetzt die Proteine in der Zelle und konserviert die ursprüngliche Proteinform. Anschließend wurden die Zellen 2-mal mit 1x PBS gewaschen. Um die intrazellulären Epitope in der Zelle zugänglich zu machen, wurde 2 min mit 0,1% Triton-X100 permeabilisiert. Abschließend wurden die Zellen mit Blockierlösung inkubiert, wodurch unspezifische Bindungen der Antikörper reduziert werden. Der Primärantikörper wurde in Blockierlösung entsprechend verdünnt und 1 h bei RT oder ÜN bei 4°C inkubiert. Nach dreimaligem waschen mit 1x PBS für jeweils 1 min wurde der verdünnte Sekundärantikörper für 30 min auf die Zellen gegeben. Bevor der Fluoreszenzfarbstoff DAPI 1:1000 verdünnt und auf die Zellen getropft wurde, mussten die Zellen 3-mal mit 1x PBS gewaschen werden. Die Inkubationszeit mit DAPI betrug 5 min. Zuletzt wurde 2-mal mit 1x PBS und 1-mal mit destilliertem Wasser gewaschen. Die Deckgläser wurden in Mowiol eingedeckt und bei 4°C im Dunkeln gelagert. Die Aufnahmen der immunzytochemischen Färbung, sowie der *In-situ*-Hybridisierungen erfolgte entweder mit einem 40x Objektiv (UPlanFLN; NA= 0,75) oder einem 60x Ölobjektiv (UPlanSApo; NA= 1,35) eines IX81 Mikroskops. Zur Detektion wurde die monochrome Fluoreszenz CCD-Kamera XM10 und die cell<sup>^</sup>F Software verwendet. Die Bilder wurden mit Photoshop CS4 (Adobe) bearbeitet.

### 3.12 *In-situ*-Hybridisierung

Die *In-situ*-Hybridisierung ist eine Methode in der Molekularbiologie, mit der Nukleinsäuren in Zellen und Geweben mit einer spezifischen Sonde nachgewiesen werden können.

### 3.12.1 LNA-ELF-FISH zur Detektion der sncRNA-715

Mit der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) und der Enzyme Labeled Fluorescence (ELF) Technik wurde die sncRNA-715 in primären Oligodendrozyten nachgewiesen.

Primäre Oligodendrozyten (3 TIV) wurden mit 4% PFA für 15 min fixiert und 3-mal mit 1x PBS für jeweils 1 min gewaschen. Permeabilisiert wurde ÜN bei 4°C mit 70% Ethanol. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit Hybridisierungspuffer für 2h bei 60°C vorinkubiert. Die Hybridisierung mit 50 nM 715-spezifischen-LNA-Sonde erfolgte im Hybridisierungspuffer ÜN bei 71°C. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit 5x SSC, 4x SSC, 2x SSC und 1x SSC für jeweils 5 min bei 71°C, 1-mal mit 0,2x SSC und 1-mal mit 1x Waschpuffer (Molecular Probes) für 5 min bei RT gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 100 µl Blocking-Reagenz (Molecular Probes) für 1 h blockiert. Der anti-DIG-AP Antikörper wurde 1:200 in 100 ml Blocking-Reagenz verdünnt und auf die Zellen für 30 min bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 1x Waschpuffer für jeweils 5 min wurde die Substrat Working Solution nach Angaben des Herstellers angesetzt und 15 min auf die Zellen gegeben. Nach einmaligem Waschen mit 1x Waschpuffer für 5 min wurde mit Post-Fixierungslösung für 15 min fixiert. Im letzten Schritt wurden die Deckgläser in Mowiol eingedeckt und bei 4°C im Dunkeln gelagert.

### 3.12.2 FISH zur Detektion der MBP mRNA

Mit den Stellaris Sonden von Biocat sollte die MBP mRNA in der IMS32 Zelllinie detektiert werden. IMS32 Zellen ( $7 \times 10^4$ ) wurden auf einem Deckglas für 48 h kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit 4% PFA für 15 min fixiert und 3-mal mit 1x PBS für jeweils 1 min gewaschen. Permeabilisiert wurde ÜN bei 4°C mit 70% Ethanol. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit Waschpuffer für 5 min gewaschen. Anschließend wurde für 2 min mit 0,1% Triton-X100 inkubiert und mit Waschpuffer für 5 min gewaschen. Die MBP spezifischen Stellaris Sonde wurde in Hybridisierungspuffer auf 250 nM verdünnt und ÜN auf den Zellen bei 37°C inkubiert.

### 3.13 Fluorimetrischer TUNEL Versuch

Während der Apoptose entstehen DNA-Strangbrüche. Mit dem TUNEL (terminal transferase dUTP nick end labeling) Versuch können an den freien 3'OH-DNA Bruchenden durch eine terminale Deoxynukleotidyltransferase Fluoreszenz-markierte dUTP-Nukleotide gebunden werden. Diese markierten Stellen in der geschädigten DNA können fluorimetrisch detektiert werden.

Zur Bestimmung der relativen Apoptoserate in den 715-Mimic und Kontroll-transfizierten Oli-*neu* Zellen und primären Oligodendrozyten wurde der TUNEL-Versuch mit dem DNA Fragmentation Imaging Kit (Roche Applied Science) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Dieser Versuch quantifiziert neben der TUNEL Reaktion auch die Anzahl an Zellkernen (Hoechst 33342 Färbung), wodurch auch die Gesamtzellzahl bestimmt werden kann. Im Versuch wurden Oli-*neu* Zellen ( $1,5 \times 10^4$ ) und primäre Oligodendrozyten ( $5 \times 10^4$ ; 1 TIV) in einer 96-well Platte mit 20 nM 715-Mimic oder Kontroll-siRNA transfiziert. 24 h später wurden Zellen in einem separaten Ansatz als Positivkontrolle mit 1 µM Staurosporin

behandelt. Nach 18 h wurde dann die relative Menge an apoptotischen Zellen und die Gesamtzellzahl mit Hilfe des TUNEL Versuch in einem Mikrotiterplatten-Leser F200 (TECAN) quantifiziert.

### **3.14 Immunpräzipitation**

Mit der Immunpräzipitation können spezifisch Proteine und assoziierte Moleküle aus Lysaten aufkonzentriert werden.

#### **3.14.1 Immunpräzipitation aus Oli-*neu* Zellen**

In dieser Arbeit wurde das hnRNP A2 Protein unter Verwendung der Dynabeads Protein G (Invitrogen) aufgereinigt. Dazu wurden für die A2-IP 22,5 µg des hnRNP A2 spezifischen Antikörpers Ef-67 (W. Rigby, Hannover) und für die Kontroll-IP 22,5 µg des IgG-Antikörper in 200 µl W&B Puffer gemischt. Beide Ansätze wurden für 2 h bei 4°C auf dem Rotationsrad inkubiert. Während der Inkubation wurden die Lysate der Oli-*neu* Zellen hergestellt. Dazu wurden pro Ansatz konfluente Oli-*neu* Zellen einer 10 cm Kulturschale mit 1 ml 1x PBS abgeschabt. Jeweils 200 µl und 800 µl der Zellsuspension wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und bei 5000 g bei 4°C für 5 min zentrifugiert. Das kleine Pellet (RNA-Input) wurde in 700 µl Qiazol aufgenommen und bei -80°C gelagert. Das größere Pellet wurde in 700 µl Lyse Puffer resuspendiert und auf dem Rotationsrad für 45 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde das Lysat bei 5000 g und 4°C für 5 min zentrifugiert. 60 µl des Überstandes (Protein-Input) wurden abgenommen und bei -20°C gelagert. Bevor das Lysat auf die Antikörper gekoppelten Beads gegeben wurde, wurden die Beads 2-mal mit 700 µl 1x PBS gewaschen. Inkubiert wurde bei 4°C ÜN auf dem Rotationsrad. Am nächsten Tag wurden die Beads 5-mal mit 700 µl 1x PBS gewaschen und im letzten Schritt aufgeteilt. Zu dem einen Ansatz wurde 700 µl Qiazol gegeben und 5 min bei RT ständig invertiert. Schließlich wurde das Qiazol von den Ef-67 und den IgG Beads befreit und zusammen mit dem Input für die RNA-Extraktion weiterverwendet (3.10.1). Nach der Reversen Transkription und der quantitativen Real-Time PCR wurde der Anreicherungsfaktor nach 3.10.2.2 bestimmt. Zum zweiten Ansatz wurde 40 µl 1x LDS pipettiert und für 10 min auf dem Thermomixer bei 70°C inkubiert. Das LDS wurde von den Beads abgenommen und mit 4,5 µl DTT gemischt und für 5 min bei 70 °C aufgeköcht. Die Lysate aus dem Input, der Ef-67 IP und der IgG IP wurden weiter in der SDS Page und im Western Blot analysiert (3.9.3 und 3.9.4).

#### **3.14.2 Immunpräzipitation aus primären Schwann-Zellen**

Die Aufreinigung des hnRNP A2 Proteins aus primären Schwann-Zellen erfolgte ebenfalls mit Hilfe der der Dynabeads Protein G (Invitrogen). Allerdings musste das Protokoll etwas verändert werden. Zuerst wurde der Antikörper-Lysat Komplex ÜN gebildet und anschließend mit den Beads inkubiert.

Es wurden Zellen einer konfluenten T75 Kulturflasche mit 1 ml 1x PBS abgeschabt. Jeweils 200 µl und 800 µl der Zellsuspension wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und bei 5000 g bei 4°C für 5 min zentrifugiert. Das kleinere Pellet wurde in 700 µl Qiazol aufgenommen und bei -70°C für die RNA-Extraktion aufbewahrt. Das größere Pellet wurde in 800 µl Lyse Puffer aufgenommen und für 45 min auf dem Rotationsrad bei 4°C inkubiert.

Anschließend wurden 60 µl des Überstandes bei -20°C aufbewahrt. Das restliche Lysat wurde aufgeteilt und jeweils mit 6,4 µg IgG Antikörper oder 6,4 µg Ef-67 Antikörper (Santa Cruz) ÜN bei 4°C auf dem Rotationsrad inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Beads zu den Antikörper-Lysat Komplexen gegeben und für 2 h bei 4°C auf dem Rotationsrad inkubiert. Die Elution und die Analyse der Proben erfolgte wie in 3.14.1 beschrieben.

### 3.15 Ziel gerichtete Mutagenese

Zur Einführung einer Mutation in die potentiellen sncRNA-715 Bindestelle in die MBP 3'UTR des *Firefly* Luziferase Reporter Plasmids wurde das *QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis* Kit von Stratagene verwendet. Zunächst wurden dafür zwei komplementäre Primer designt, die die gewünschte Mutation enthielten (Tabelle 6). Die Mutation, und damit die Sequenz der Primer, wurde so gewählt, dass zusätzlich eine Restriktionsschnittstelle für EcoRI entstand. Für die Synthese des mutanten Plasmids wurden folgende Reagenzien benötigt:

Reagenz	Menge
Wildtyp <i>firefly</i> Luziferase-Konstrukt MBP3'UTR	38 ng
Mutation (fw) Primer	125 ng
Mutation (rev) Primer	125 ng
dNTP Mix	1 µl
QuikSolution reagent	1,5 µl
QuikChange Lightning Enzyme	1 µl
ddH <sub>2</sub> O	ad 50 µl

Anschließend wurde der Reaktionsansatz im PCR-Cycler mit folgendem Programm amplifiziert:

Segment	Temperatur	Zeit	Zyklen
<b>Präinkubation (Denaturierung)</b>	95 °C	2 min	1
<b>Amplifikation (Denaturierung, Anlagerung der Primer, DNA Synthese)</b>	95°C	20 s	18
	60 °C	110 s	
	68 °C	222 s (30s/kb Plasmid)	
<b>Postinkubation</b>	68 °C	5 min	1

Im nächsten Schritt wurden die Proben mit 2 µl *DpnI* bei 37°C für 5 min verdaut. Dieses Enzym baut spezifisch methylierte, nicht mutierte, Ausgangs-DNA ab. Die mutierte DNA wurde anschließend in superkompetente Zellen XL10-Gold (Stratagene) transformiert. Dazu wurden 45 µl der XL10-Gold Zellen mit 2 µl β-Mercaptoethanol für 2 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 2 µl der *DpnI* behandelten DNA zu den Zellen gegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Der Transformationsansatz wurde danach für 30 s auf 42°C erhitzt und dann 2 min auf Eis abgekühlt. Anschließend wurde 500 µl vorgewärmtes SOC-Medium zugegeben und die Zellsuspension für 1 h bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Nach dieser Inkubation wurden die Zellen pelletiert, das Zellpellet in 150 µl SOC-Medium aufgenommen und

anschließend auf Agar-Platten, die 75µg/ml Ampicillin enthielten, ausplattiert. Die Kulturplatte wurde bei 37°C ÜN inkubiert.

### 3.15.1 Plasmid-Präparation aus XL10-Gold (Mini-/ Midi-Präparation)

Am nächsten Tag wurden die die Bakterien, die das gewünschte Plasmid enthielten, ÜN in 4 ml LB-Medium (+75µg/ml Ampicillin) bei 37°C im Schüttler amplifiziert. Anschließend wurde ein Glycerinstock (875 µl Mini + 125µl 80% Glycerin) angelegt. Zur Isolation der Plasmide aus den Bakterien wurde das PureYield™ Plasmid Miniprep Kit von Promega nach Angaben des Herstellers verwendet. Zur Überprüfung, ob es sich bei dem isolierten Plasmid um das mutierte *Firefly* Luziferase Reporter Plasmid handelt, wurde ein analytischer Kontrollverdau mit EcoRI und XhoI durchgeführt. Der Glycerinstock der positiven Mini wurde dann verwendet, um eine Midi anzupflegen. Dazu wurde der komplette Glycerinstock in 100 ml LB-Medium (+75µg/ml Ampicillin) gegeben und bei 37°C ÜN im Schüttler amplifiziert. Von der Midi wurde ebenfalls ein Glycerinstock angefertigt. Zur Isolation der Plasmide aus den Bakterien wurde das PureYield™ Plasmid Midiprep Kit von Promega nach Angaben des Herstellers verwendet. Das isolierte Plasmid wurde mit einem Kontrollverdau mit EcoRI und XhoI überprüft und anschließend von der Firma GENterprise Genomics in Mainz sequenziert.

### 3.16 Luziferase Versuch

Der Luziferase-Versuch wurde mit dem *Dual-Glo™ Luciferase Assay System* von Promega nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Die Transfektion der *Oli-neu* Zellen erfolgte wie in 3.8.3 beschrieben. 48 h nach der Transfektion wurde die Zellen mit 1x PBS gewaschen und anschließend in 350 µl 1x PBS abgeschabt. Jeweils 50 µl der Zelllösung wurden in eine weiße 96-well Platte überführt. Die restliche Zelllösung wurde bei 5000 g für 5 min bei 4°C zentrifugiert und das Pellet in 700 µl Qiazol aufgenommen und bei -80°C für RNA-Analysen aufbewahrt. Um die *Firefly* Luziferase Aktivität in der Zelllösung in der 96-well Platte zu messen, wurden 50 µl Dual-Glo Luciferase Reagenz zugegeben. Die *Firefly* Luziferase katalysiert die Oxidation von beetle-Luciferin unter Verwendung von ATP, Mg<sup>2+</sup> und O<sub>2</sub> in Oxyluciferin, wobei Licht der Wellenlänge 560 nm emittiert wird. Nach 10 minütiger Inkubation wurde die Lumineszenz im Mikroplatten-Leser (Tecan) bestimmt. Die detektierte Lumineszenz ist äquivalent zum umgesetzten Substrat und entspricht damit der *Firefly* Luziferase Aktivität. Um die *Renilla* Luziferase Aktivität messen zu können, wurden anschließend 50 µl Dual-Glo Stop & Glo Reagenz zugegeben, welches die Lumineszenz der *Firefly* Luziferase stoppt und die Lumineszenz der *Renilla* Luziferase anregt. Die *Renilla* Luziferase oxidiert Coelenterazin unter Verbrauch von O<sub>2</sub> in Coelenteramid, wobei Licht der Wellenlänge 482 nm emittiert wird. Auch hier wurde nach einer 10 minütigen Inkubation die Lumineszenz in einem Mikroplatten-Leser (Tecan) gemessen. Zur Auswertung wurden die Mittelwerte der 3 Replikate gebildet. Der Mittelwert der *Firefly* Luziferase Aktivität wurde auf den Mittelwert der *Renilla* Luziferase normalisiert

## 4 Ergebnisse

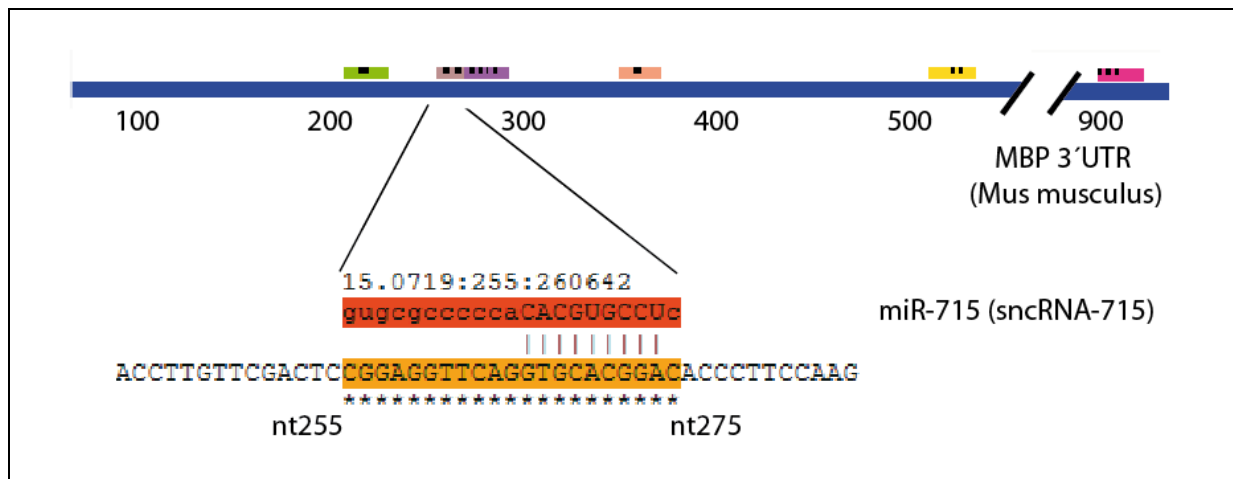
### 4.1 Vorhergesagte sncRNA-715 (miR-715) Bindestellen in der MBP 3'UTR

Zur Vorhersage potentieller miRNA Bindestellen in der 3'UTR der MBP mRNA wurde die Datenbank *MicroCosm Targets Version 5* verwendet. Anhand dieser bioinformatischen Analyse wurden miRNAs gefunden, die theoretisch in den unterschiedlichen MBP 3'UTRs des Menschen, der Maus und der Ratte binden können (Abbildung 19).

MBP 3'UTR		
Mus musculus	Rattus norvegicus	Homo sapiens
miR-125b*	miR-449a	miR-189
miR-214*	miR-324-3p	miR-212
miR-715	miR-715	miR-662
miR-764-5p	miR-700	miR-715
miR-890	miR-518d-3p	
miR-181a-1*	miR-689	
	miR-764-5p	

**Abbildung 19: Potentielle miRNA Bindestellen in der MBP 3'UTR**  
Für die MBP 3'UTR in der Maus konnten sechs, in der Ratte sieben und im Menschen vier potenzielle miRNA-Bindestellen errechnet werden. Die miR-715 Bindestelle ist in allen drei Spezies konserviert.

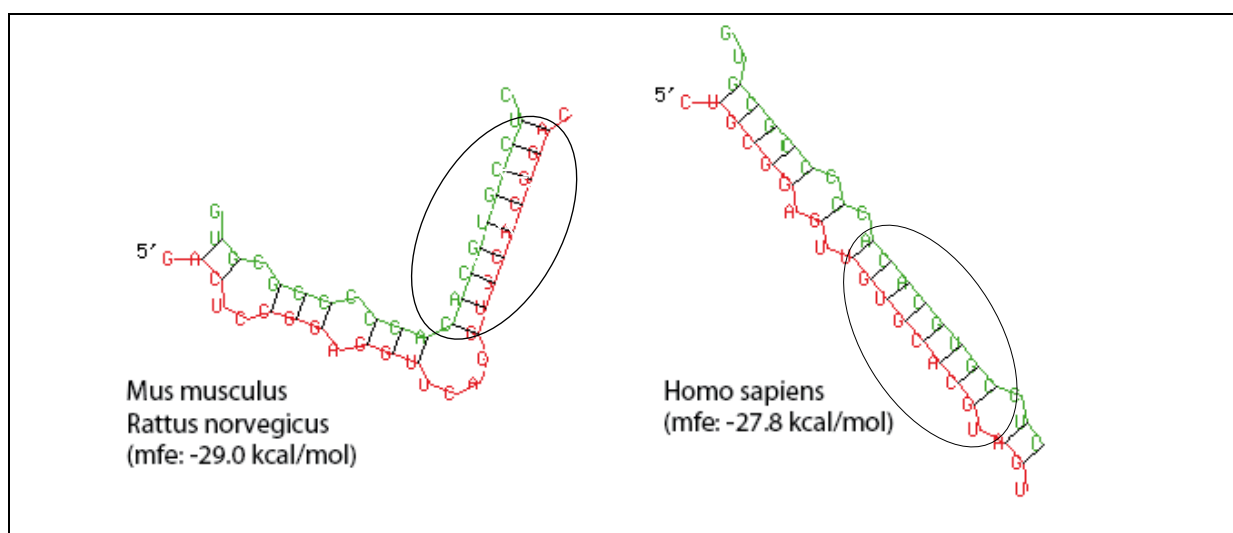
Es wurden in der Maus 6 miRNAs (miR-125b\*, miR-214\*, miR-715, miR-764-5p, miR-890 und miR-181a-1\*), in der Ratte 7 miRNAs (miR-449a, miR-324-3p, miR-715, miR-700, miR-518d-3p, miR-689 und miR-764-5p) und im Menschen 4 miRNAs (miR-189, miR-212, miR-662 und miR-715) identifiziert, die potentiell in der MBP 3'UTR binden können. Unter diesen miRNAs ist die vorhergesagte Bindestelle der miR-715 in allen drei Spezies konserviert. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb untersucht, ob miR-715 mit der Bindestelle in der MBP 3'UTR interagiert und dadurch die Translation des MBP Proteins reguliert. Exemplarisch ist die *MicroCosm Target* Suche für die MBP 3'UTR der Maus und miR-715 in Abbildung 20 dargestellt. Die *seed* Region der miRNA-715 ist komplementär zur Erkennungssequenz in der MBP mRNA. Die Bindestelle befindet sich in der murinen MBP 3'UTR zwischen den Nukleotiden (nt) 225 und 275, in der Ratte zwischen bp 254 und 274 und im Menschen zwischen bp 113 und 133. Die Nummerierung der Basen bezieht sich hier nur auf die 3'UTR.



**Abbildung 20: Ergebnis der Datenbankanalyse MicroCosm Targets Version 5**

Die miR-715 Bindestelle befindet sich zwischen den Nukleotiden (nt) 225 und 275 in der murinen MBP 3'UTR. Die komplementäre Bindung ist durch waagrechte Striche dargestellt. (Modifiziert nach [www.ebi.ac.uk/enrightsrv/microcosm/cgi-bin/targets/v5/detail\\_view.pl?transcript\\_id=ENSMUST00000102812](http://www.ebi.ac.uk/enrightsrv/microcosm/cgi-bin/targets/v5/detail_view.pl?transcript_id=ENSMUST00000102812))

Mit Hilfe der *RNAhybrid* Software des Bioinformatik Servers der Universität Bielefeld kann die minimale freie Hybridisierungsenergie (mfe) einer langen RNA und einer kürzeren RNA bestimmt werden (Rehmsmeier et al., 2004). Die minimale freie Hybridisierungsenergie für miR-715 und der MBP 3'UTR in der Maus und in der Ratte beträgt -29,0 kcal/mol und im Menschen -27,8 kcal/mol (Abbildung 21). Diese Werte sind mit der freien Hybridisierungsenergie andere miRNAs vergleichbar (Rehmsmeier et al., 2004).



**Abbildung 21: Ergebnis der RNAhybrid Software**

Dargestellt ist die vorhergesagte Interaktion und die minimale freie Hybridisierungsenergie (mfe) von miR-715 (grün) mit der den jeweiligen MBP 3'UTRs (rot). In der Maus und der Ratte ist die Basenpaarung der Nukleotide 2-10 vom 5'-Ende der miRNA perfekt ausgebildet (seed). Im Menschen ist die Bindung an Position 3 vom 5'Ende der miRNA unterbrochen, dies wird aber durch eine Komplementarität im 3'-Bereich kompensiert.

(Modifiziert nach <http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/rnahybrid/submission.html>)

Anhand von Sequenzierungen, die anfänglich die 21-Nukleotid lange RNA als miRNA identifizierten, wurde in der miRNA Datenbank *miRBase* bekannt gegeben, dass das Prozessierungsmuster der miR-715 nicht mit dem von anderen miRNAs übereinstimmt (Kozomara & Griffiths-Jones, 2011). Bislang ist es nicht einfach, die verschiedenen Klassen kleiner nicht kodierender RNAs klar zu unterscheiden (Kim et al., 2009). Aus diesem Grund wurde im weiteren Verlauf dieser Arbeit miR-715 als sncRNA-715 bezeichnet und die Expression gründlich untersucht.

## 4.2 Rolle der sncRNA-715 im zentralen Nervensystem

In diesem Projekt sollte überprüft werden, ob sncRNA-715 in Oligodendrozyten exprimiert wird und mit der potentiellen Bindestelle in der MBP 3'UTR interagieren und darüber die Translation beeinflussen kann. Darüber hinaus sollte überprüft werden, ob sncRNA-715 eine Komponente des MBP mRNA Lokalisationskomplexes ist und die Translation der MBP mRNA inhibiert.

### 4.2.1 Endogene sncRNA-715 Expression in Oligodendrozyten

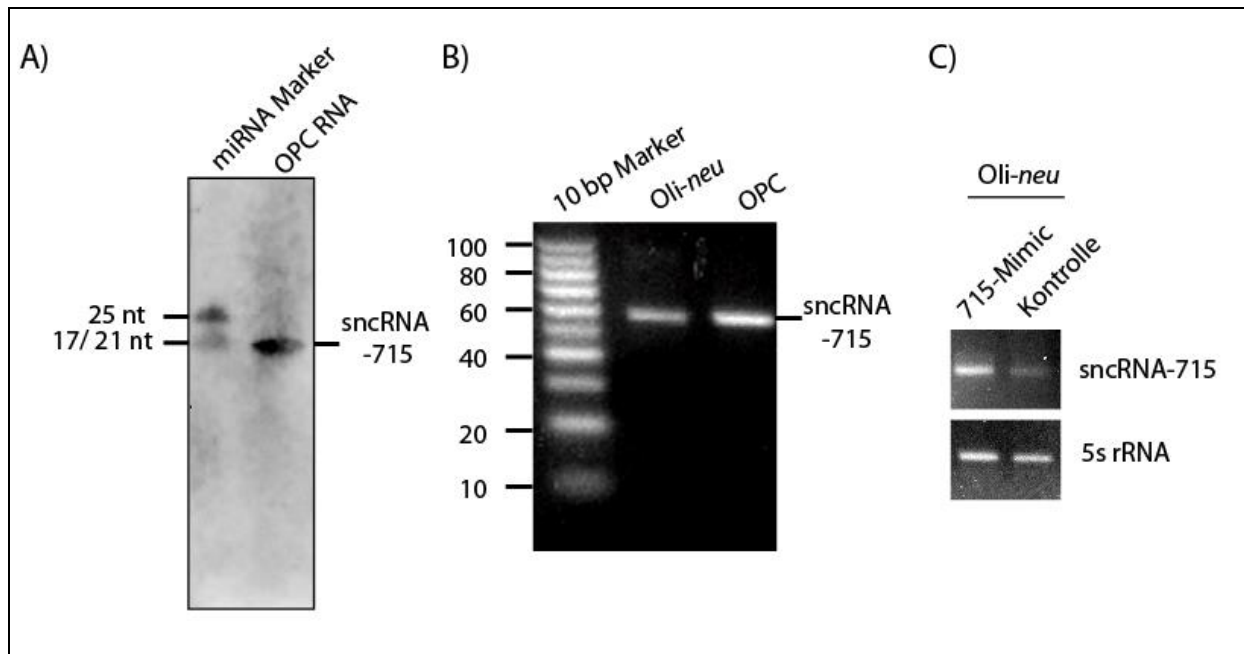
Die Verwendung von Locked Nuclein Acids (LNA) Sonden (Abschnitt 3.6.3) ermöglicht die Detektion von kleinen RNA Molekülen wie sncRNAs (Várallyay et al., 2008). Mit einer LNA-Sonde, die spezifisch die 21-Nukleotid lange Sequenz (5'CUCCGUGCACACCCCGUG3') der ursprünglichen miR-715 erkennt, konnte die endogene sncRNA-715 in primären Oligodendrozyten nachgewiesen werden (Abbildung 22A). Da die Sequenz von reifen miRNAs auch in den Vorläufermolekülen (Pri- und Pre-miRNA) vorhanden ist, können mit einer miRNA spezifischen Sonde neben der reifen miRNA auch die Pri- und Pre-miRNAs detektiert werden (Naguibneva et al., 2006). Mit der sncRNA-715 kann nur eine spezifische Bande bei 21 Nukleotiden und damit nur die reife sncRNA-715 detektiert werden. Möglicherweise ist die Konzentration des Vorläufermoleküls zu gering, um mit dieser Methode visualisiert zu werden, oder die Sequenz ist so lang, sodass die RNA nicht in das 15%ige Gel hinein gelaufen ist. Auch könnten sich durch eine unvollständige Denaturierung Sekundärstrukturen in der RNA ausgebildet haben, die die Bindung der LNA-Sonde verhindert.

Die endogene Expression der sncRNA-715 in *Oli-neu* Zellen und Oligodendrozyten-Vorläuferzellen konnte anhand von quantitativer Real-Time-PCR (qPCR) und anschließender Agarose-Gelelektrophorese verifiziert werden (Abbildung 22B). Sowohl in der Zelllinie als auch in primären Oligodendrozyten kann eine Bande detektiert werden. Aufgrund der Verwendung von *Stem-loop* Primern in der reversen Transkription ist das PCR Produkt größer (Abbildung 17) und die Bande läuft bei 60 Nukleotiden (nt) statt bei 21 nt.

Um heraus zu finden, ob die 21 Nukleotid lange Sequenz, die in der qPCR amplifiziert wurde, als sncRNA-715 endogen in Oligodendrozyten existiert, und nicht ein Bestandteil einer längeren RNA ist, wurden *Oli-neu* Zellen mit synthetischen sncRNA-715 (715-Mimic) oder zur Kontrolle mit einer Kontroll-siRNA transfiziert. Nach der RNA-Extraktion, wurde die in Abbildung 18 dargestellte Strategie verwendet. Nach der Polyadenylierung und der reversen Transkription mit Oligo-dt Primern und anschließender quantitativer PCR wurden die Proben



auf ein Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel aufgetragen. Sowohl in der Kontroll- (endogene sncRNA-715), als auch in der 715-Mimic Transfektion wurde nur eine einzige Bande mit gleicher Größe identifiziert. Die 5s rRNA diente als Ladekontrolle (Abbildung 22C). Aus diesen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass die Sequenz der sncRNA-715 identisch mit der synthetischen 715-Mimic ist. Durch die Polyadenylierung und die Verwendung von Oligo-dt-spezifischen Primern können potentielle 3' Verlängerungen ausgeschlossen werden.



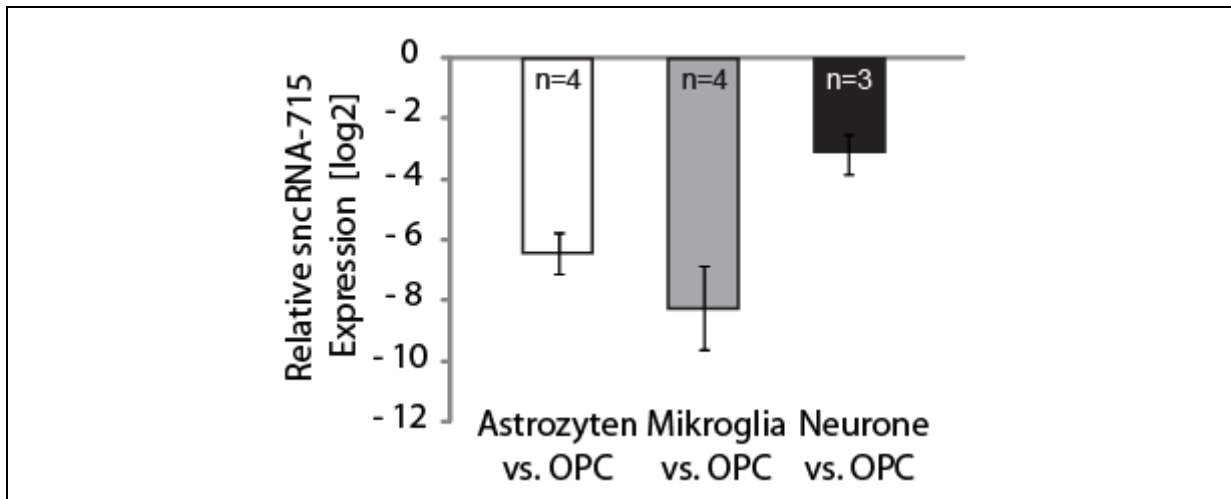
**Abbildung 22: Endogene sncRNA-715 Expression in primären OPCs und Oli-neu Zellen**

(A) Northern Blot Analysen primärer OPC RNA (1DIV) ergeben eine ~21-Nukleotid (nt) lange RNA-Bande.

(B) SncRNA-715 spezifische reverse Transkription (RT) und quantitative PCR mit anschließender Gelelektrophorese ergeben in primären OPCs und Oli-neu Zellen eine spezifische Bande. Die Größe der Bande (~60 nt) geht auf die Verwendung von Haarnadelschleifen-Primern in der RT zurück.

(C) 715-Mimic und Kontroll-siRNA transfizierte Oli-neu Zellen weisen das gleiche PCR-Produkt auf.

Zur Analyse, ob sncRNA-715 in anderen Zelltypen des ZNS exprimiert werden, wurde RNA aus Astrozyten, Mikroglia und Neuronen isoliert, und eine quantitative Realtime-PCR auf die cDNA durchgeführt. Die relative Quantifizierung der sncRNA-715 Mengen erfolgte nach der  $\Delta\Delta C_t$ -Methode auf das Referenzgen snoRNA-135. Die Menge an sncRNA-715 in den dargestellten Maus-Zelltypen wurde auf die sncRNA-715 Expression in primären Oligodendrozyten (1 TIV) bezogen (Abbildung 23). Die log<sub>2</sub>-Werte liegen in Astrozyten bei -6,41 +/- 0,67 (Mittelwert, SEM, n=4) in Mikroglia bei -8,23 +/- 1,38 (Mittelwert, SEM, n=4) und in Neuronen bei -3,06 +/- 0,65 (Mittelwert, SEM, n=3). Die Expression von sncRNA-715 in Astrozyten ist damit 85-mal, in Mikroglia 300-mal und in Neuronen 12-mal geringer als in Oligodendrozyten. Die Expression von sncRNA-715 ist damit nicht nur auf Oligodendrozyten beschränkt, sondern erfolgt auch in anderen Zelltypen, allerdings deutlich geringer.



**Abbildung 23: Endogene sncRNA-715 Expression in verschiedenen Zelltypen**

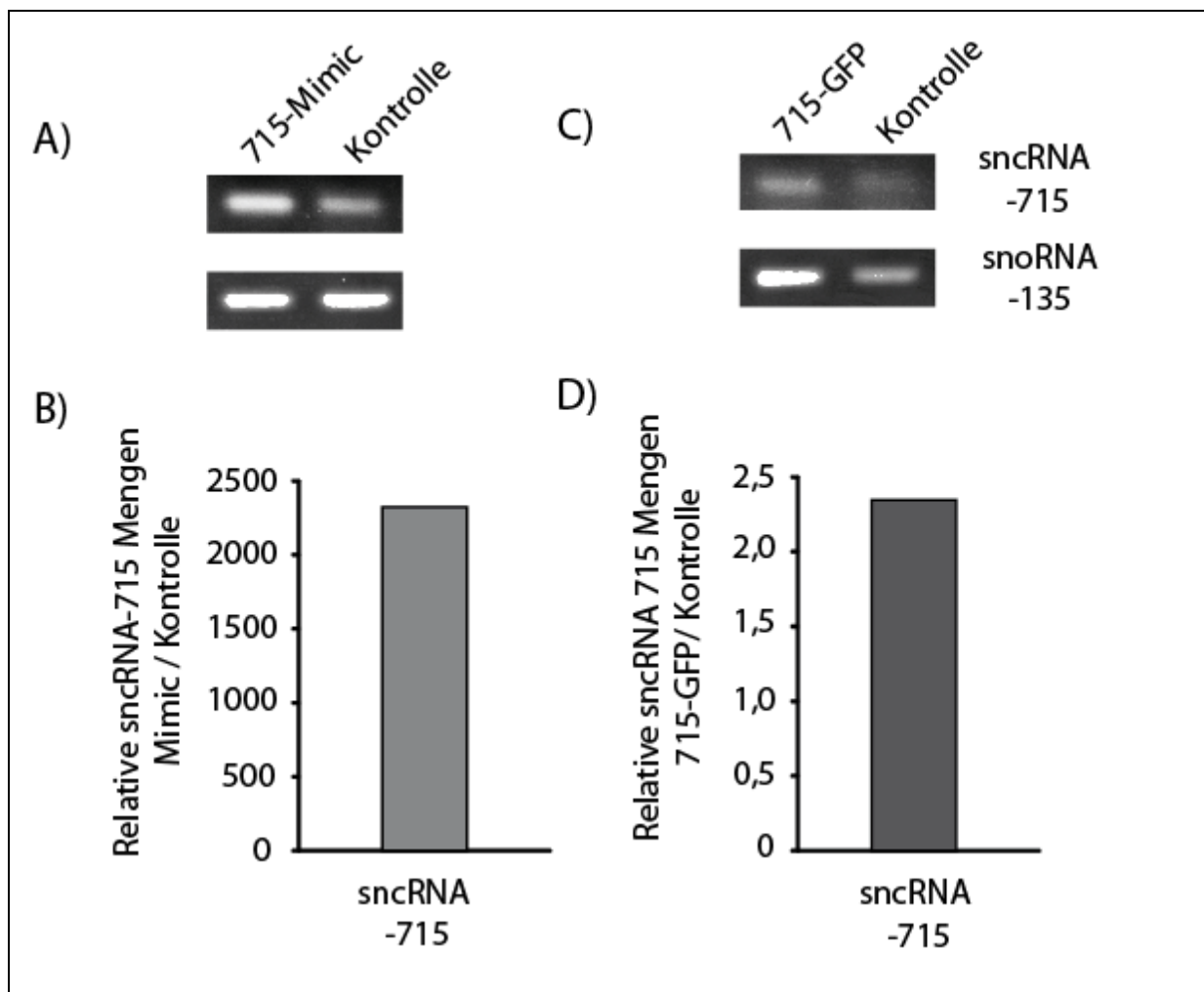
Dargestellt ist die relative Menge an endogener sncRNA-715 in Astrozyten, Mikroglia und Neuronen verglichen mit endogener sncRNA-715 Mengen primärer Oligodendrozyten (1 TIV). Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dar.

#### 4.2.2 Effizienz der sncRNA-715 Transfektion

Oli-*neu* Zellen wurden mit einer synthetischen sncRNA-715 (715-Mimic) oder einem 715-GFP-*hairpin* Plasmid transfiziert. Zur Kontrolle wurden die Zellen mit einer Kontroll-siRNA oder nur mit einem Kontroll- GFP-*hairpin* Plasmid behandelt. Eine Kontroll-siRNA und eine *scrambled* miRNA sind kurze RNA Sequenzen, die nicht homolog zu einem bekannten Gen sind und keinen spezifischen Effekt auf die Genexpression haben. Im Unterschied zur Kontroll-siRNA, welche aus einer zufällig zusammengesetzten Nukleotid-Sequenz besteht, besitzt die *scrambled* miRNA die gleiche, aber in unterschiedlicher Reihenfolge angeordnete Nukleotid-Zusammensetzung wie Ausgangs miRNA. Die Prozessierung von *hairpin* miRNAs führt in der Zelle zur Bildung einer reifen miRNA. Im Fall der hier benutzten Plasmide wurde neben der reifen sncRNA-715 (715-GFP-*hairpin* Plasmid) eine *scrambled* miRNA (Kontroll-GFP-*hairpin* Plasmid) generiert. Zusätzlich exprimieren die Plasmide das *enhanced green fluorescent protein* (eGFP), wodurch in transfizierte Zellen direkt identifiziert werden können.

Um die allgemeine Effizienz der Transfektion zu bestimmen, wurde eine quantitative Realtime-PCR durchgeführt. Außerdem wurden die Proben auf ein Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel aufgetragen. Für die sncRNA-715 bzw. für die Referenz-RNA (snRNA-135) konnte jeweils eine spezifische Bande detektiert werden, die in Bezug auf die Kontrolltransfektion in der 715-Mimic bzw. 715-GFP Transfektion die gleiche Größe besitzen (Abbildung 24, A und C). Die Bestimmung der relativen sncRNA-715 Mengen erfolgte nach der  $\Delta\Delta C_t$ -Methode auf das Referenzgen snRNA-135. Die jeweilige 715-Transfektion wurde auf die Kontrolltransfektion bezogen. Die Transfektion mit der synthetischen 715-Mimic führt zu einem 2320-fachen Anstieg der sncRNA-715 in der Zelle, wohingegen das 715-GFP-*hairpin* Plasmid die sncRNA-715 Menge nur um das 2,4-fache erhöht. Allgemein lässt sich bei

diesen Versuchen feststellen, dass die Transfektion mit der synthetischen 715-Mimic fast 1000-mal effizienter ist als die Transfektion mit dem 715-GFP-*hairpin* Plasmid (Abbildung 24 B und D). Nach einer Transfektion gelangt die Plasmid-DNA erst nach der Teilung der Zelle in den Zellkern. Die Expression von Plasmid-kodierten sncRNAs kann somit nur in teilungsfähigen Zellen erfolgen. Synthetische miRNAs hingegen können auch in postmitotische Zellen transfiziert werden, da sie nicht wie die Plasmid-DNA in den Zellkern sondern nur ins Zytoplasma gelangen müssen. Um die Expression des 715-GFP-*hairpin* Plasmids in den postmitotischen primären Oligodendrozyten zu ermöglichen (Abbildung 27) wurden die Zellen mit Hilfe des 4D Nukleofektors nukleofiziert (Abschnitt 3.7.4).



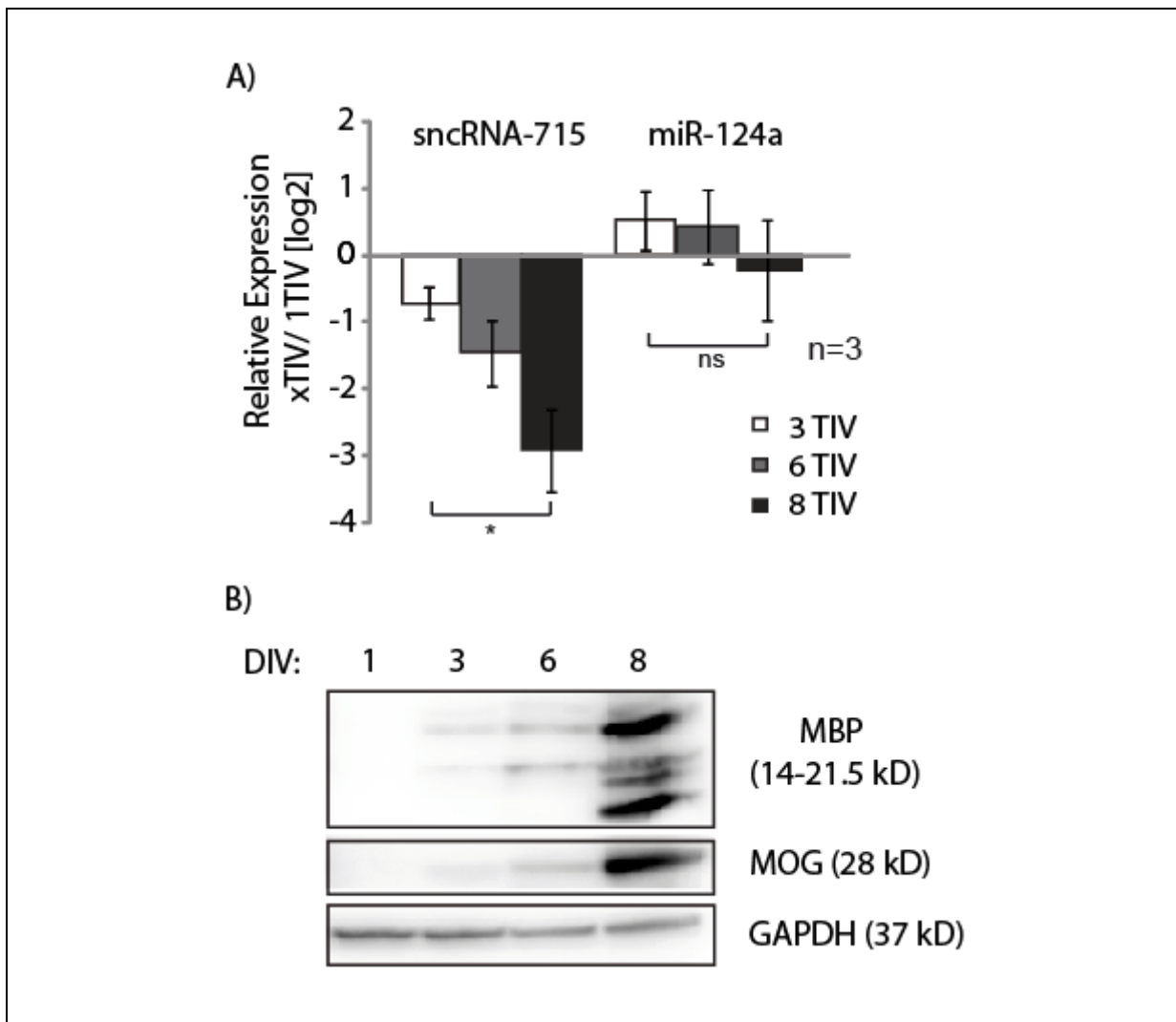
**Abbildung 24: Transfektion von 715-Mimic und 715-GFP-Plasmid in Oli-neu Zellen**

Das PCR Produkt der 715-Mimic Transfektion (A) und der 715-GFP-*hairpin* Plasmid Transfektion (B) weist die gleiche Größe auf wie das endogene PCR Produkt in den Kontroll-Transfektionen. Die Relative Menge an sncRNA-715 in der synthetischen 715-Mimic Transfektion ist 2320-mal höher gegenüber der siRNA (Kontrolle) Transfektion, wobei die 715-GFP-*hairpin* Plasmid Transfektion die relative Menge an sncRNA-715 nur um das 2,4-fache steigert.

### 4.2.3 SncRNA-715 Expression und MBP Protein Synthese in Oligodendrozyten

Als nächstes wurde die Expression der sncRNA-715 während der Differenzierung von kultivierten Oligodendrozyten analysiert. Dazu wurde die cDNA aus primären Oligodendrozyten unterschiedlicher Entwicklungsstadien (1, 3, 6 und 8 TIV) hergestellt und eine quantitative Real-Time PCR durchgeführt. Unter Verwendung der  $\Delta\Delta C_t$ -Methode wurde die relative Menge an sncRNA-715 und miR-124a an Tag 8, 6 und 3 bestimmt und mit Tag 1 verglichen. Als Referenzgen wurde snoRNA-135 verwendet. Die relative Expression von sncRNA-715 während der Oligodendrozytendifferenzierung *in vitro* wird signifikant herunter reguliert ( $\log_2(3TIV)=-0,72 \pm 0,24$  (Mittelwert, SEM, n=3);  $\log_2(6TIV)=-1,46 \pm 0,5$  (Mittelwert, SEM, n=3);  $\log_2(8TIV)=-2,92 \pm 0,64$  (Mittelwert, SEM, n=3)), während miR-124a nicht reguliert wird ( $\log_2(3TIV)=0,52 \pm 0,44$  (Mittelwert, SEM, n=3);  $\log_2(6TIV)=0,42 \pm 0,55$  (Mittelwert, SEM, n=3);  $\log_2(8TIV)=-0,23 \pm 0,75$  (Mittelwert, SEM, n=3)).

Wie bereits in Abschnitt 2.1.1.1 erwähnt, wird während der Differenzierung der Oligodendrozyten die Menge an MBP Protein hochreguliert. Dies konnte in Western Blot Analysen bestätigt werden (Abbildung 25B). GAPDH diente als interne Ladekontrolle.



**Abbildung 25: SncRNA-715 und MBP Protein Expression während der Oligodendrozyten-Differenzierung *in vitro***

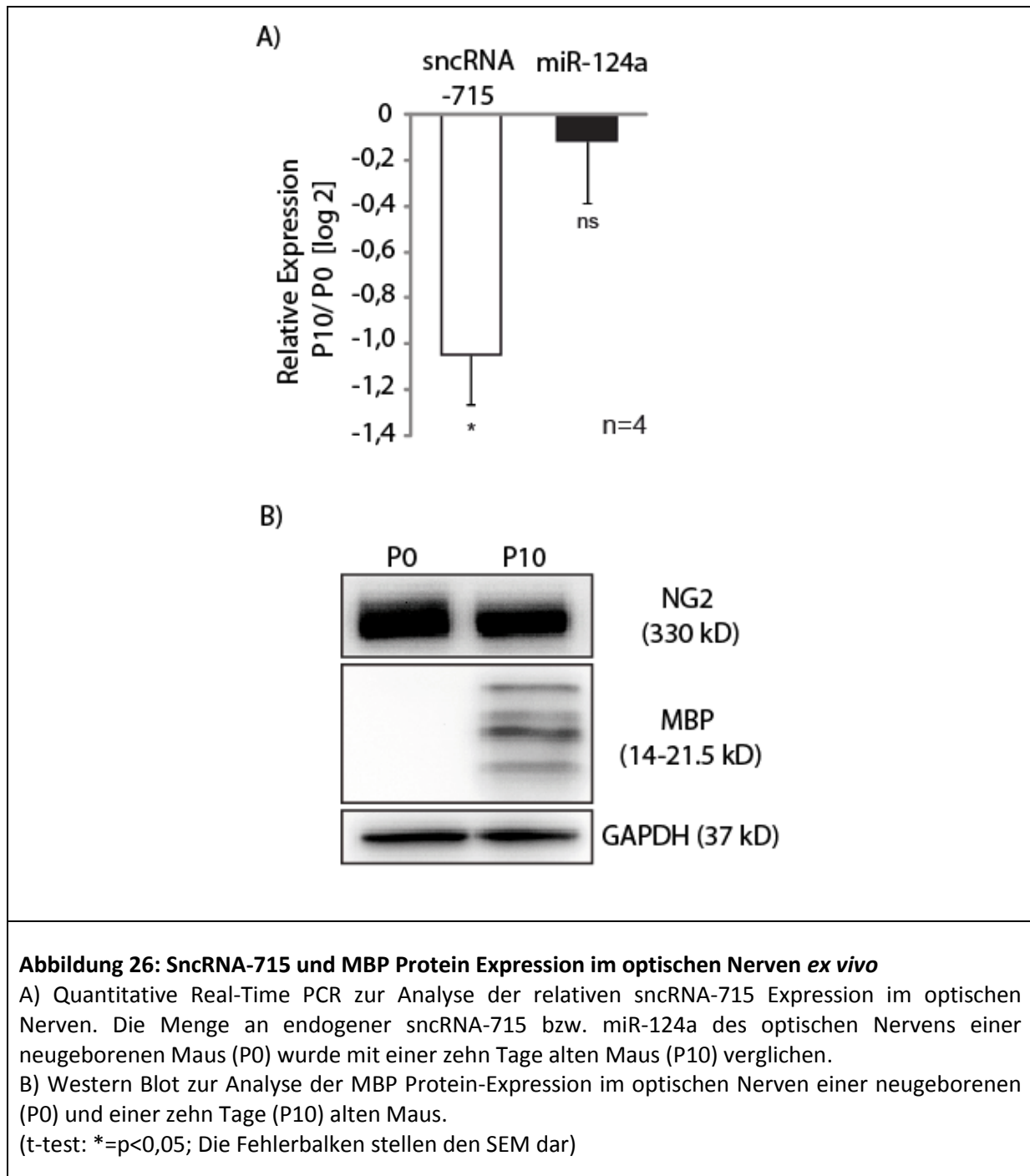
A) Quantitative Real-Time PCR zur Analyse der relativen sncRNA-715 Expression primärer Oligodendrozyten kultiviert für 1, 3, 6 und 8 Tage. Die Menge an endogener sncRNA-715 bzw. miR-124a an Tag 3, 6 und 8 wurde mit Tag 1 verglichen.

B) Western Blots zur Analyse der MBP Protein-Expression primärer Oligodendrozyten kultiviert für 1, 3, 6 und 8 Tage.

(Einstichproben- t-test:  $*=p<0,05$ ; ns (=nicht signifikant)  $>0,05$ ; die Fehlerbalken stellen den SEM dar)

Um die *in vitro* erreichten Ergebnisse zu verifizieren, wurden die Expressionen der sncRNA-715 und des MBP Proteins im optischen Neven der Maus *ex vivo* untersucht. Dazu wurden RNA und Proteine aus dem optischen Nerven einer P0 und P10 Maus isoliert und die relative Expression von sncRNA-715 über quantitative Real-Time PCR und die MBP Mengen über Western Blot analysiert. Wie in Abbildung 26A dargestellt, wird die Expression von sncRNA-715 während der Entwicklung des optischen Nervens signifikant herunter reguliert ( $\log_2(P10/P0)=-1,05 \pm 0,21$  (Mittelwert, SEM,  $n=4$ )), während die Expression der miR-124a unverändert bleibt ( $\log_2(P10/P0)=-0,12 \pm 0,27$  (Mittelwert, SEM,  $n=4$ )). Es ist davon

auszugehen, dass die veränderte sncRNA-715 Expression im optischen Nerven auf die Reifung der Oligodendrozyten zurückzuführen ist, da die Expression dieser kleinen RNA in anderen Zelltypen viel niedriger ist (siehe Abbildung 23). Übereinstimmend mit der Literatur (Colello et al., 1995) wird auch *ex vivo* die Synthese des MBP Proteins während der Entwicklung des optischen Nervens hoch reguliert (Abbildung 26B).



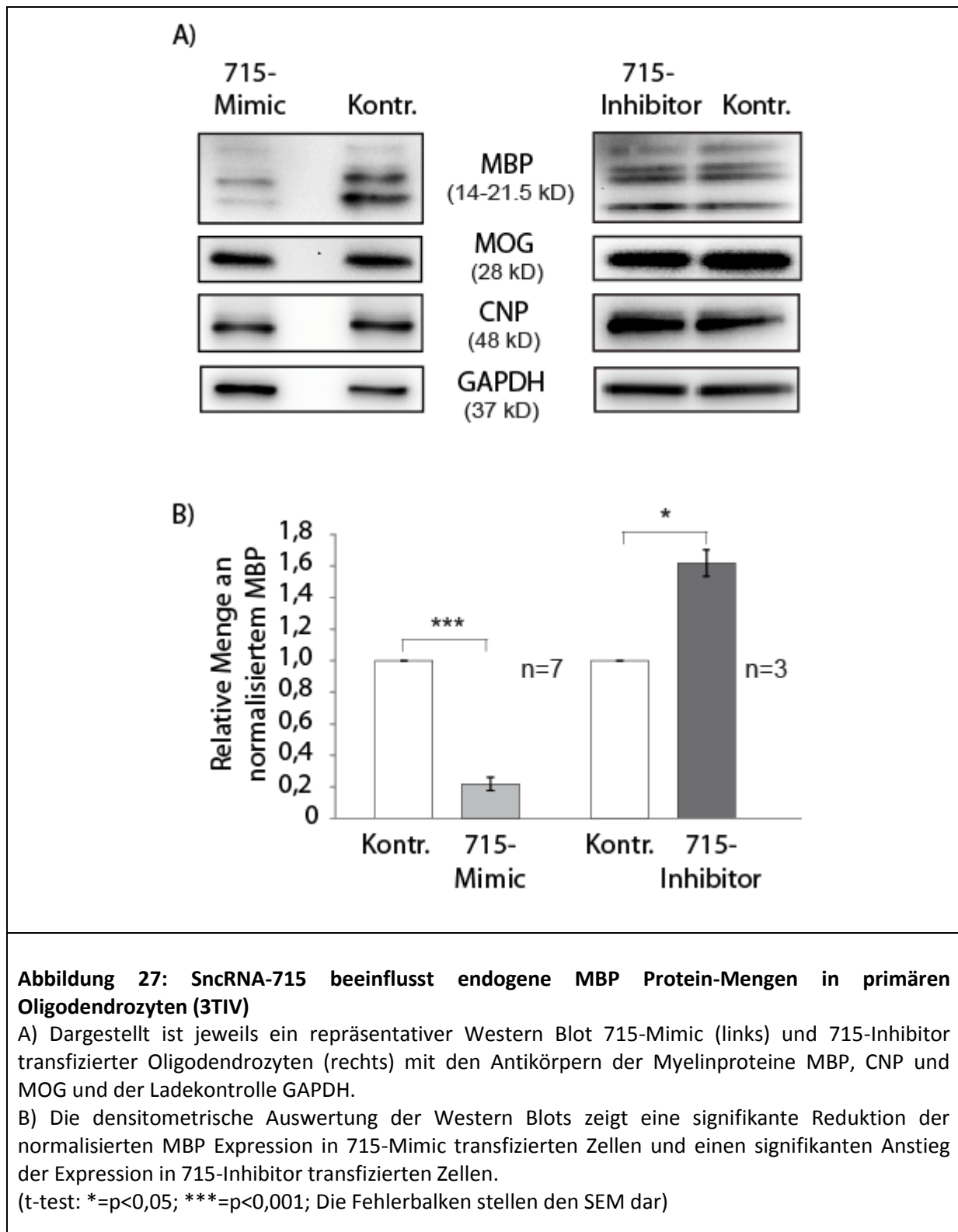
Zusammenfassend konnte bisher gezeigt werden, dass sncRNA-715 nicht nur eine potentielle Bindestelle in der 3'UTR der MBP mRNA besitzt, sondern dass die Expression der sncRNA-715 und des MBP Proteins während der Differenzierung der Oligodendrozyten *in*

*vivo* und *in vitro* invers korrelieren. Diese Resultate bestärkten das Vorhaben, die regulatorische Funktion dieser sncRNA auf die Translation von MBP weiter zu untersuchen.

#### **4.2.4 Effekt der sncRNA-715 auf die Translation des MBP Proteins**

Ob sncRNA-715 tatsächlich einen regulatorischen Effekt auf die Translation von MBP Protein hat, wurde durch die Transfektion der synthetischen 715-Mimic in primäre Oligodendrozyten (1TIV) überprüft. Zur Kontrolle wurden die Zellen mit einer Kontroll-siRNA behandelt. Nach einer 48 stündigen Inkubation wurden die Proteinmengen mittels Western Blot analysiert. Wie in Abbildung 27 (links) dargestellt, ist die Menge aller MBP Isoformen in 715-Mimic transfizierten Zellen gegenüber der Kontrolltransfektion deutlich reduziert, während die Mengen anderer Myelinproteine wie CNP und MOG und der Ladekontrolle GAPDH nicht beeinflusst werden. Um die endogene sncRNA-715 zu inhibieren, wurden die Zellen mit einer komplementären Sequenz der sncRNA-715, dem sogenannten 715-Inhibitor, transfiziert. Wie in Abbildung 27 (rechts) dargestellt, scheint der 715-Inhibitor die Interaktion der endogenen sncRNA-715 zu verhindern und bewirkt somit eine gesteigerte Synthese des MBP Proteins, während MOG, CNP und GAPDH nicht reguliert werden.

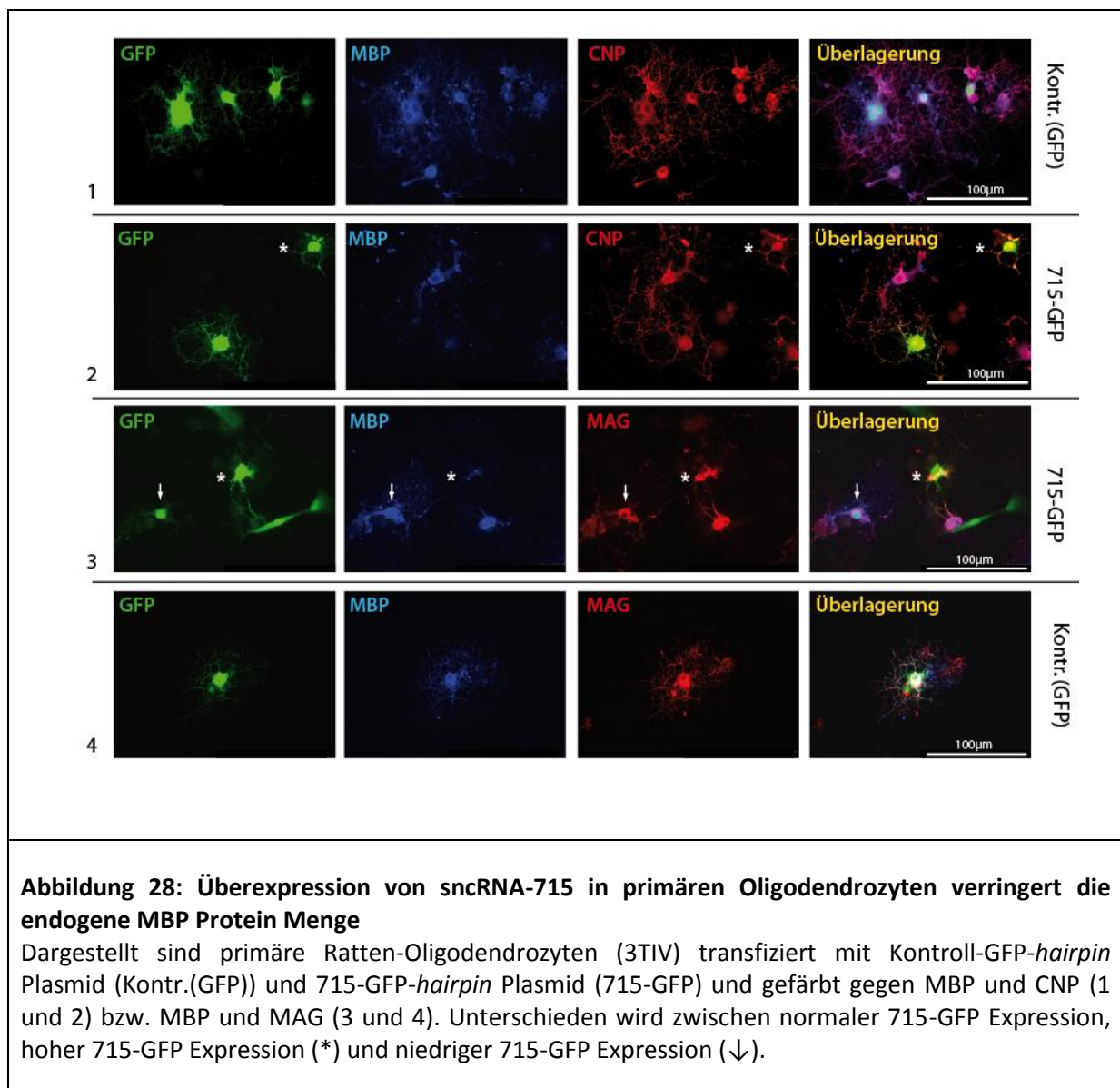
Um herauszufinden, ob sncRNA-715 spezifisch die Synthese von MBP Protein beeinflusst, oder ob es generell einen Effekt auf die Oligodendrozyten-Differenzierung gibt, wurden densitometrische Auswertungen von verschiedenen Western Blots durchgeführt. Dazu wurde die MBP Protein-Menge auf die MOG Protein-Menge normalisiert, da MOG gleichzeitig oder nach MBP in kultivierten Oligodendrozyten exprimiert wird (Pfeiffer et al., 1993) (siehe Abbildung 25B). Die normalisierten Mengen an MBP Protein in der 715-Mimic Transfektion bzw. der 715-Inhibitor Transfektion wurden auf die Kontroll-Transfektion bezogen. Dabei reduziert 715-Mimic die relative Menge an normalem MBP Protein auf  $0,22 \pm 0,01$  (Mittelwert, SEM,  $n=7$ ) (Abbildung 27B, links) und der 715-Inhibitor erhöht die Protein-Menge auf  $1,62 \pm 0,08$  (Mittelwert, SEM,  $n=3$ ) (Abbildung 27B, links). Zusammenfassend ist der Effekt von sncRNA-715 spezifisch auf das MBP Protein und scheint keinen offensichtlichen Einfluss auf die Reifung der Oligodendrozyten zu haben.



Um die translationale Inhibition von sncRNA-715 auf das MBP Protein in einzelnen Zellen zu zeigen, wurden primäre Ratten-Oligodendrozyten (3TIV) mit einem 715-GFP-*hairpin* Plasmid, welches neben der sncRNA-715 das GFP Protein koexprimiert, oder einem Kontroll-GFP-*hairpin* Plasmid, welches nur GFP und eine *scrambled* miRNA exprimiert, transfiziert. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen fixiert und gegen die Myelinproteine MBP,

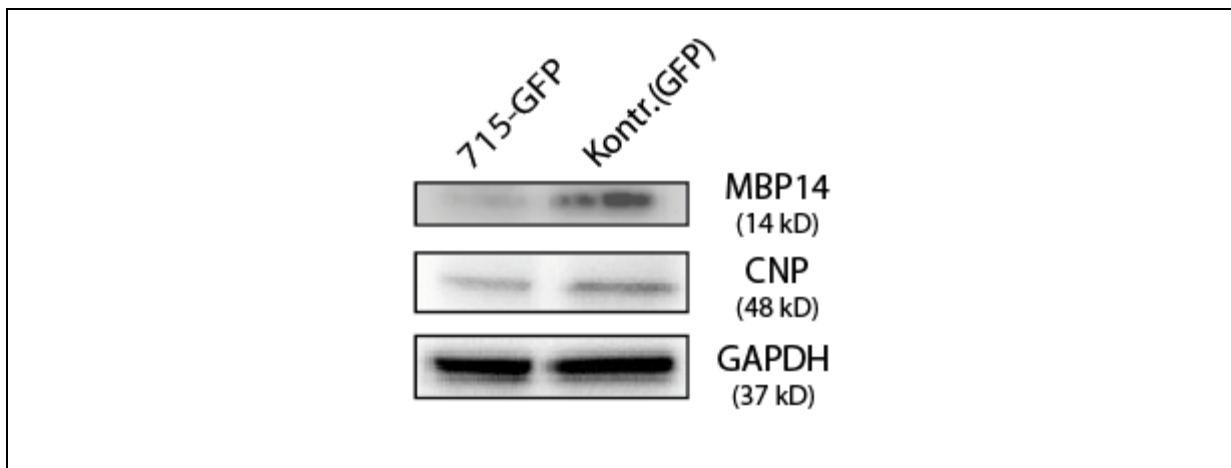


oder MAG gefärbt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 28 zusammengefasst. Zellen, die für das Kontroll-GFP-*hairpin* Plasmid positiv sind, sowie alle untransfizierten Zellen, haben einen normalen Gehalt an den Proteinen MBP, CNP und MAG. Im Gegensatz dazu, ist die MBP Proteinmengen in GFP und *sncRNA-715* koexprimierenden Zellen reduziert, wobei CNP und MAG nicht beeinflusst werden. Zellen, die weniger *sncRNA-715* exprimieren, können immer noch geringe Mengen an MBP Protein synthetisieren (in Abbildung 28 mit einem Pfeil versehen). Dagegen können Zellen, die mehr *sncRNA-715* exprimieren, kein MBP Protein mehr bilden (in Abbildung 28 mit einem Stern versehen). Die Menge an endogenem MBP Protein scheint in einzelnen Zellen von den Mengen an *sncRNA-715* abhängig zu sein. Je höher die *sncRNA-715* Expression, desto geringer die MBP Protein-Mengen und umgekehrt.



Diese Ergebnisse wurden ergänzend in einem weiteren Versuch in der Zelllinie *Oli-neu* validiert. Da diese Vorläuferzelllinie nicht genügend Mengen an MBP Protein bildet, die im Western Blot detektiert werden könnten, mussten die Zellen mit einem MBP Plasmid (MBP14-IRES-GFP) transfiziert werden. Dieses Plasmid enthält neben der Sequenz für die

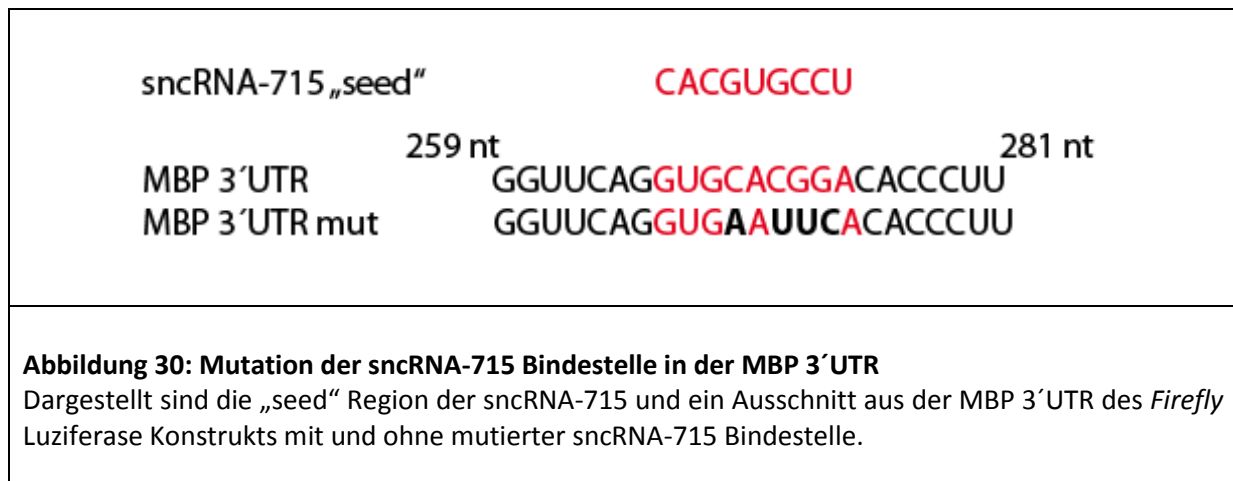
Isoform MBP14 die komplette 3'UTR mit der sncRNA-715 Bindestelle, die wie bereits erwähnt, in allen Isoformen der Maus gleich ist. Darüber hinaus hat dieses Plasmid eine interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES), die die Koexpression des GFP-Reporterkonstruktes ermöglicht. Zusätzlich wurde mit einem Kontroll-GFP-*hairpin* Plasmid oder dem 715-GFP-*hairpin* Plasmid transfiziert. Nach 48 stündiger Inkubation wurde die Proteinexpression mit Hilfe eines Western Blots analysiert. Wie in Abbildung 29 dargestellt, verringert die Überexpression von sncRNA-715 die ektopische MBP Expression in Oli-*neu* Zellen im Vergleich zu Kontroll-transfizierten Zellen.



**Abbildung 29: Überexpression von sncRNA-715 in Oli-*neu* Zellen verringert MBP Synthese**

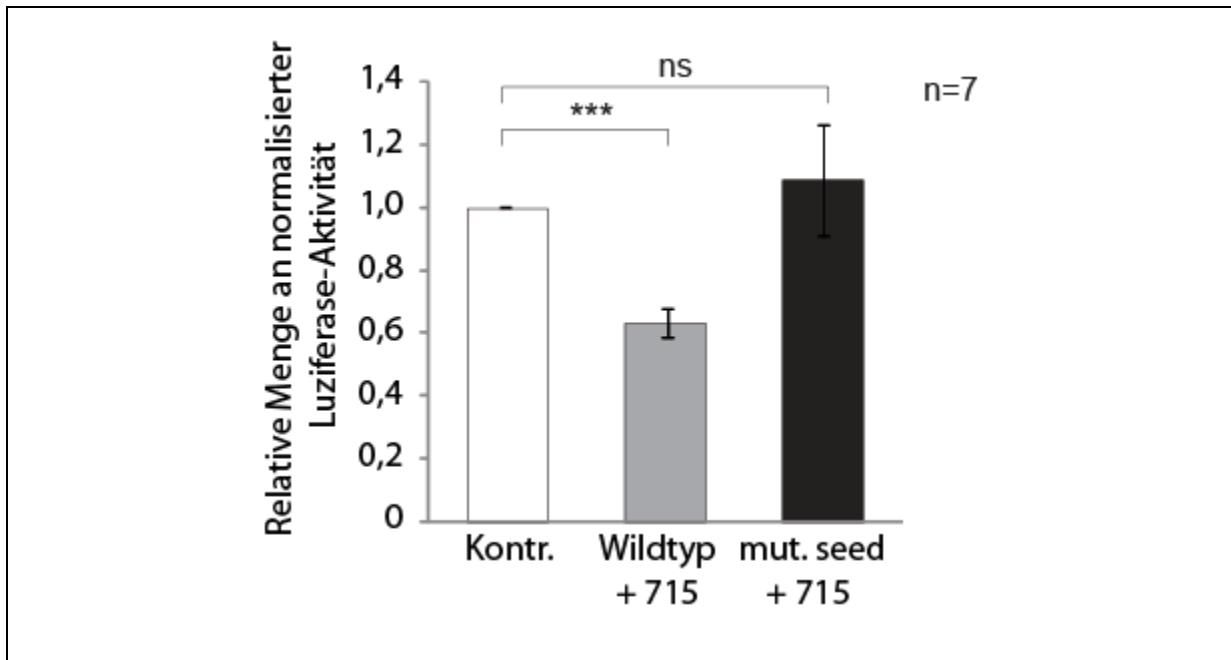
Dargestellt ist ein Western Blot mit MBP-Plasmid (MBP14-IHRES-GFP) und 715-GFP-*hairpin* Plasmid (715-GFP) oder Kontroll-GFP-*hairpin* Plasmid kotransfizierter Oli-*neu* Zellen. Die 715-GFP transfizierten Zellen zeigen eine verminderte MBP14 Expression.

Bisher konnte gezeigt werden, dass sncRNA-715 spezifisch die Translation des MBP Proteins hemmt. Im nächsten Versuch wurde mit Hilfe des Luziferase-Versuchs überprüft, ob die sncRNA-715 vermittelte translationale Inhibition über die Interaktion der sncRNA mit der potentiellen Bindestelle in der 3'UTR der MBP mRNA erfolgt. Dazu wurde ein Luziferase Reporter verwendet, welcher eine 378 Nukleotid lange Sequenz der MBP 3'UTR inklusive der potentiellen sncRNA-715 Bindestelle hinter der *Firefly* Luziferase kodierende Sequenz enthielt (White et al., 2008). In einem weiteren Konstrukt wurde die sncRNA-715 Bindestelle mutiert, indem vier Nukleotide in den Positionen 269, 271, 272 und 273 in der MBP 3'UTR ausgetauscht wurden. In Abbildung 30 sind die „seed“ Region der sncRNA-715, ein Ausschnitt aus der MBP3'UTR des *Firefly* Luziferase-Konstrukts und die mutierte Version dargestellt.



Im Versuch wurden entweder das mutierte oder das Wildtyp *Firefly* Luziferase-Konstrukt mit dem 715-GFP-*hairpin* Plasmid oder dem Kontroll-GFP-*hairpin* Plasmid kotransfiziert. Es war zu erwarten, dass die Interaktion von sncRNA-715 die Translation des Wildtyp *Firefly* Luziferase-Reporters inhibiert und dessen Luziferase-Aktivität senkt, wobei sncRNA-715 keinen Einfluss auf das mutierte Konstrukt haben sollte. Um experimentelle Schwankungen, wie zum Beispiel die Transfektionseffizienz, allgemeine Translationseffekte und die Viabilität der Zellen auszugleichen, wurde mit einer *Renilla* Luziferase kotransfiziert. Durch die unterschiedliche Substratspezifität der beiden Luziferase Enzyme, laufen unterschiedliche biolumineszierende Reaktion ab, die eine selektive Zuordnung der Biolumineszenz ermöglichen. Das emittierte Licht wurde mit einem Luminometer gemessen und als relative Lichteinheiten (RLU) abgelesen.

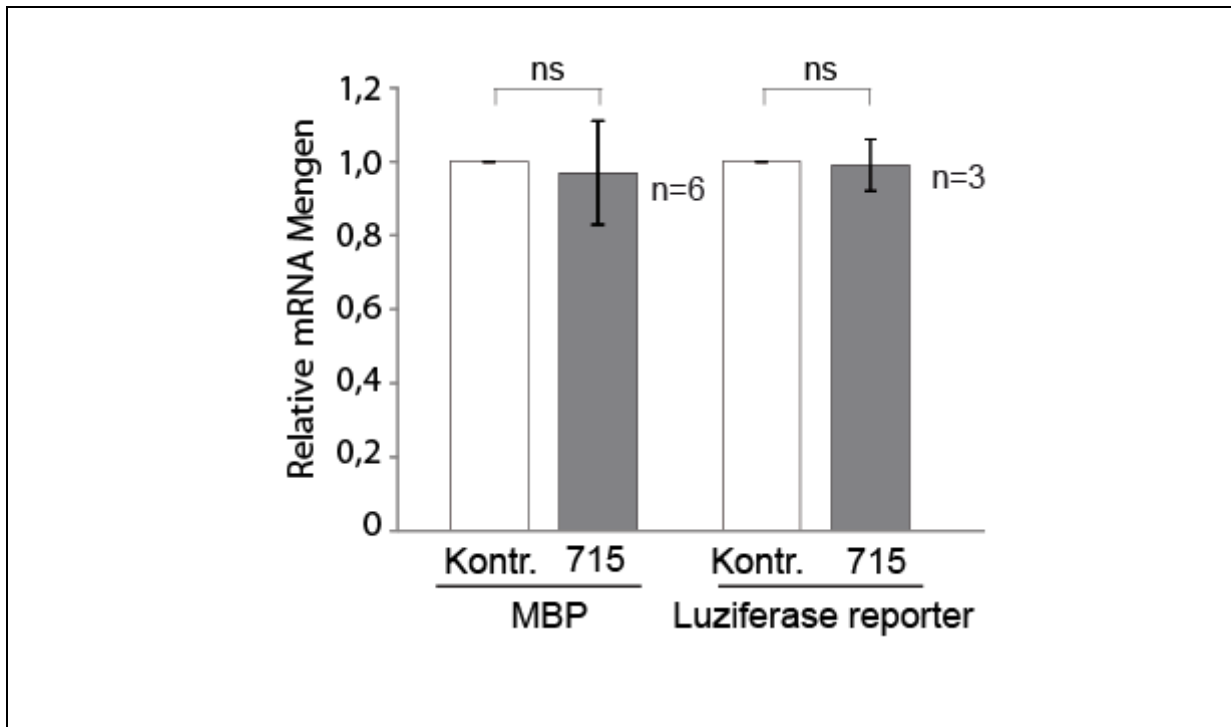
48 Stunden nach der Transfektion wurden die RLU der *Firefly* Luziferase gegen die der *Renilla* Luziferase normalisiert (Abbildung 31). Die normalisierten Werte wurden in der Kontrolltransfektion gleich 1 gesetzt und mit den Werten der 715-Transfektionen verglichen, die jeweils mit dem Wildtyp oder dem mutierten MBP3'UTR *Firefly* Luziferase-Konstrukt kotransfiziert worden waren. Die relativen Mengen an normalisierter Luziferase-Aktivität sind in Abbildung 31 dargestellt und liegen in 715-GFP-*hairpin*- und Wildtyp *firefly* Luziferase kotransfizierten Zellen bei 0,64 +/- 0,05 (Mittelwert, SEM, n=7) und in 715-GFP-*hairpin*- und mutierter *Firefly* Luziferase kotransfizierten Zellen bei 1,07 +/- 0,17 (Mittelwert, SEM, n=7). Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die Kotransfektion eines *Firefly* Luziferase Reporters, welcher Teile der MBP 3'UTR inklusive der sncRNA-715 Bindestelle enthält, mit dem 715-GFP-*hairpin* Plasmid, zu einer signifikanten Reduktion der normalisierten *Firefly* Luziferase-Aktivität führt. Die Mutation der potentiellen sncRNA-715 Bindestellen hebt hingegen den sncRNA-715 vermittelten Effekt auf.



**Abbildung 31: SncRNA-715 vermittelte Translationsinhibition erfolgt über die Bindestelle in der MBP 3'UTR**

Dargestellt ist das Ergebnis des Luziferase-Versuchs. Die Kontroll-transfizierten Zellen (d.h. Kontroll-GFP-hairpin Plasmid kotransfiziert entweder mit Wildtyp oder mutiertem *Firefly* Luziferase Konstrukt) wurden gleich 1 gesetzt. Die 715-GFP-hairpin-transfizierten Zellen mit Wildtyp bzw. mutiertem *Firefly* Luziferase Konstrukt wurden auf die Kontrolltransfektion bezogen. Die relativen Mengen an normalisierter Luziferase-Aktivität in 715-GFP-hairpin- und Wildtyp *Firefly* Luziferase kotransfizierten Zellen ist signifikant reduziert. In 715-GFP-hairpin- und mutierter *Firefly* Luziferase kotransfizierten Zellen bleibt die normalisierte Luziferase-Aktivität unverändert. (Wilcoxon signed-rank test: \*\*\*= $p < 0,001$ ; die Fehlerbalken stellen den SEM dar)

MiRNAs binden in der Regel in der 3'UTR der mRNA und verhindern die Synthese des Proteins, indem sie die Translation inhibieren oder die mRNA abbauen (Da Sacco & Masotti, 2012). Im nächsten Versuch sollte geklärt werden, ob sncRNA-715 die Synthese des MBP Proteins verhindert, indem die Translation gehemmt oder die mRNA abgebaut wird. Dazu wurde die MBP mRNA nach der Transfektion von 715-Mimic oder Kontroll-siRNA in primäre Oligodendrozyten bzw. die Luziferase mRNA nach Kotransfektion von Wildtyp *Firefly* Luziferase und 715-GFP-hairpin- oder Kontroll- GFP-hairpin-Plasmid in Oli-neu Zellen mittels Realtime PCR quantitativ bestimmt. Wie in Abbildung 32 dargestellt, sind die relativen MBP und Luziferase Mengen in der 715-Transfektion im Vergleich zur Kontroll-Transfektion unverändert. Anhand dieser Ergebnisse kann festgelegt werden, dass sncRNA-715 die Stabilität der Ziel-mRNA nicht beeinflusst. Die Interaktion von sncRNA-715 mit der Bindestelle in der MBP 3'UTR führt zur translationalen Hemmung und nicht zum Abbau der mRNA.



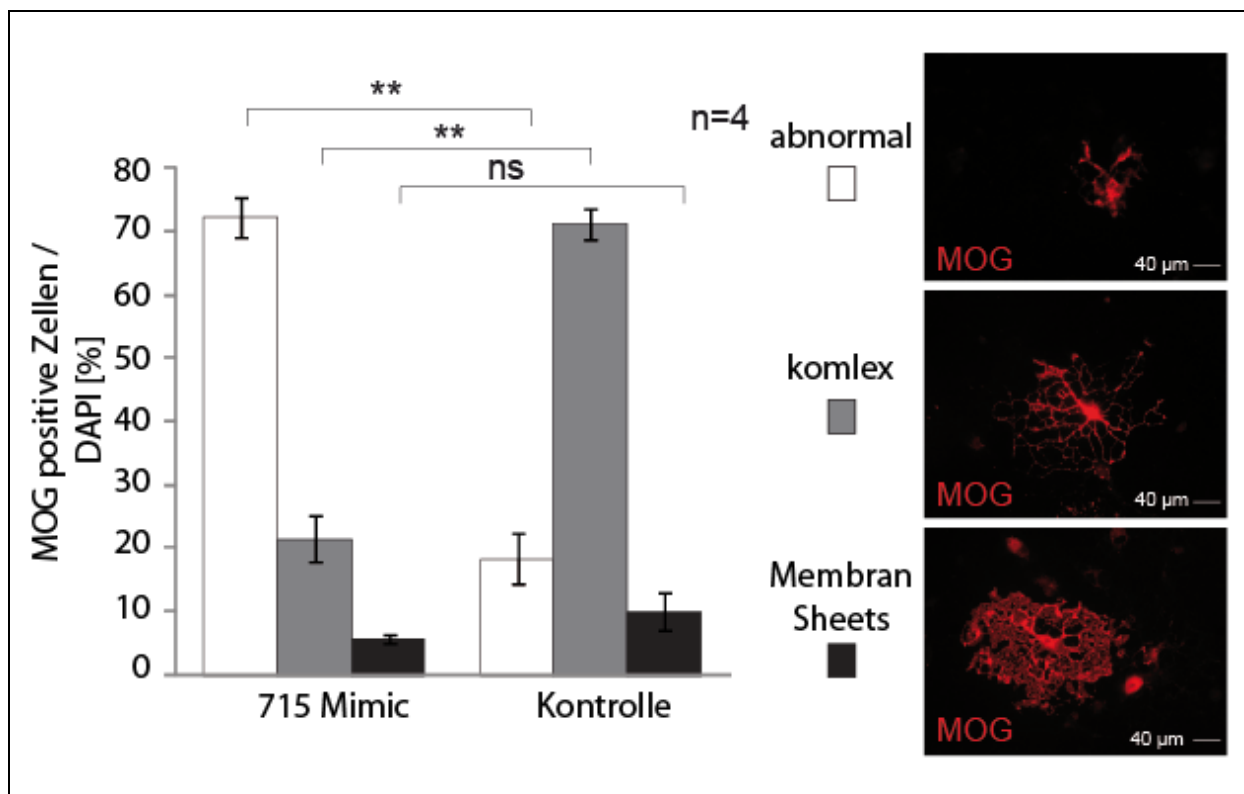
**Abbildung 32: Einfluss der sncRNA-715 auf die Stabilität der mRNA**

Die Transfektion von 715-Mimic oder Kontroll-siRNA in primären Oligodendrozyten bzw. die Kotransfektion von Wildtyp *Firefly* Luciferase und 715-GFP-*hairpin*- oder Kontroll- GFP-*hairpin*-Plasmid in *Oli-neu* Zellen verändert nicht die relativen MBP bzw. Luciferase Reporter mRNA Mengen. (t-test: ns (=nicht signifikant) >0,05; die Fehlerbalken stellen den SEM dar)

#### 4.2.5 SncRNA-715 beeinflusst die Morphologie und reduziert die Zellzahl

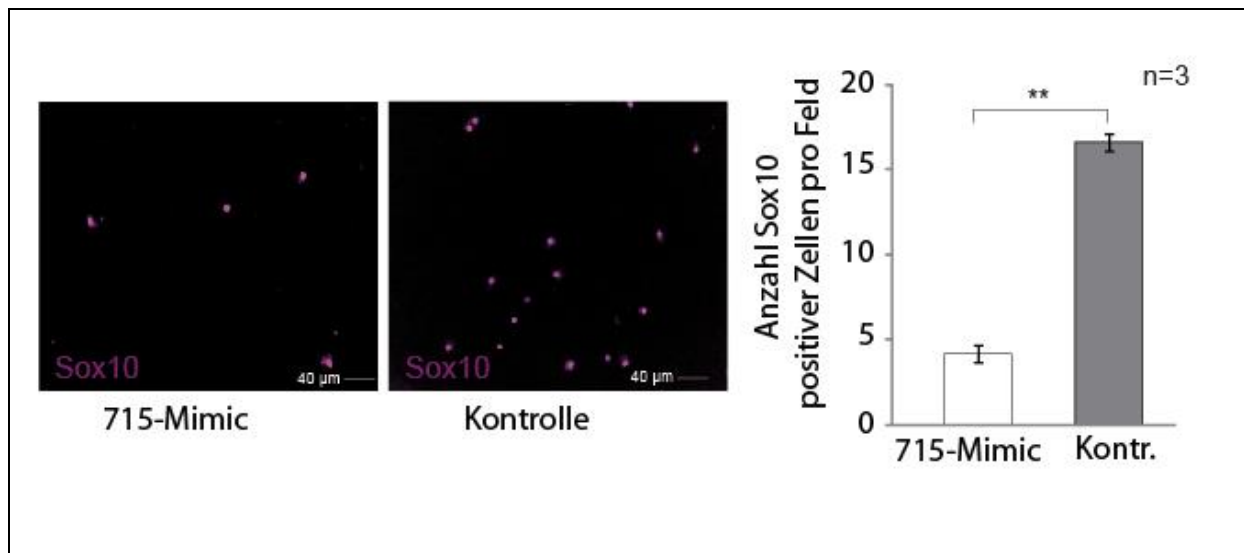
Es konnte beobachtet werden, dass sncRNA-715 transfizierte Oligodendrozyten kürzere oder abnormale Fortsätze besaßen und dass allgemein die Zellen morphologisch verändert waren. Aus diesem Grund wurden primäre Maus Oligodendrozyten (1TIV) mit der synthetischen sncRNA-715 transfiziert. Zur Kontrolle wurden die Zellen mit einer Kontroll-siRNA behandelt. Nach einer 48 stündigen Inkubation wurden die Zellen fixiert und gegen das Myelinprotein MOG und das Kernprotein DAPI gefärbt. Um die morphologische Veränderung zu quantifizieren, wurden die Zellen in drei Kategorien eingeteilt. Es wurde unterschieden zwischen MOG<sup>+</sup>-Zellen, deren Fortsätze stark verzweigt waren (komplex), reiferen Zellen, die bereits flache Membranbereiche (sog. Membran-Sheets) ausbilden und Zellen, die eine abnormale Morphologie aufwiesen (abnormal). Letztere findet man normalerweise eher selten in Oligodendrozyten-Kulturen. Im Versuch wurden die MOG<sup>+</sup>-Zellen jeder Kategorie gezählt und auf die Gesamtzellzahl (DAPI) bezogen. 72% +/- 0,03 (Mittelwert, SEM, n=4) der 715- und nur 19% +/- 0,04 (Mittelwert, SEM, n=4) der Kontroll-transfizierten Zellen haben eine abnormale Zellmorphologie (Abbildung 33). Dementsprechend bilden nur wenige 715-transfizierte Oligodendrozyten verzweigte Fortsätze (22% +/- 0,04 (Mittelwert, SEM, n=4)) oder sogar flache Membranbereiche (6% +/- 0,01 (Mittelwert, SEM, n=4)) aus. In der Kontroll-transfizierten Oligodendrozyten-Kultur haben die meisten Zellen komplexe

Fortsätze (71% +/- 0,02 (Mittelwert, SEM, n=4)) und nur 10% +/- 0,03 (Mittelwert, SEM, n=4) sind morphologisch komplexe Zellen. In der 715-Transfektion steigt im Vergleich zur Kontrolltransfektion die Anzahl der Zellen mit einer abnormalen Morphologie signifikant an, wobei Zellen mit verzweigten Ausläufern signifikant reduziert sind. Da reifere Oligodendrozyten in 3 Tage alten Kulturen generell nicht häufig zu finden sind, verändert sich die Anzahl an Zellen, die flache Membranbereiche ausbilden in den beiden Kulturen nicht signifikant.



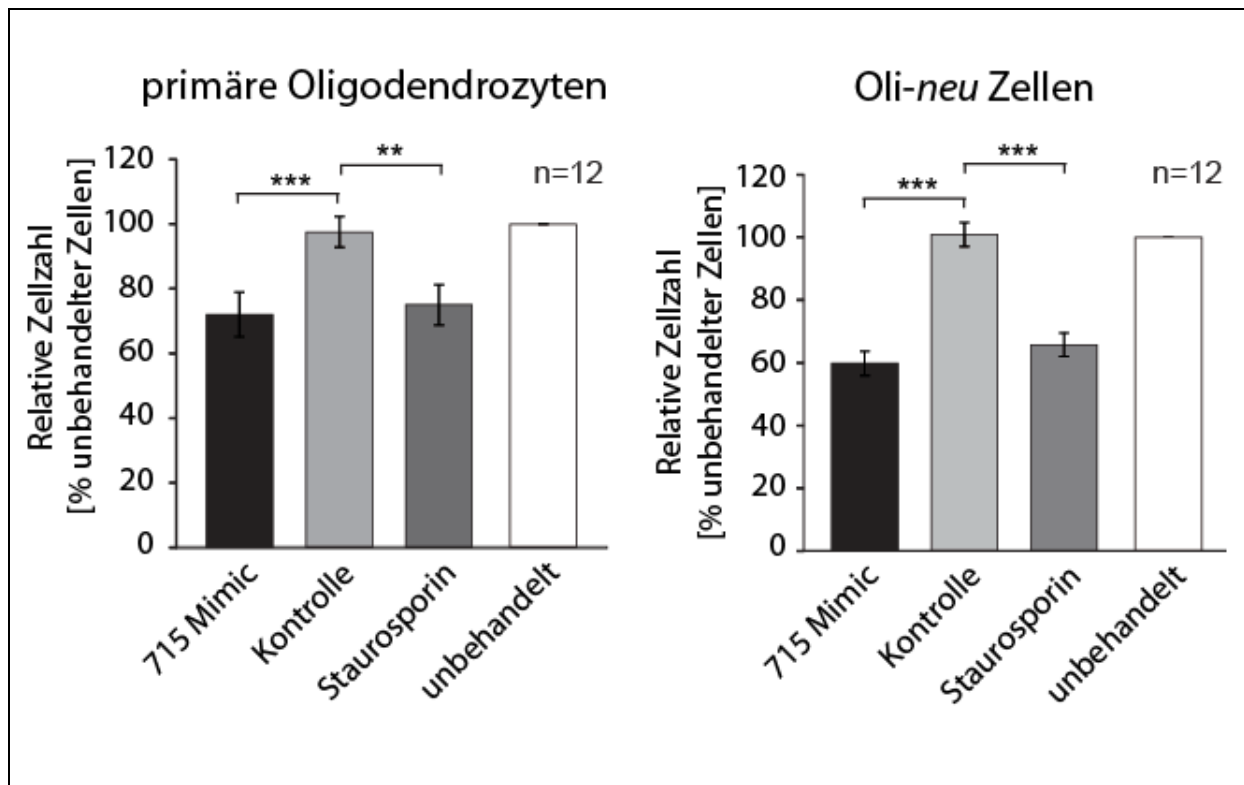
**Abbildung 33: Überexpression von sncRNA-715 verändert Morphologie primärer Oligodendrozyten**  
 Primäre Maus Oligodendrozyten (1 TIV) wurden mit der 715-Mimic oder Kontroll-siRNA transfiziert und 48h später gegen das Myelinprotein MOG gefärbt. MOG<sup>+</sup>-Zellen wurden anhand ihrer Morphologie in drei Kategorien klassifiziert (abnormal, komplex und Membran Sheet, sog. flachen Membranbereiche). MOG<sup>+</sup>-Zellen jeder Kategorie wurden gezählt und auf die Gesamtzellzahl (DAPI) bezogen.  
 (t-test: ns (=nicht signifikant) >0,05; \*\*=p<0,01; die Fehlerbalken stellen den SEM dar)

Im weiteren Verlauf der Studie konnte beobachtet werden, dass experimentell erhöhte sncNRA-715 Mengen die Zellzahl reduziert. Um dieses Ergebnis zu quantifizieren, wurden die primären Oligodendrozyten mit dem Oligodendrozyten-spezifischen Marker Sox10 gefärbt (Abbildung 34). Pro Sichtfeld wurden Sox10<sup>+</sup>-Zellen gezählt und der Mittelwert aller gezählten Felder eines Deckglases wurde als ein Versuch gewertet (n=1). In der 715-Transfektion konnten durchschnittlich ungefähr 4 und in der Kontrolle ungefähr 17 Zellen pro Sichtfeld gezählt werden. Demnach reduziert sncRNA-715 die Oligodendrozyten-Zellzahl signifikant um fast 75% +/- 0,01 (Mittelwert, SEM, n=3).



**Abbildung 34: Überexpression von sncRNA-715 in primären Oligodendrozyten reduziert die Zellzahl**  
 Primäre Maus Oligodendrozyten (1 TIV) wurden mit der 715-Mimic oder Kontroll-siRNA transfiziert und 48h später gegen das Sox10 Protein gefärbt (links). Die Anzahl Sox10<sup>+</sup>-Zellen pro Sichtfeld in der 715-Mimic und der Kontroll-Transfektion wurden gezählt und miteinander verglichen. SncRNA-715 reduziert die Zellzahl signifikant.  
 (t-test: \*\*= $p < 0,01$ ; die Fehlerbalken stellen den SEM dar)

Diese Ergebnisse wurden in einem weiteren Versuch in Oligodendrozyten und *Oli-neu* verifiziert. Dazu wurden diese Zellen mit der synthetischen sncRNA-715 und der Kontrolle transfiziert. Als Positivkontrolle wurden die Zellen 24 Stunden später in einem separaten Ansatz mit Staurosporin behandelt. Staurosporin ist ein Proteinkinase-Inhibitor und induziert sowohl Caspase abhängig, als auch Caspase unabhängig Apoptose (Belmokhtar et al., 2001). 18 Stunden später wurden die Zellkerne im Rahmen des TUNEL Versuchs mit Hoechst 33342 gefärbt und in einem Mikrotiterplatten-Leser quantifiziert. Die relative Zellzahl unbehandelter Zellen wurde auf 100% gesetzt und auf die 715- bzw. Kontroll-Transfektion oder auf die mit Staurosporin behandelten Zellen bezogen (Abbildung 35). Dabei wird die relative Zellzahl primärer Oligodendrozyten signifikant in der 715-Mimic Transfektion im Vergleich zur Kontroll-Transfektion um 26% +/- 7 (Mittelwert, SEM, n=12) reduziert, Staurosporin verringert die Zellzahl um 23% +/- 6 (Mittelwert, SEM, n=12). In *Oli-neu* Zellen wird die Zellzahl in der 715-Mimic Transfektion signifikant um 40% +/- 4 (Mittelwert, SEM, n=12) reduziert, die Behandlung mit Staurosporine verringert die Zellzahl signifikant um 35% +/- 4 (Mittelwert, SEM, n=12). Auch die quantitative fluorimetrische Auswertung ergibt, das sncRNA-715 die Zellzahl signifikant reduziert.

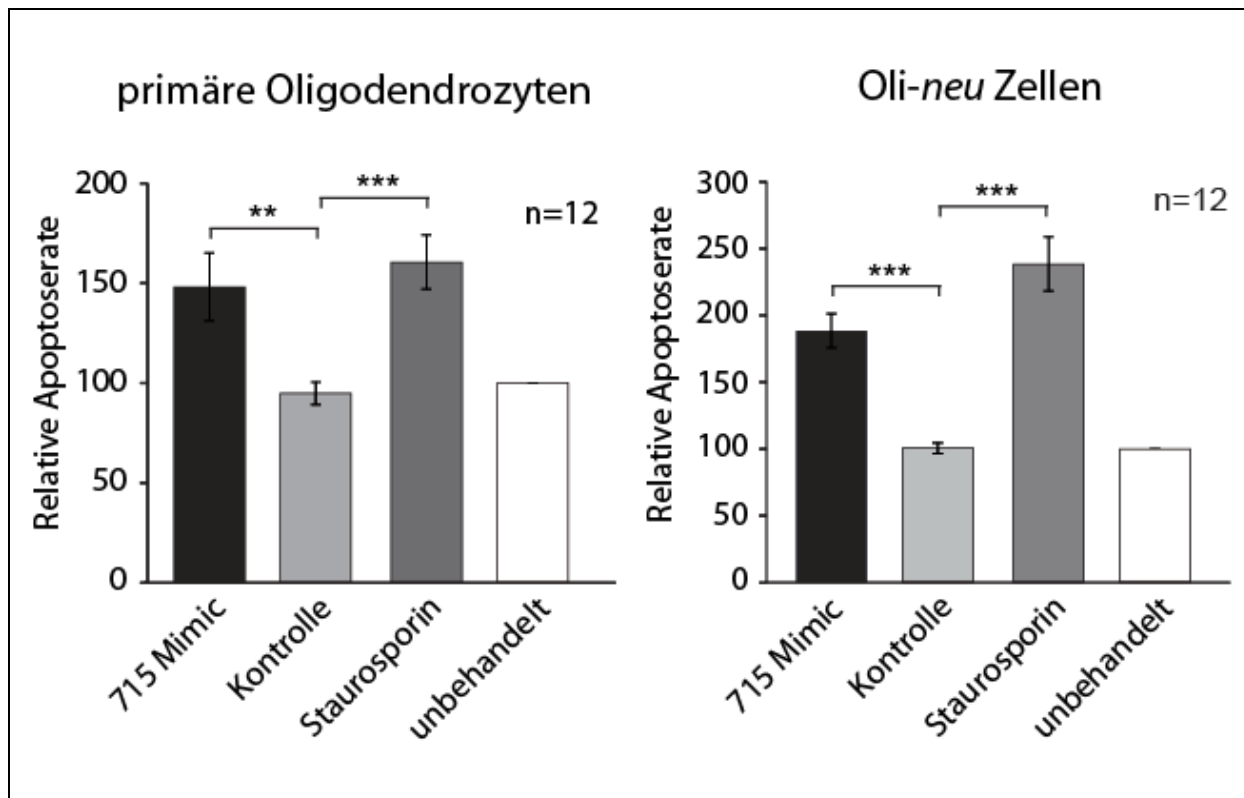


**Abbildung 35: SncRNA-715 reduziert die Zellzahl**

Primäre Oligodendrozyten (links) und Oli-*neu* Zellen (rechts) wurden mit der synthetischen sncRNA-715 (715-Mimic) und der Kontrolle transfiziert oder mit Staurosporin behandelt. Die relative Zellzahl wurde fluorimetrisch quantifiziert, in dem die Zellkerne mit Hoechst 33342 gefärbt wurden. Unbehandelte Zellen wurden auf 100% gesetzt und auf die jeweiligen Bedingungen bezogen. (t-test: \*\*= $p < 0,01$ ; \*\*\*= $p < 0,001$ ; die Fehlerbalken stellen den SEM dar)

Bisher konnte gezeigt werden, dass sncRNA-715 sowohl in primären Oligodendrozyten als auch in Oli-*neu* Zellen die Zellzahl reduziert. Mit dem fluorimetrischen TUNEL Versuch (Abschnitt 3.12) sollte überprüft werden, ob sncRNA-715 in diesen Zellen Apoptose induziert. Primäre Oligodendrozyten und Oli-*neu* Zellen wurden mit der synthetischen sncRNA-715 und einer Kontrolle transfiziert und die Apoptoserate mit dem TUNEL Versuch in einem Mikrotiterplatten-Leser bestimmt. Unbehandelte Zellen wurden auf 100% gesetzt und auf die 715- bzw. Kontroll-Transfektion und die Staurosporin Behandlung bezogen. In Abbildung 36 sind die Ergebnisse des TUNEL Versuchs dargestellt. Im Vergleich zur Kontrolltransfektion steigt in primären Oligodendrozyten die relative Apoptoserate in den 715-Mimic transfizierten Zellen signifikant um 53% +/-17 (Mittelwert, SEM, n=12) und in den Staurosporin behandelten Zellen signifikant um 66% +/- 14 (Mittelwert, SEM, n=12). Dieser Effekt ist in der Zelllinie Oli-*neu* noch stärker zu beobachten, da dort sncRNA-715 die relative Apoptoserate um 88% +/- 13 (Mittelwert, SEM, n=12) und Staurosporine sogar um 138% +/- 20 (Mittelwert, SEM, n=12) erhöht. Diese Versuche zeigen, dass sncRNA-715 nicht nur die relative Zellzahl in Oligodendrozyten und Oli-*neu* Zellen reduziert, sondern auch den programmierten Zelltod in diesen Zellen induziert.





**Abbildung 36: SncRNA-715 induziert Apoptose in primären Oli-neu Zellen**

Primäre Oligodendrozyten (links) und Oli-neu Zellen (rechts) wurden mit der synthetischen sncRNA-715 (715-Mimic) und der Kontrolle transfiziert oder mit Staurosporin behandelt. Die relative Apoptoserate wurde fluorimetrisch mit dem TUNEL Versuch quantifiziert. Unbehandelte Zellen wurden auf 100% gesetzt und auf die jeweiligen Bedingungen bezogen.

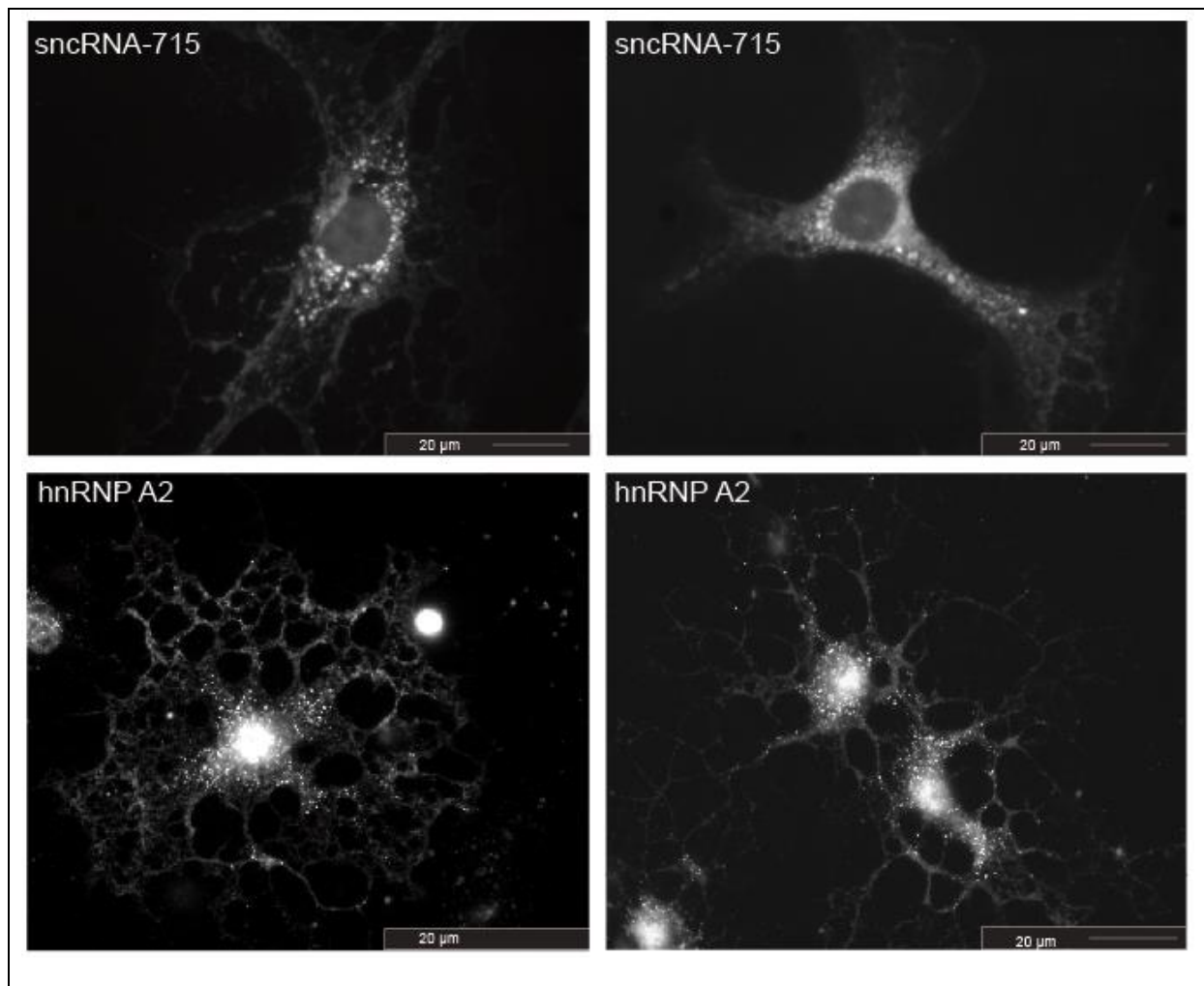
(t-test: \*\*= $p < 0,01$ ; \*\*\*= $p < 0,001$ ; die Fehlerbalken stellen den SEM dar)

#### 4.2.6 Lokalisation der sncRNA-715 in Oligodendrozyten

Da bisher gezeigt werden konnte, dass sncRNA-715 die Translation der MBP mRNA inhibieren kann, sollte untersucht werden, ob sncRNA-715 eine Komponente des MBP mRNA Lokalisationskomplexes ist.

Zunächst wurde die endogene sncRNA-715 in primären Oligodendrozyten mit Hilfe der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) Methode lokalisiert. Dazu wurden primäre Maus Oligodendrozyten 3 Tage kultiviert und anschließend die endogene sncRNA-715 mit einer spezifischen Sonde in der Zelle visualisiert. Wie in Abbildung 37 (oben) dargestellt, scheint sncRNA-715 in zytoplasmatischen granulären Strukturen, vor allem um den Zellkern, aber auch in den Fortsätzen, lokalisiert zu sein. Um herauszufinden, ob sncRNA-715 eine Komponente der hnRNP A2 Transportgranula ist, wurde versucht, die FISH zusammen mit einer immunzytochemischen Färbung gegen hnRNP A2 durchzuführen. Allerdings konnte die FISH nicht mit einer immunzytochemischen Färbung kombiniert werden, da wahrscheinlich das Epitop des hnRNP A2 Antigens während der *In-situ*-Hybridisierung zerstört wurde. Aus diesem Grund wurde in Kollaboration mit Christina Müller (Institut für Physiologie und Pathophysiologie, Mainz) eine separate hnRNP A2 Färbung primärer Oligodendrozyten (3 TIV) zum Vergleich durchgeführt (Abbildung 36; unten). Die Expression von hnRNP A2 ist im

Zellkern am stärksten. Im Zytoplasma ist hnRNP A2 auch in granulären Strukturen um den Zellkern und in den Fortsätzen lokalisiert.



**Abbildung 37: Lokalisation von snRNA-715 und hnRNP A2 in primären Oligodendrozyten (3 TIV)**

Primäre Oligodendrozyten wurden für 3 Tage kultiviert und anschließend mit einer snRNA-715 spezifischen Sonde hybridisiert (oben) oder mit einem hnRNP A2 spezifischen Antikörper gefärbt (unten).

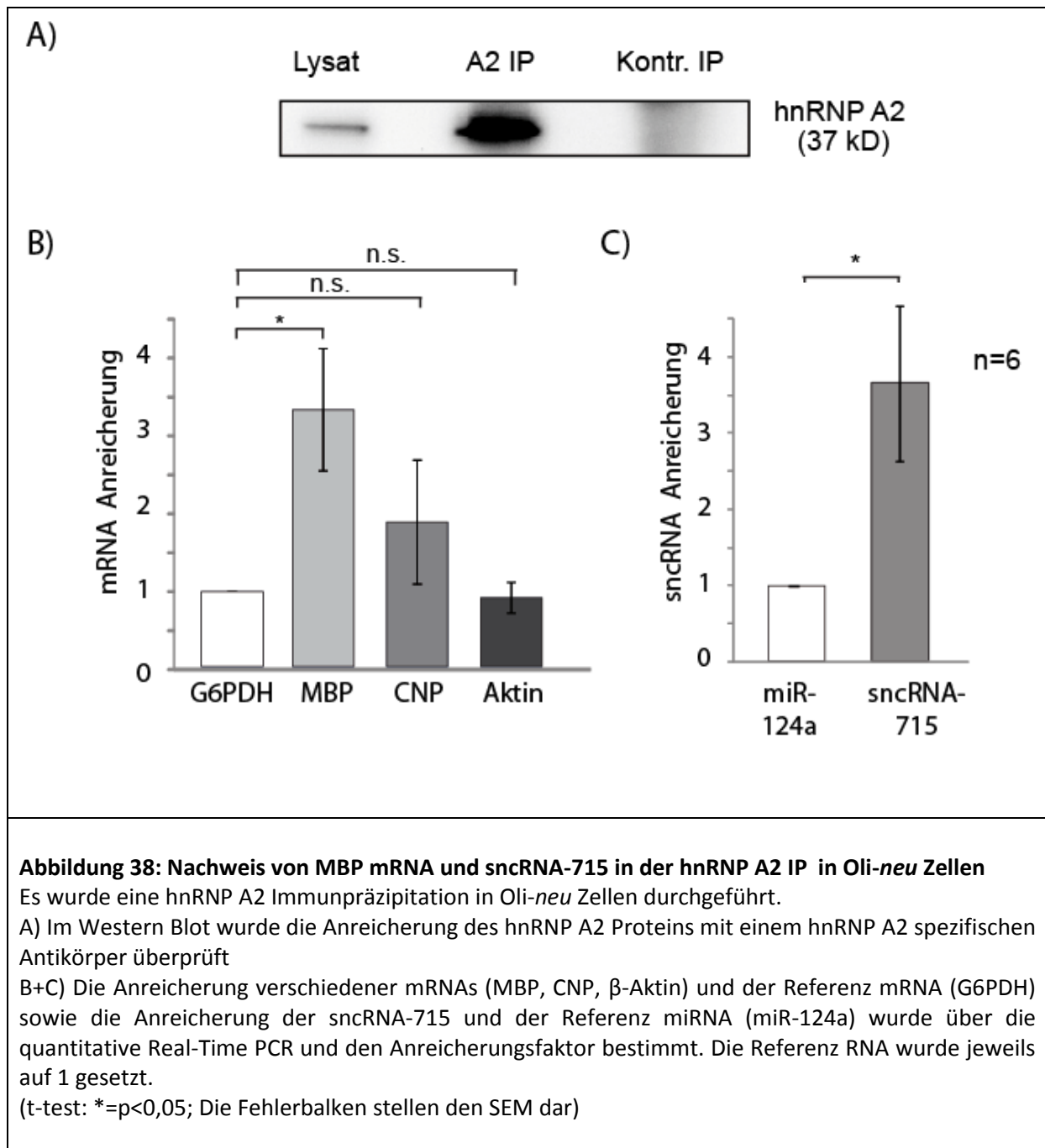
#### 4.2.7 Nachweis der snRNA-715 und MBP mRNA in hnRNP-A2 Granulen

Da es nicht möglich war, eine Kolo-kalisation von snRNA-715 und hnRNP A2 Protein in der Zelle zu zeigen, wurden die endogenen hnRNP A2 Granula mit Hilfe der hnRNP A2 Immunpräzipitation (IP) aus Oli-*neu* Zelllysaten aufgereinigt. Für die A2-IP wurde der monoklonale Antikörper EF-67 verwendet, in der Kontroll-IP wurde ein Antikörper gleichen Isotypes, der Maus Myeloma IgG Antikörper eingesetzt. Im Western Blot wurde mit einem hnRNP A2 spezifischen Antikörper die Anreicherung des Proteins in der IP überprüft. In Abbildung 38A ist das Ergebnis dargestellt. Wie erwartet, ist endogenes hnRNP A2 im Oli-*neu* Zelllysate zu finden. In der A2 IP kann hnRNP A2 gegenüber dem Lysat angereichert werden. In der Kontroll-IP kann keine hnRNP A2 Bande detektiert werden. Mit Hilfe der

Immunpräzipitation konnte das hnRNP A2 Protein spezifisch aufgereinigt und angereichert werden.

Aus der Immunpräzipitation wurden nicht nur Proteine, sondern auch RNA isoliert. Nach der reversen Transkription wurden die mRNA Mengen von MBP, CNP,  $\beta$ -Aktin und G6PDH durch Real-Time PCR quantifiziert. Zur Berechnung der Anreicherung der mRNAs in der A2-IP wurde der Anreicherungsfaktor bestimmt (3.10.2.2). Das Referenzgen G6PDH wurde auf 1 gesetzt. Alle Anreicherungswerte wurden auf das Referenzgen normalisiert. Die Anreicherungswerte für die jeweiligen mRNAs sind in Abbildung 38B graphisch aufgezeigt. Die MBP mRNA ist in der A2 IP signifikant um den Faktor 3,34  $\pm$  0,78 (Mittelwert, SEM, n=6) angereichert. Die beiden anderen mRNAs,  $\beta$ -Aktin und CNP, können nicht angereichert werden. Dieses Ergebnis zeigt, dass die MBP mRNA mit hnRNP A2 assoziiert. Darüber hinaus dient die Anreicherung der MBP mRNA als Positivkontrolle für die Integrität des hnRNP A2 Granulas nach der Aufreinigung.

Im nächsten Schritt sollte überprüft werden, ob auch die sncRNA-715 in der A2 IP angereichert ist. Dazu wurde die Menge an sncRNA-715 und einer Kontroll-miRNA, der miRNA-124a, durch Real-Time PCR quantifiziert und die Anreicherung in der A2 IP bestimmt. Im Vergleich zur Referenz miRNA kann sncRNA-715 um den Faktor 3,66  $\pm$  1,02 (Mittelwert, SEM, n=6) in der IP angereichert werden. Vermutlich wurde sncRNA-715 zusammen mit der MBP mRNA und dem hnRNP A2 in der IP angereichert. SncRNA-715 könnte an der Translationsinhibition von MBP mRNA während des hnRNP A2 abhängigen Lokalisationsprozesses beteiligt sein.



#### 4.2.8 SncRNA-715 Expression in chronischen MS Läsionen

Während dem fortschreitenden Verlauf von Multiple Sklerose im ZNS können fokale, demyelinisierte Bereiche zum Teil remyelinisiert werden (Noseworthy et al., 2000). In diesen Läsionen können residente OPCs aktiviert werden. Diese OPCs erhöhen unter anderem die Expression des Transkriptionsfaktors Olig2, der für die Reifung primärer Oligodendrozyten benötigt wird (Fancy et al, 2004). Ab einem bestimmten Zeitpunkt der Krankheit ist das Remyelinisierungspotenzial jedoch ausgeschöpft und es kommt schließlich zur Verschlechterung der Symptome und einem chronischen Verlauf der Krankheit. Bisher ist nicht bekannt, warum Oligodendrozyten ihr Remyelinisierungspotenzial verlieren. Die

regulatorische Funktion von sncRNA-715 auf die Translation der MBP mRNA und die Bedeutung von MBP für die Myelinisierung im ZNS führte zur Vermutung, dass sncRNA-715 auch eine potentielle Rolle in MS spielen könnte. Die Dysregulation dieser kleinen RNA in den Läsionen könnte die Synthese von MBP Protein und schließlich die Remyelinisierung verhindern.

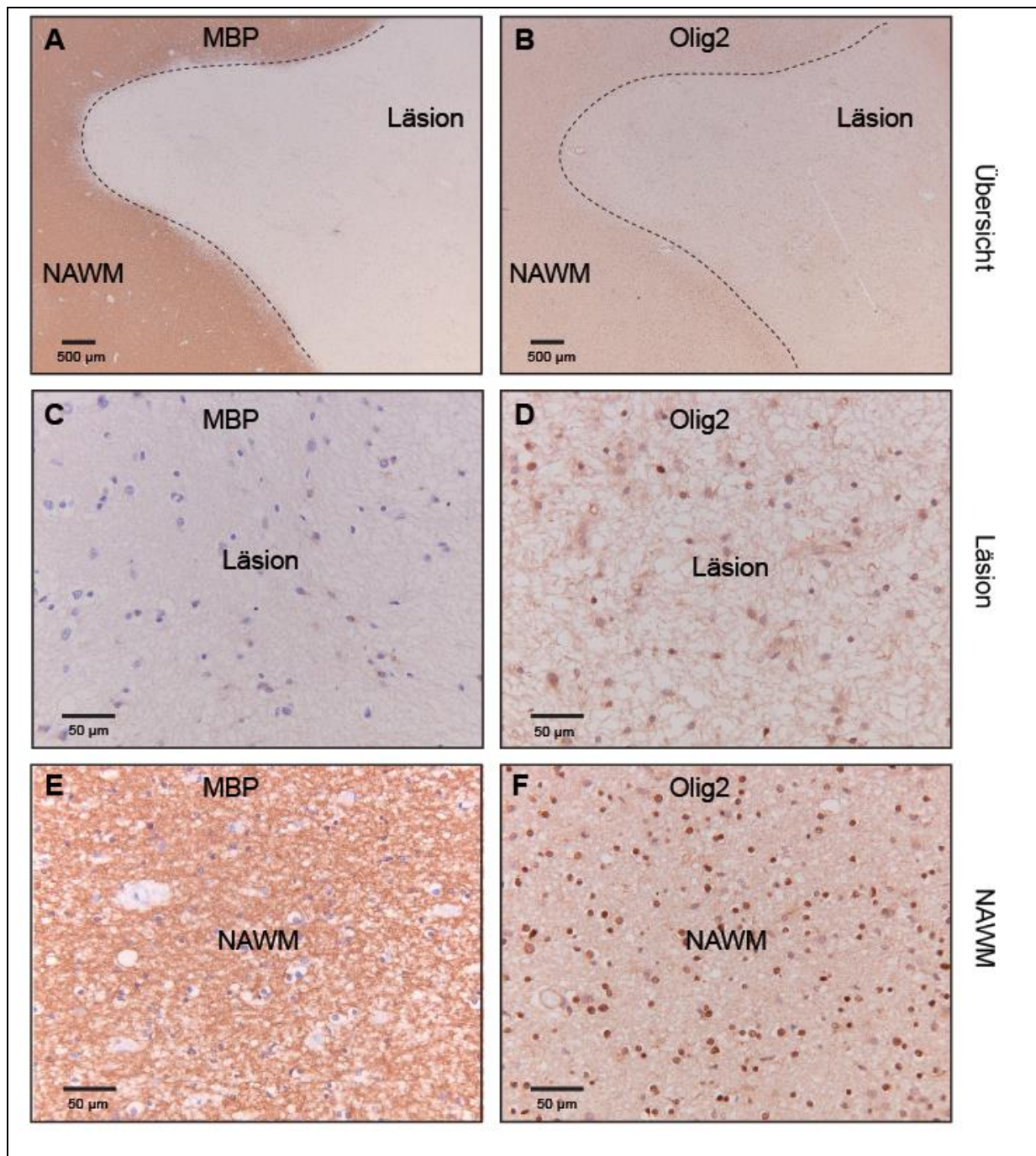
Aufgrund dieser Hypothese wurden von Mitarbeitern der Niederländische Hirnbank unter der Leitung von Dr. I Huitinga die Gehirne von vier verstorbenen MS Patienten wie in Abschnitt 3.8 direkt nach der Autopsie entnommen und fixiert. Die Patientendaten sind in Abbildung 39 aufgeführt.

Patient #	Probe	Alter	Geschlecht	Post-mortem (h)
08-047	Läsion	49	M	08:00
	NAWM			
08-128	Läsion	66	M	07:30
	NAWM			
08-051	Läsion	82	M	05:05
	NAWM			
06-054	Läsion	44	F	10:15
	NAWM			

**Abbildung 39: MS Patienten Daten**

Von jedem der vier Patienten wurde humanes Hirngewebe aus einer inaktiven MS-Läsionen in der weißen Substanz und aus der normal erscheinenden weißen Substanz (NAWM) entnommen. Die Patienten waren zum Zeitpunkt der Autopsie zwischen 44 und 82 Jahren und sowohl männlichen als auch weiblichen Geschlechtes. Die Zeit von der Feststellung des Todes bis hin zur Entnahme des Gehirns ist in der letzten Spalte der Tabelle in Stunden (h) dargestellt.

Um in humanem Hirngewebe eine chronische, inaktive MS-Läsionen in der weißen Substanz von Bereichen in der normal erscheinenden weißen Substanz (NAWM) zu unterscheiden und schließlich zu untersuchen wurden von M. Witte (Abschnitt 3.8) Hirnschnitte angefertigt und mit den Antikörpern PLP und MHC II gefärbt. Chronische MS Läsionen sind demyelinisiert und beinhalten keine aktivierten Mikroglia oder infiltrierte Leukozyten. Dementsprechend sind in diesen Bereichen keine PLP<sup>+</sup>- und MHC II<sup>+</sup>-Zellen zu finden. Die NAWM weist in der Regel keine Entzündungszeichen auf und ist normal myelinisiert. Dort sind nur PLP<sup>+</sup>-Zellen anwesend. Anschließend wurden diese Bereiche in einem weiteren Hirnschnitt gegen Olig2 und MBP gefärbt. Olig2 ist ein Oligodendrozyten spezifischer Marker und wird in allen Entwicklungsstufen exprimiert. MBP wird nur in reifen Oligodendrozyten synthetisiert (Pfeiffer et al, 1993). In Abbildung 40 kann vor allem durch die von M. Witte durchgeführte MBP Antikörperfärbung in der Übersicht die Läsion klar von der NAWM unterschieden werden. Die Expression von Olig2<sup>+</sup>- und MBP<sup>+</sup>-Zellen ist im Vergleich zur umgebenen NAWM stark vermindert. In der Läsion sind zwar Olig2<sup>+</sup>-Zellen vorhanden, sie können aber nicht in MBP<sup>+</sup>-Zellen differenzieren.

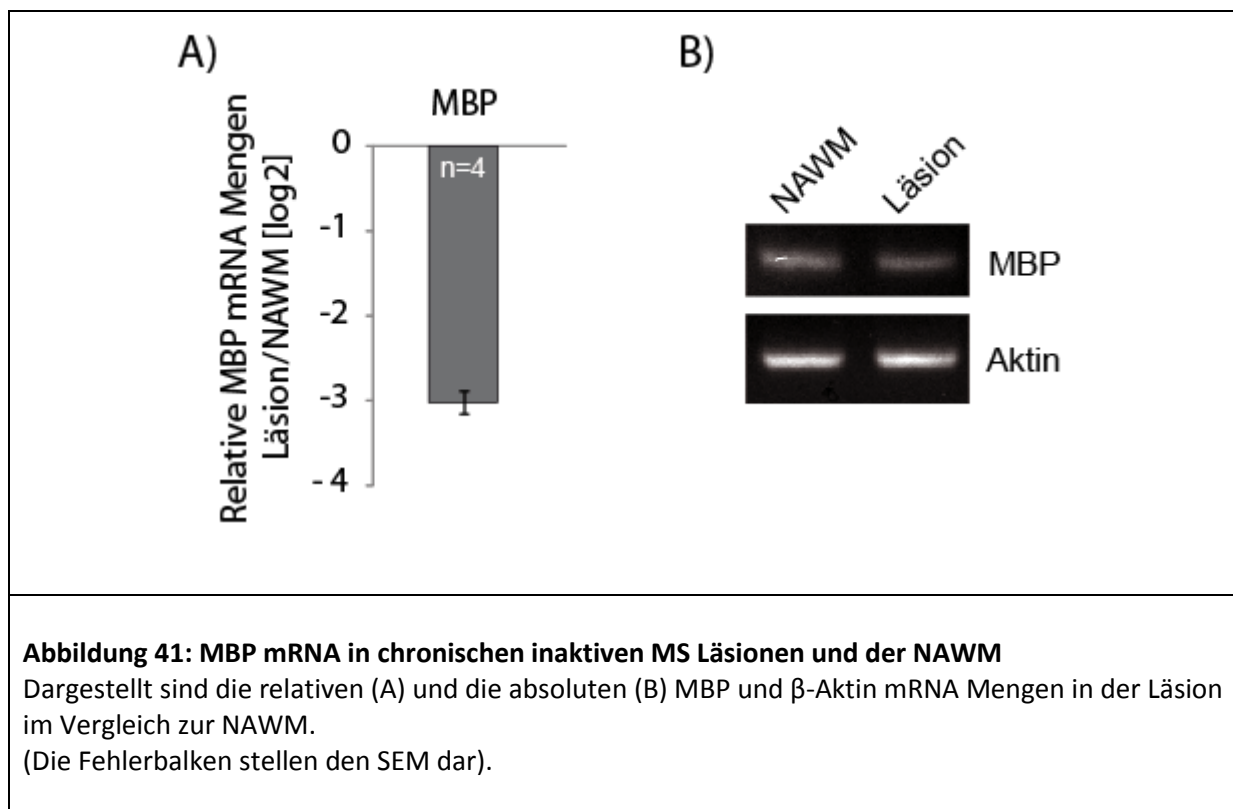


**Abbildung 40: Expression von Olig2 und MBP in chronischen inaktiven MS Läsionen und der NAWM**

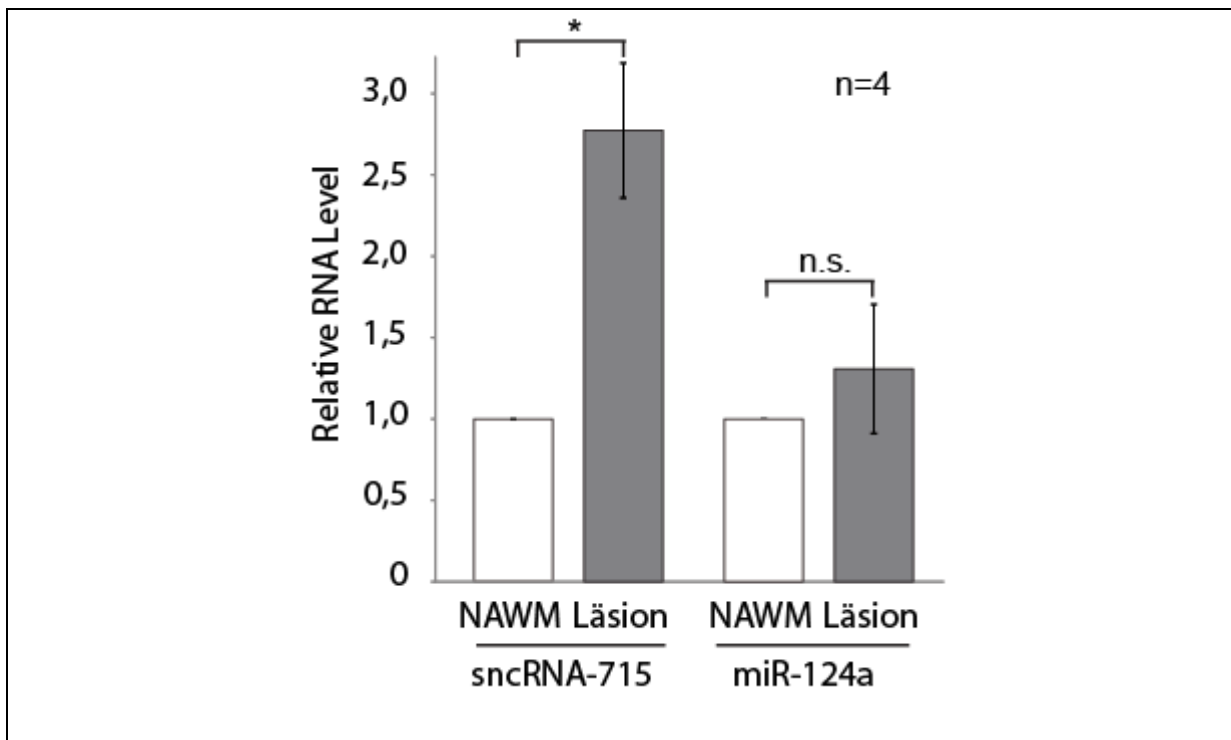
Dargestellt sind humane Hirnschnitte gefärbt gegen die Oligodendrozyten-spezifischen Proteine MBP und Olig2.

Anhand der Färbungen wurde herausgefunden, dass in den Läsionen Oligodendrozyten vorhanden sind, aber diese kein MBP Protein bilden können. In diesen Zellen könnte zum einen die Transkription des MBP Gens, oder zum anderen die Translation der mRNA verhindert sein. Deshalb wurden von M. Witte jeweils die Läsion und die NAWM der PLP und MHC II gefärbte Hirnschnitte definiert, die Bereiche mit einem Skalpell herausgelöst und die

RNA extrahiert. Von mir wurden mit Hilfe der reversen Transkription und der Realtime PCR die Mengen an MBP und  $\beta$ -Aktin mRNA bestimmt. Die relative Quantifizierung der MBP mRNA Mengen erfolgte nach der  $\Delta\Delta$ Ct-Methode auf das Referenzgen  $\beta$ -Aktin. Die Relative MBP mRNA Menge ist in den Läsionen gegenüber der NAWM um den Faktor 8 ( $\log_2 = -3,02 \pm 0,15$  (Mittelwert, SEM,  $n=3$ )) reduziert (Abbildung 41A). Wie in Abbildung 40 ist die Anzahl an Oligodendrozyten ( $\text{Olig}_2^+$ -Zellen) in den Läsionen reduziert, wodurch die verminderte Menge an MBP mRNA zu erklären ist. Zusätzlich wurden die Proben nach der Realtime PCR auf ein Agarosegel aufgetragen (Abbildung 41B). Die MBP Bande ist in der Läsion im Vergleich zur NAWM schwächer. Obwohl in den Läsionen sehr wenig MBP Protein vorhanden ist, kann eine relativ hohe Menge an MBP mRNA detektiert werden.



Anhand dieser Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass Oligodendrozyten in den Läsionen zwar kein MBP Protein mehr bilden können, die mRNA aber noch vorhanden ist. Dort könnte die Expression der sncRNA-715 erhöht sein und die Translation von MBP mRNA verhindern. Um diese Hypothese zu prüfen, wurde die Menge an sncRNA-715, snoRNA-135 und miR-124a in den Läsionen und der NAWM über reverse Transkription und Realtime PCR überprüft. Quantifiziert wurde mit der  $\Delta\Delta$ Ct-Methode auf das Referenzgen snoRNA-135. Im Vergleich zur NAWM ist die Menge an sncRNA-715 in der Läsion signifikant erhöht, während die relativen miR-124a Mengen gleich bleiben (Abbildung 42). Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass sncRNA-715 in chronischen inaktiven Läsionen hochreguliert ist und dass diese kleine RNA die Translation der mRNA verhindern könnte.



**Abbildung 42: sncRNA-715 in chronischen inaktiven MS Läsionen und der NAWM**

Dargestellt sind die relativen sncRNA-715 und miR-124a Mengen in der Läsion im Vergleich zur NAWM.

(t-test: ns (=nicht signifikant), \*= $p < 0,05$ ; Die Fehlerbalken stellen den SEM dar).

### 4.3 Rolle der sncRNA-715 in peripheren Nervensystem

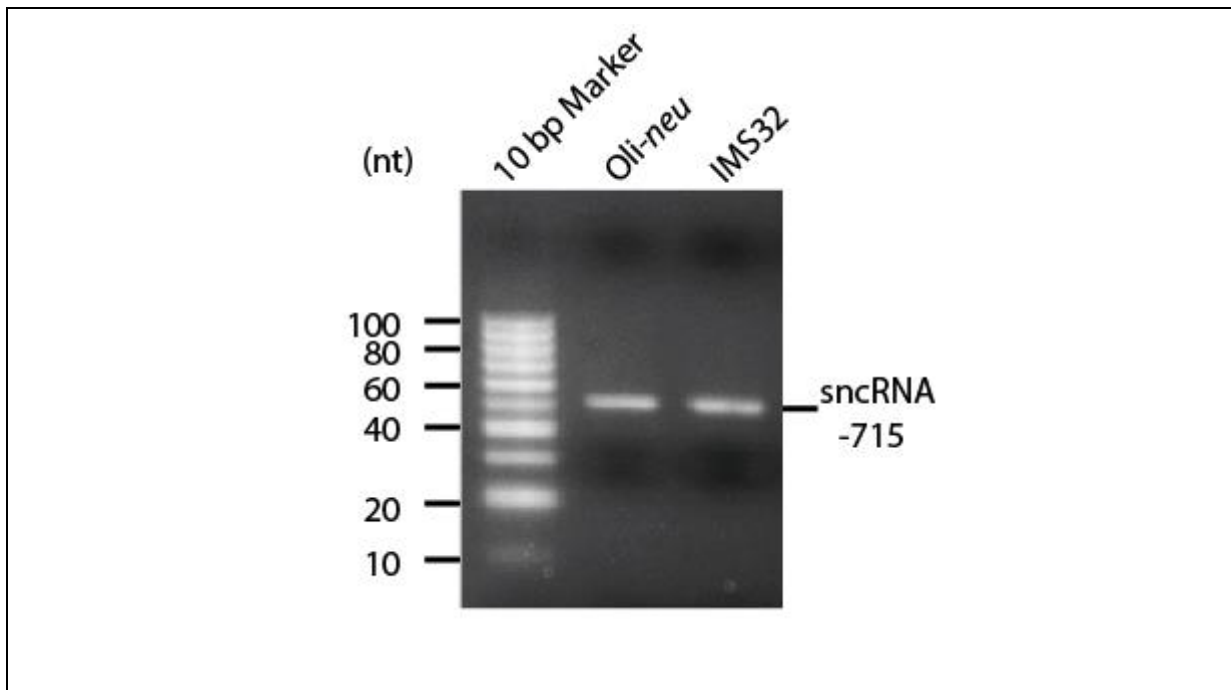
Bisher konnte gezeigt werden, dass sncRNA-715 in Oligodendrozyten exprimiert wird und die Translation der MBP mRNA reguliert. In Schwann-Zellen ist MBP auch an dem Aufbau der Myelinmembran beteiligt. Wie im ZNS wird die mRNA im Zuge der Myelinisierung zu den Fortsätzen transportiert, lokal translatiert und in die Myelinmembran eingebaut (Trapp et al., 1987). Im Gegensatz zum ZNS ist im PNS nur wenig über den Transportmechanismus der mRNA bekannt (Masaki, 2012). Wahrscheinlich erfolgt die Lokalisation der mRNA entlang der Mikrotubuli in den Cajal Bändern (Court et al., 2004). Der molekularen Mechanismen der translationalen Hemmung während des zytoplasmatischen Transports ist ebenso nicht bekannt. In diesem Projekt sollte untersucht werden, ob die MBP mRNA in Schwann-Zellen in A2-Granulen transportiert wird. Weiterhin sollten die Expression und die Rolle von sncRNA-715 in Schwann-Zellen überprüft werden.

#### 4.3.1 Expression von sncRNA-715, MBP mRNA und hnRNP A2 in Schwann-Zellen

Zunächst sollte untersucht werden, ob die Schwann-Zelllinie IMS32 die kleine regulatorische RNA sncRNA-715 exprimiert. Dazu wurde RNA aus IMS32 Zellen extrahiert und die Expression über quantitative Real-Time PCR mit sncRNA-715 spezifischen Primern durchgeführt. Zusätzlich wurden Oli-*neu* Zellen als Kontrolle analysiert. Die qPCR Proben wurden auf ein Ethidiumbromid Agarosegel aufgetragen. Wie bereits erwartet und in



Abbildung 22B zeigt, kann in Oli-*neu* Zellen in diesem Versuch auch nur eine einzige Bande im Gel visualisiert werden. Die Größe der Bande (~60 nt) geht auf die Verwendung von Haarnadelschleifen-Primern in der reversen Transkription zurück (siehe Abb. 17). Diese Bande ist auch in den IMS32 Zellen zu finden. Damit kann sncRNA-715 auch in der Schwann-Zelllinie nachgewiesen werden (Abbildung 43).



**Abbildung 43: SncRNA-715 Expression in der Schwann-Zelllinie IMS32**

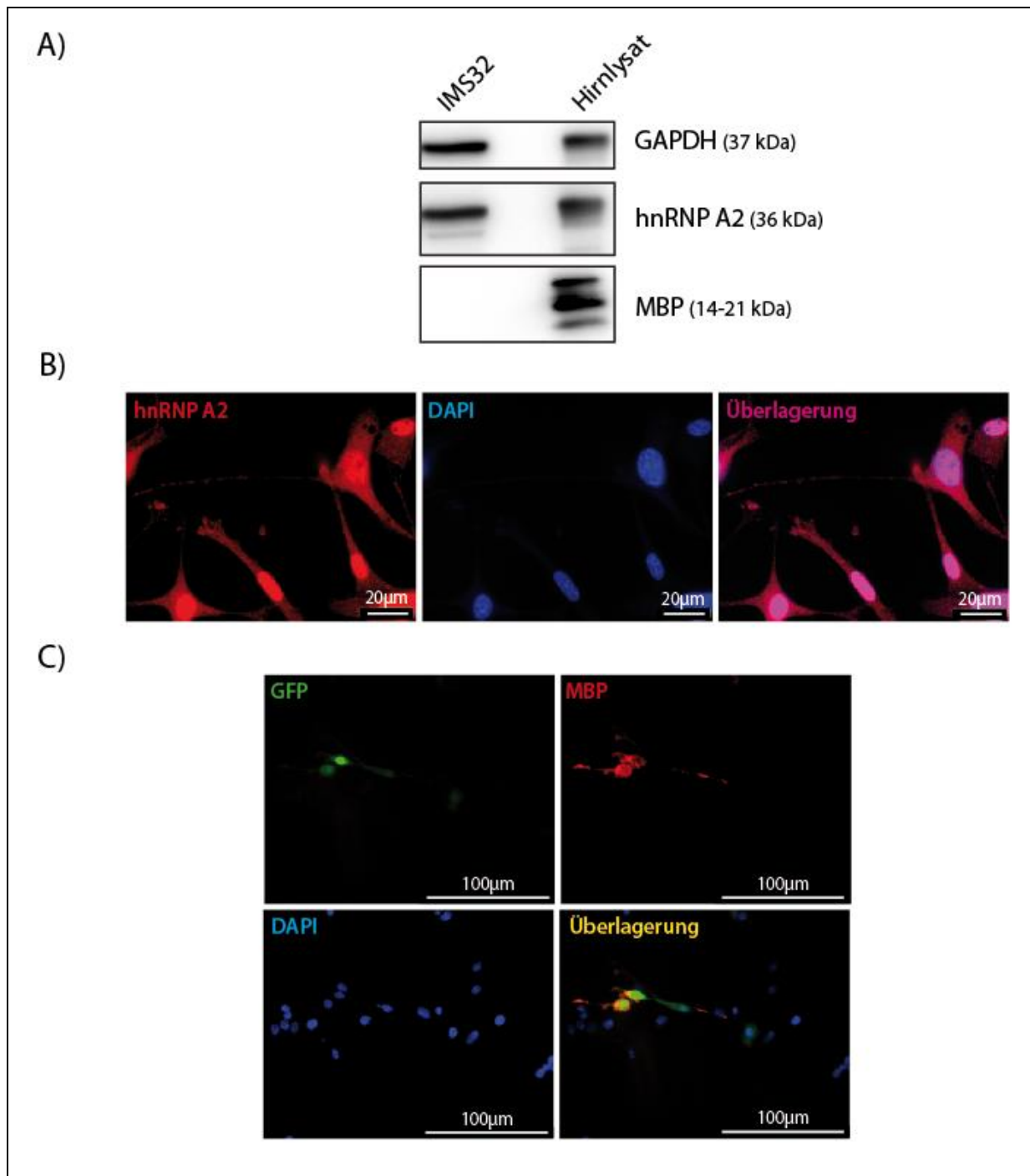
SncRNA-715 spezifische reverse Transkription und qPCR mit anschließender Gelelektrophorese zeigen in Oli-*neu* und IMS32 eine einzige spezifische Bande.

Im folgenden Versuch, sollte überprüft werden, ob die IMS32 Zelllinie das MBP Protein und das hnRNP A2 Protein exprimieren. Bislang wurde in der Literatur die Expression von hnRNP A2 in Schwann Zellen noch nicht beschrieben

In Abbildung 44A ist ein Western Blot dargestellt, der die Proteine hnRNP A2 und GAPDH (Ladekontrolle) in IMS32 Zellen nachweist. Zusätzlich wurde eine Hirnlysat einer adulten Maus aufgetragen. Dies diente als Positivkontrolle für MBP und hnRNP A2. Nur für GAPDH und hnRNP A2 konnte eine Bande visualisiert werden. Die Expression von hnRNP A2 konnte auch in immunzytochemischen Färbungen bestätigt werden (Abbildung 44B). Wie in Oligodendrozyten (Abbildung 37) ist die Expression von hnRNP A2 im Zellkern am stärksten. Im Zytoplasma ist hnRNP A2 diffus verteilt.

Da das MBP Protein weder im Western Blot (Abbildung 44A) noch in der Färbung nachgewiesen werden konnte (nicht dargestellt), wurden als Positivkontrolle IMS32 Zellen mit dem MBP Plasmid (MBP14-IRE-GFP) transfiziert und nach 48 Stunden gegen MBP gefärbt. Die Transfektion mit diesem Plasmid erlaubt, zwischen transfizierten Zellen (GFP<sup>+</sup>) und untransfizierten Zellen (GFP<sup>-</sup>) zu unterscheiden (siehe Abschnitt 2.4). Nur die GFP<sup>+</sup>-

Zellen exprimieren das MBP Protein. Endogen kann MBP in der IMS32 Zelllinie nicht nachweislich gebildet werden (Abbildung 44C).



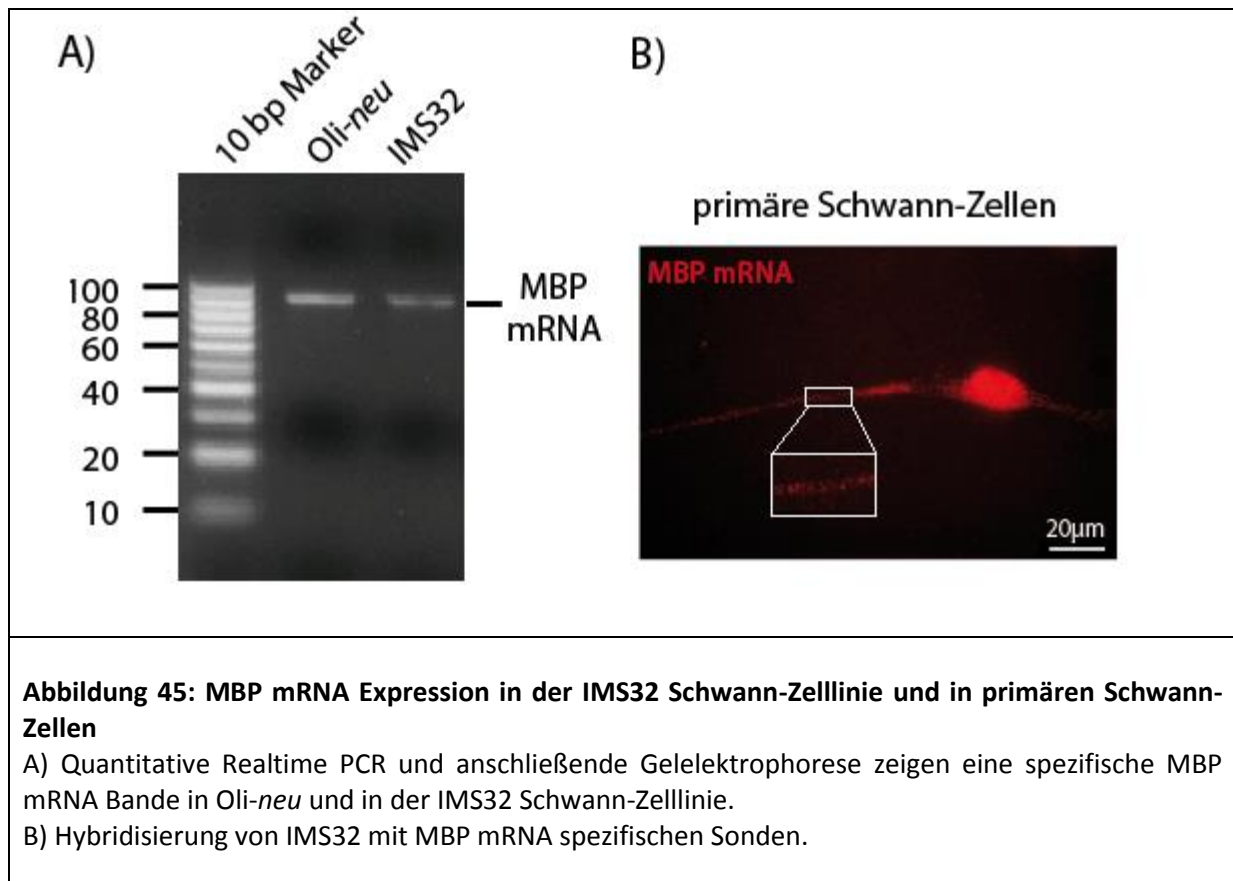
**Abbildung 44: MBP und hnRNP A2 Protein Expression in der Schwann-Zelllinie IMS32**

A) Western Blot zur Analyse der MBP und hnRNP A2 Expression in IMS32 Zellen. GAPDH wurde als Ladekontrolle verwendet.

B) Endogene hnRNP A2 Färbung in IMS32. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt.

C) MBP Färbung MBP14-IHRES-GFP transfizierten IMS32 Zellen. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt.

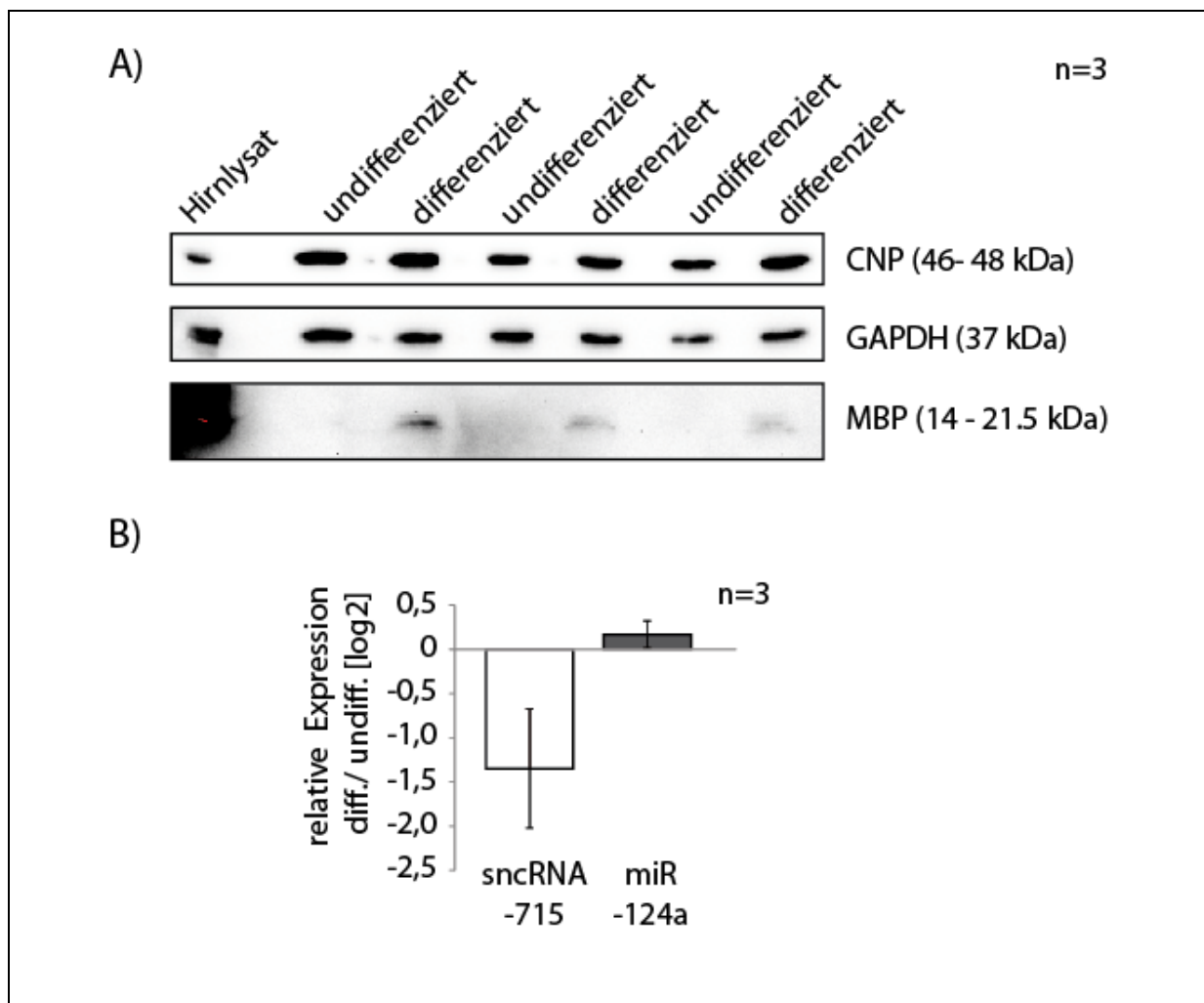
Im nächsten Schritt wurde die MBP mRNA in der IMS32 Schwann-Zelllinie über qPCR mit MBP spezifischen Primern nachgewiesen. Die PCR Proben wurden ebenfalls auf ein Agarosegel aufgetragen und mit der MBP mRNA in Oli-*neu* Zellen verglichen. Es wurde eine Amplikonlänge von 88 Nukleotiden (nt) erwartet (Tabelle 7). Wie in Abbildungen 45A dargestellt, kann eine spezifische Bande bei ~90 nt detektiert werden. Diese Ergebnisse wurden mit Hilfe der FISH Methode mit MBP mRNA spezifischen Sonden in primären Schwann-Zellen verifiziert. Die MBP mRNA ist sowohl um den Zellkern, als auch in den Fortsätzen (siehe vergrößerter Bereich) lokalisiert (Abbildung 45B).



#### 4.3.2 SncRNA-715 Expression und MBP Protein Synthese in Schwann-Zellen

Wenn sncRNA-715 die Translation der MBP mRNA auch in Schwann-Zellen inhibiert, müssten die Expressionen des MBP Proteins und der sncRNA-715 invers korrelieren. Deshalb wurde die Synthese von MBP Protein und sncRNA-715 in differenzierten bzw. undifferenzierten primären Schwann-Zellen (Abschnitt 3.5.4) überprüft. Im Western Blot steigt die Menge an CNP Protein in den differenzierten Schwann-Zellen gegenüber den undifferenzierten Zellen (Abbildung 46A). GAPDH diente als Ladekontrolle. In den undifferenzierten Zellen kann kein MBP Protein detektiert werden, wohingegen in den differenzierten Zellen eine schwache MBP Proteinbande zu sehen ist. Die Differenzierung der Zellen induziert im Versuch die Synthese des MBP Proteins. Zusätzlich wurde die RNA aus den Proben isoliert und untersucht, ob die Expression der sncRNA-715 sich mit der Differenzierung der primären Schwann-Zellen ändert. Dazu wurde die cDNA aus differenzierten bzw. undifferenzierten

primären Schwann-Zellen hergestellt und eine quantitative Real-Time PCR durchgeführt. Unter Verwendung der  $\Delta\Delta C_t$ -Methode wurde die relative Menge an sncRNA-715 und miR-124a in differenzierten Zellen bestimmt und auf undifferenzierte Zellen bezogen. Normalisiert wurde auf snoRNA-135. Die relativen Expressionen von sncRNA-715 ( $\log_2 = -1,35 \pm 0,67$  (Mittelwert, SEM,  $n=3$ )) und miR-124a ( $\log_2 = 0,17 \pm 0,15$  (Mittelwert, SEM,  $n=3$ )) sind in Abbildung 46B gezeigt. Es kann festgestellt werden, dass während der Differenzierung der primären Schwann-Zellen *in vitro* miR-124a nicht reguliert wird. SncRNA-715 zeigt hingegen eine leichte Tendenz um den Faktor 2,5 ( $\log_2 = -1,35$ ) herunter reguliert zu werden. Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass *in vitro* die Synthese des MBP Proteins und der sncRNA-715 invers korreliert.



**Abbildung 46: SncRNA-715 und MBP Protein Expression während der Differenzierung der Schwann-Zellen *in vitro***

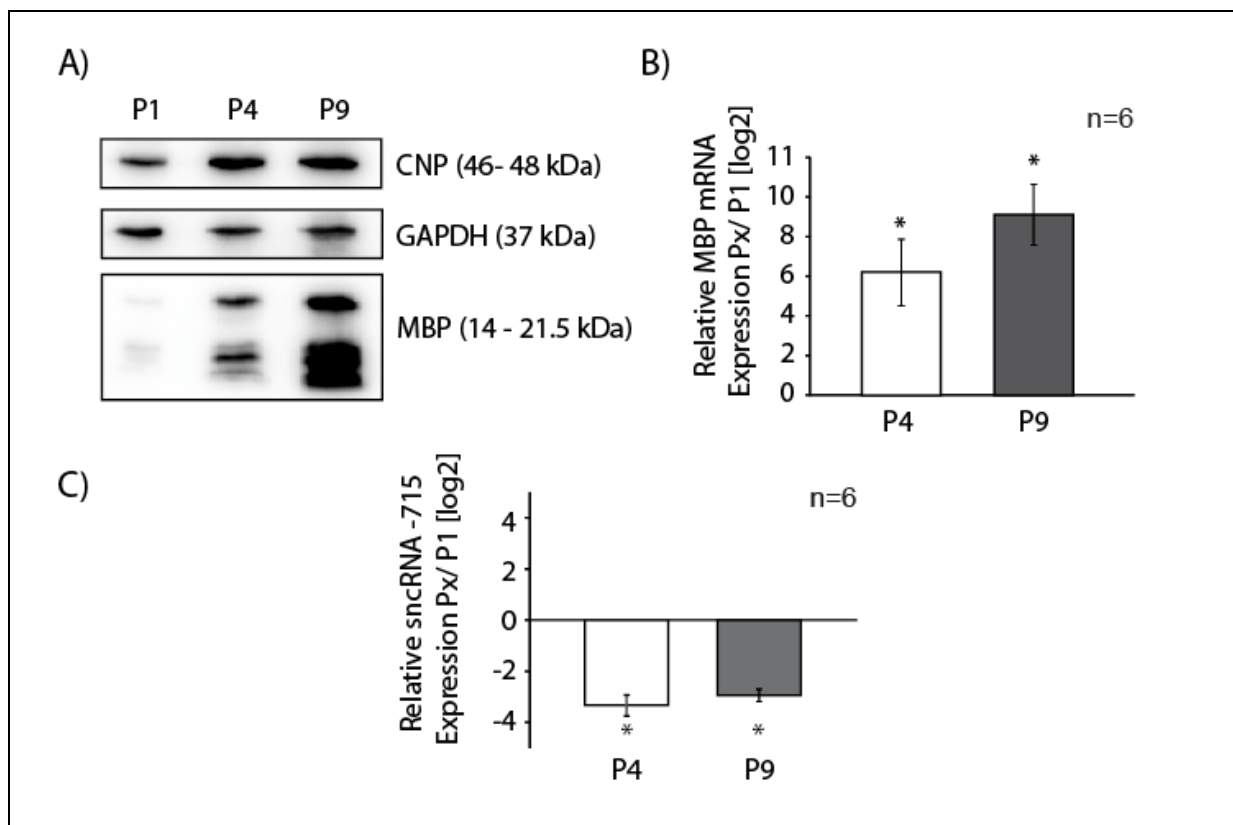
Die Expression von MBP Protein und sncRNA-715 wurden in undifferenzierten (100  $\mu$ M dbcAMP) und differenzierten (2 mM dbcAMP) Schwann-Zellen untersucht.

A) Western Blot zur Analyse der MBP und CNP Protein-Expression in differenzierten und undifferenzierten Schwann-Zellen. GAPDH Mengen dienen als Ladekontrolle.

B) Quantitative Real-Time PCR zur Analyse der relativen der sncRNA-715 und miR-124a Expression. Normalisiert wurde auf snoRNA-135.

(Die Fehlerbalken stellen den SEM dar)

Die *in vitro* erzielten Ergebnisse wurden *in vivo* analysiert und die Expression von sncRNA-715 und MBP Protein im Ischiasnerv untersucht. Die RNA und die Proteine aus dem Ischiasnerv von 1, 4 und 9 Tage alten (P1, P4 und P9) Mäusen wurden isoliert. Die relative Expression von sncRNA-715 und MBP mRNA wurde über die quantitative Real-Time PCR und die MBP Protein Mengen über Western Blot analysiert. In Abbildung 47A ist das Ergebnis des Western Blots dargestellt. Wie in der Literatur bereits beschrieben (Garbay et al., 2000), steigt während der Differenzierung des Ischiasnervs die Expression der Myelinproteine MBP und CNP. Dementsprechend wird die relative Menge an MBP mRNA signifikant hochreguliert (Abbildung 47B). Die relative Expression der sncRNA-715 wurde in den in Abbildung 47C genannten Zeitpunkten in derselben Probe mit Hilfe der  $\Delta\Delta C_t$ -Methode analysiert. Dabei wird die sncRNA-715 an Tag 4 ( $\log_2 = -3,34 \pm 0,41$  (Mittelwert, SEM,  $n=6$ )) und an Tag 9 ( $\log_2 = -2,95 \pm 0,25$  (Mittelwert, SEM,  $n=6$ )) signifikant herunter reguliert. Die Synthese von MBP Protein korreliert auch *ex vivo* invers mit der Expression der sncRNA-715.



**Abbildung 47: SncRNA-715 und MBP Protein Expression während der Differenzierung der Schwann-Zellen *in vivo***

Die Expression von MBP Protein und sncRNA-715 wurden im Ischiasnerv von 1, 4 und 9 Tage alten Mäusen (P1, P4, P9) untersucht.

A) Western Blot zur Analyse der MBP und CNP Protein-Expression. GAPDH Mengen dienen als Ladekontrolle.

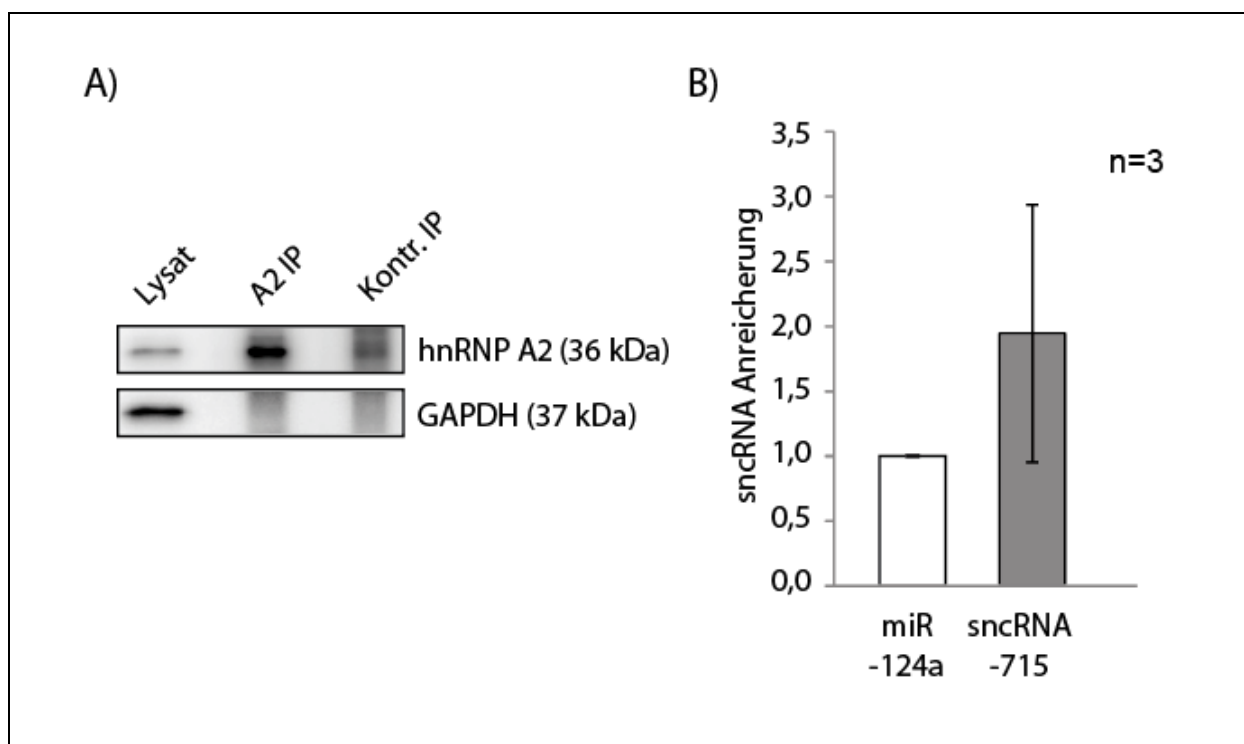
B) Quantitative Real-Time PCR zur Analyse der relativen Mengen an MBP mRNA. Normalisiert wurde auf  $\beta$ -Aktin.

C) Quantitative Real-Time PCR zur Analyse der relativen Mengen an sncRNA. Normalisiert wurde auf snoRNA-135.

(t-test:  $*=p<0,05$ ; die Fehlerbalken stellen den SEM dar)

### 4.3.3 Assoziation von hnRNP A2 und sncRNA-715 in Schwann-Zellen

In der hnRNP A2 Immunpräzipitation sollte überprüft werden, ob sncRNA-715 mit hnRNP A2 in primären Schwann-Zellen assoziiert (Abschnitt 3.13.2). Im Western Blot kann hnRNP A2 gegenüber dem Lysat in der IP stark angereichert werden, wobei in der Kontroll-IP nur wenig hnRNP A2 detektiert werden kann (Abbildung 48A). Die Abwesenheit von GAPDH in der A2 IP bestätigt, dass hnRNP A2 spezifisch aufgereinigt werden konnte. Im nächsten Schritt wurde überprüft, ob sncRNA-715 ebenfalls in der A2 IP angereichert ist. Dazu wurde der Anreicherungsfaktor von sncRNA-715 und miR-124a in der A2-IP, in der Kontroll-IP und im Lysat bestimmt (Abbildung 48B). Der Anreicherungsfaktor von miR-124a wurde auf 1 gesetzt. Im Vergleich zur Kontroll-miRNA ist sncRNA-715 um den Faktor 2 angereichert. Zusammenfassend scheint sncRNA-715 mit hnRNP A2 zu assoziieren.



**Abbildung 48: Nachweis von sncRNA-715 in der hnRNP A2 IP primärer Schwann-Zellen**

A) Im Western Blot wurde die spezifische Anreicherung von hnRNP A2 in der A2 IP überprüft. Die Abwesenheit von GAPDH in der A2 IP symbolisiert die Spezifität der IP.

B) Realtime PCR und Bestimmung des Anreicherungsfaktors der sncRNA-715 im Vergleich zur miRNA-124a. Die Anreicherung der sncRNA-715 und der Referenz miRNA (miR-124a) wurde über die quantitative Real-Time PCR und den Anreicherungsfaktor bestimmt. Die Referenz miRNA wurde auf 1 gesetzt.

Da hnRNP A2 im Zytoplasma von Schwann Zellen zu finden ist (Abbildung 44B) und mit sncRNA-715 scheinbar assoziiert, könnte dieses RNA-bindende Protein den Transport der MBP mRNA in diesen Zellen vermitteln.

## 5 Diskussion

### 5.1 SncRNA-715

Zu Beginn der Arbeit wurde die 21-Nukleotid Sequenz der miR-715 in der Datenbank *miRBase* als miRNA erfasst. Allerdings hatte sich anhand von Tiefensequenzierungen, auch *Deep Sequencing* genannt, herausgestellt, dass diese miRNA nicht mit dem Prozessierungsmuster anderer miRNAs übereinstimmt und miR-715 somit keine „echte“ miRNA sein kann. Insgesamt wurden 564 miRNA Gene, die in der Datenbank hinterlegt wurden, untersucht. 157 dieser Gene scheinen keine „echte“ miRNA hervorzubringen (Chiang et al., 2010). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die 21 Nukleotid-lange Sequenz der ursprünglichen miR-715 in Oligodendrozyten exprimiert wird (Abbildung 22) und wurde folglich als kleine nicht kodierende RNA 715 (*small non-coding RNA*, sncRNA-715) bezeichnet. Doch was ist diese sncRNA? Ungeachtet der Tatsache, dass es sich wahrscheinlich um keine „echte“ miRNA handelt, wird diese kleine RNA in der Literatur weiterhin meist als miR-715 aufgeführt.

#### 5.1.1 Expression von sncRNA-715

Die Expression der miR-715 wurde bereits in einer prämyoblastischen Vorläufer-Zelllinie (C2C12)(Panguluri et al., 2010), in Schwann-Zellen (Viader et al., 2011), in Sertoli-Zellen (Papapioannou et al., 2011) und in Blut (Shah et al., 2012) beschrieben. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass miR-715 in Gonaden entwicklungsabhängig und geschlechtsspezifisch exprimiert wird (Takata et al., 2011).

Mit Hilfe der Software GeneTrail (<http://genetrail.bioinf.uni-sb.de/>) wurden potentielle Zielgene von miR-715 identifiziert (Shah et al., 2012). Genannt wurden die AcetylCoA-Carboxylase (ACACB), der Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptor  $\alpha$  (PPARA), der Retinoid X Rezeptor  $\gamma$  (RXRG) und der Tumornekrosefaktor-Rezeptor 1a (TNFRSF1a). Gibt man diese potentiellen Zielgene in die Datenbank *MicroCosm Targets Version 5* ein, kann für jede 3'UTR der mRNA eine miR-715 Bindestelle vorhergesagt werden. Interessanterweise haben die Proteine ACACB und RXRG auch eine wichtige Aufgabe in Oligodendrozyten, die in Abschnitt 5.2.4 näher beschrieben wird. Die Expression der sncRNA-715 in Oligodendrozyten, Mikroglia, Neuronen und Astrozyten konnte in dieser Arbeit erstmals gezeigt werden. Die Funktion der sncRNA-715 in diesen Zellen ist jedoch bislang unbekannt. Viele miRNAs sind nicht auf einen Zelltyp spezialisiert, sondern regulieren in unterschiedlichen Zellen verschiedene Zielgene und haben damit unterschiedliche zellspezifische Funktionen. Lau und Kollegen konnten 98 miRNAs identifizieren, die in Oligodendrozyten exprimiert werden, wobei 43 dieser miRNAs während der Oligodendrozyten-Differenzierung reguliert werden. Insgesamt konnten 58 der 98 miRNAs auch in kortikalen Neuronen gefunden werden (Lau et al., 2008). Zum Beispiel konnte miR-124a sowohl in Neuronen als auch in Oligodendrozyten nachgewiesen werden.

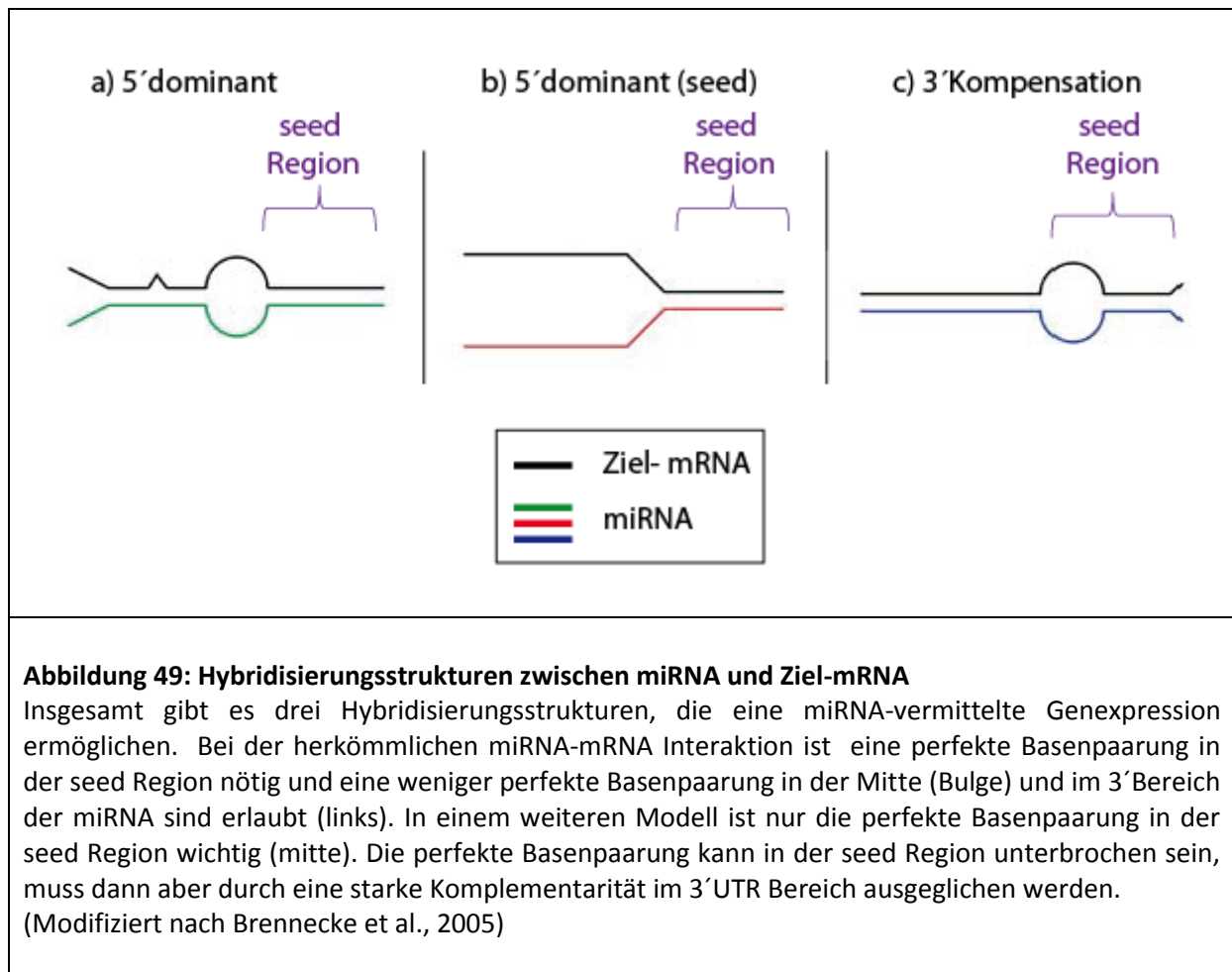
### 5.1.2 SncRNA-715 hat eine konservierte Bindestelle in der MBP 3'UTR

Mit Hilfe der *in silico* Analyse nach MicroCosm Targets konnte für die MBP 3'UTR in der Maus (*Mus musculus*), der Ratte (*Rattus norvegicus*) und dem Menschen (*Homo sapiens*) eine Bindestelle für sncRNA-715 vorhergesagt werden. Diese Bindestelle ist auch im Schnabeltier (*Ornithorhynchus anatinus*) und der Spitzmausbeutelratte (*Monodelphis domestica*) konserviert. Die miRNA Zielgene, die bisher in der Literatur beschrieben und experimentell validiert werden konnten, sind meist in unterschiedlichen Spezies konserviert (Burgler & Macdonald, 2005).

Invertebraten haben kein MBP homologes Gen. Um eine adäquate Reizweiterleitung zu gewährleisten, ummanteln in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* periphere Gliazellen einzelne Axone oder kleinere Axon-Bündel (Kettenmann & Ransom, 2012; Freeman & Doherty, 2005). Cephalopoden hingegen bilden ein sogenanntes Riesenaxon. In einige Invertebraten, wie z.B. dem Ruderfußkrebse (*Copepoda*), können Myelin-ähnliche Strukturen gefunden werden (Hartline & Colman., 2007). Die Expression der sncRNA-715 ist in Invertebraten bisher auch noch nicht beschrieben worden. Vergleicht man mit Hilfe des BLAST-Algorithmus die Nukleotidsequenz der sncRNA-715 mit der Nukleotidsequenzdatenbank der Fruchtfliege (*Drosophila melanogaster*) oder dem Fadenwurm (*Caenorhabditis elegans*), so kann keine Übereinstimmung gefunden werden. Da sncRNA-715 in *Drosophila melanogaster* und in *Caenorhabditis elegans* wahrscheinlich nicht exprimiert wird und keine MBP homologen Gene in Invertebraten existieren, ist anzunehmen, dass sich sncRNA-715 und MBP parallel im Laufe der Evolution entwickelt haben.

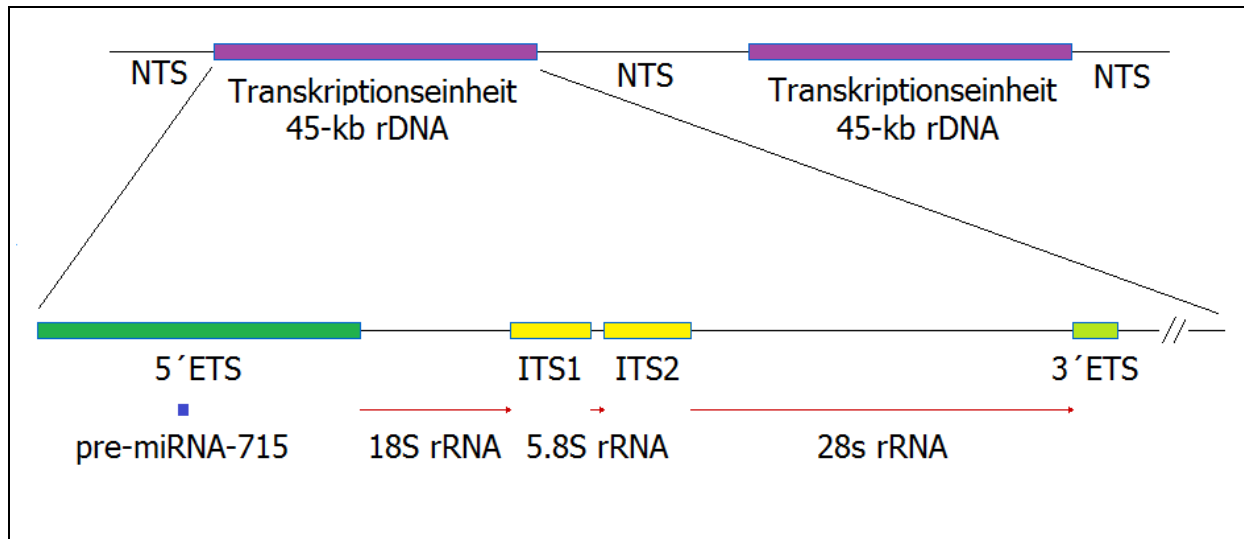
Es ist nicht nur wichtig, dass die miRNA die Ziel-mRNA erkennen kann, sondern die Art der Hybridisierung spielt eine entscheidende Rolle. Vella und Kollegen konnten zeigen, dass let-7 trotz einer nicht perfekten seed-Ausbildung die Ziel mRNA lin-41 regulieren kann (Vella et al., 2004). Insgesamt gibt es drei verschiedene Hybridisierungsstrukturen, die die miRNA-vermittelte Genregulation ermöglichen (Abbildung 49). Eine schwächere Bindung in der miRNA der seed Region kann durch eine starke Komplementarität im 3'-Bereich ausgeglichen werden (Brennecke et al., 2005). Mit der *RNAhybrid Software* (<http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/rnahybrid/>) konnten die Hybridisierungsstrukturen zwischen miRNA-715 und MBP mRNA vorhergesagt werden (Abbildung 20). In der Ratte und der Maus ist die Basenpaarung in der seed Region perfekt ausgebildet. In der humanen Hybridisierungsstruktur ist die seed Region an einer Position unterbrochen, was aber durch eine Komplementarität im 3'-Bereich kompensiert werden kann.





### 5.1.3 Wie wird sncRNA-715 prozessiert und reguliert?

Das Vorläufermolekül der sncRNA-715 ist 110 Nukleotide lang und in der 45-kb ribosomalen DNA (rDNA) lokalisiert (Wei et al., 2013). Die 45-kb rDNA ist ein Abschnitt auf der DNA, der für die Gene der ribosomalen RNAs (rRNA) 18S, 5.8S und 28S kodiert. Das Transkript des 18S- 5.8S-, 28S-rDNA-Clusters besteht aus einem 3'ETS (*external transcribed spacer*), einem 5'ETS, zwei ITS (*internal transcribed spacer*) und den Genen für die 18S, 5.8S und 28S rRNA (Abbildung 50). Die Gene werden gemeinsam von der RNA-Polymerase I transkribiert. Die Transkriptionseinheiten sind tandemartig auf der DNA angeordnet und auf mehreren Chromosomen lokalisiert (*Mus musculus*: Chromosom 4, 8, 10, 11, 12, 15, 16, 17)(Cazaux et al., 2011). Durch die *non-transcribed spacer* (NTS) werden die Transkriptionseinheiten voneinander getrennt. In den NTS sind viele Promotoren angeordnet, die die Bindung der Polymerasen verstärken und damit eine effiziente Transkription ermöglichen. Ribosomale RNAs machen etwa 80% der zellulären RNA aus. Als katalytische Komponenten der Ribosomen sind sie an der Translation von mRNAs beteiligt und müssen der Zelle in ausreichender Menge zur Verfügung gestellt werden.

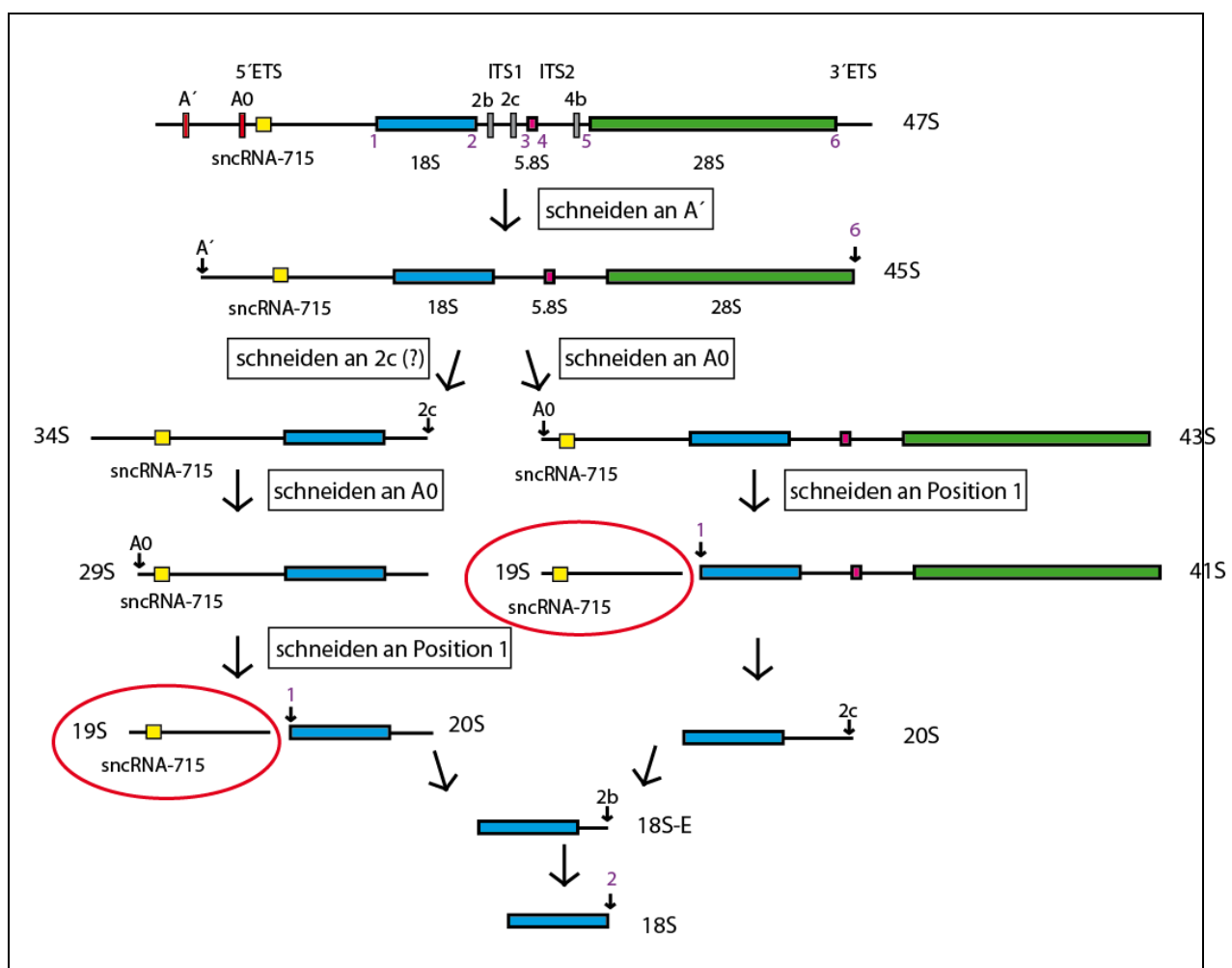


**Abbildung 50: Lokalisation der sncRNA-715 in der 45-kb rDNA**

Dargestellt ist die 45-kb Transkriptionseinheit, die tandemartig auf der DNA angeordnet ist. Jede Transkriptionseinheit ist durch einen NTS (*non transcribed spacer*) voneinander getrennt und besteht aus einem 5' und 3'ETS (*external transcribed spacer*), den Genen für die 18S, 5.8S und 28S rRNA und zwei ITS (*internal transcribed spacer*). Der Vorläufer der miRNA-715 (*pre-miRNA-715*) ist in der 5'ETS lokalisiert.

Lange Zeit ist man davon ausgegangen, dass die rDNA außer den Genen für die ribosomalen RNAs keine Informationen enthält. Neuste Sequenzierungsanalysen zeigten jedoch, dass viele kleine nicht kodierende RNAs in der rDNA lokalisiert sind (Wei et al., 2013). Diese RNAs werden als srRNAs (*small rDNA-derived RNAs*) bezeichnet, assoziieren mit Proteinen der Argonaut (AGO) Familie und sind in vielen biologischen Prozessen involviert (Wei et al., 2013). Da der Vorläufer der sncRNA-715 (*pre-miRNA-715*) in der rDNA lokalisiert ist, ist diese kleine RNA ebenfalls eine srRNA. Es konnte gezeigt werden, dass srRNAs, die mit AGOs interagieren, 20-22 Nukleotide lang sind und damit eine ähnliche Größe aufweisen wie miRNAs (Wei et al., 2013). Neben sncRNA-715 konnten noch weitere 9 miRNAs identifiziert werden, die auf der rDNA lokalisiert sind. Die Prozessierung von srRNAs aus rDNA konnte bislang nicht gezeigt werden. Bisher ist man davon ausgegangen, dass miRNAs hauptsächlich von miRNA Genen oder Introns durch die RNA Polymerase II transkribiert werden. Die Prozessierung der Vorläufer-miRNA zur reifen miRNA erfolgt durch die Enzyme Drosha und Dicer. Zudem können sie aber auch durch AGO2, und damit unabhängig von Dicer prozessiert werden. Weiterhin können miRNAs Drosha-unabhängig aus Mirtrons, snoRNAs, shRNAs und tRNA-Vorläufermolekülen entstehen, die dann weiter durch Dicer in die reife miRNA prozessiert werden (Miyoshi et al., 2010). Die neusten Forschungsergebnisse von Wei und Kollegen weisen aber darauf hin, dass es rDNA kodierte srRNAs gibt. Diese srRNAs werden durch einen noch nicht bekannten Signalweg prozessiert, der nicht mit dem Prozessierungsmuster anderer miRNAs übereinstimmt (Wei et al., 2013). Daher ist nicht auszuschließen, dass es sich bei sncRNA-715 vielleicht doch um eine miRNA handelt. Doch wie wird sncRNA-715 prozessiert? SncRNA-715 könnte gemeinsam mit der 45-kb rDNA-

Transkriptionseinheit durch die RNA-Polymerase I transkribiert werden. Die Prozessierung der entstandenen 47S prä-rRNA zur reifen 18S rRNA kann auf zwei Wegen durch verschiedene Endo- und Exonukleasen erfolgen (Kent et al., 2009)(Abbildung 51). Als Nebenprodukt entsteht jeweils die 19S rRNA, welche die Sequenz der sncRNA-715 enthält. Kent und Kollegen entdeckten eine neue Schnittstelle A0, welche 127 Nukleotide stromaufwärts der Sequenz von der sncRNA-715 entfernt liegt. Es konnte gezeigt werden, dass ExoSc10 als Komponente des Exosomen Komplex an Position A0 schneidet und an der Prozessierung der rRNA und damit der sncRNA-715 beteiligt sein könnte. ExoSc10 ist eine 3'-5' Exoribonuklease, welche im Zellkern an der Reifung von rRNAs, snRNAs und snoRNAs und im Zytoplasma am Abbau von fehlerhaften mRNAs beteiligt ist. ExoSc10 ist auch bekannt unter dem Namen PM-Sc100 (Kent et al., 2009). Wie schließlich die reife sncRNA-715 aus der 2335 Nukleotid-langen 19S rRNA entsteht, muss noch geklärt werden.

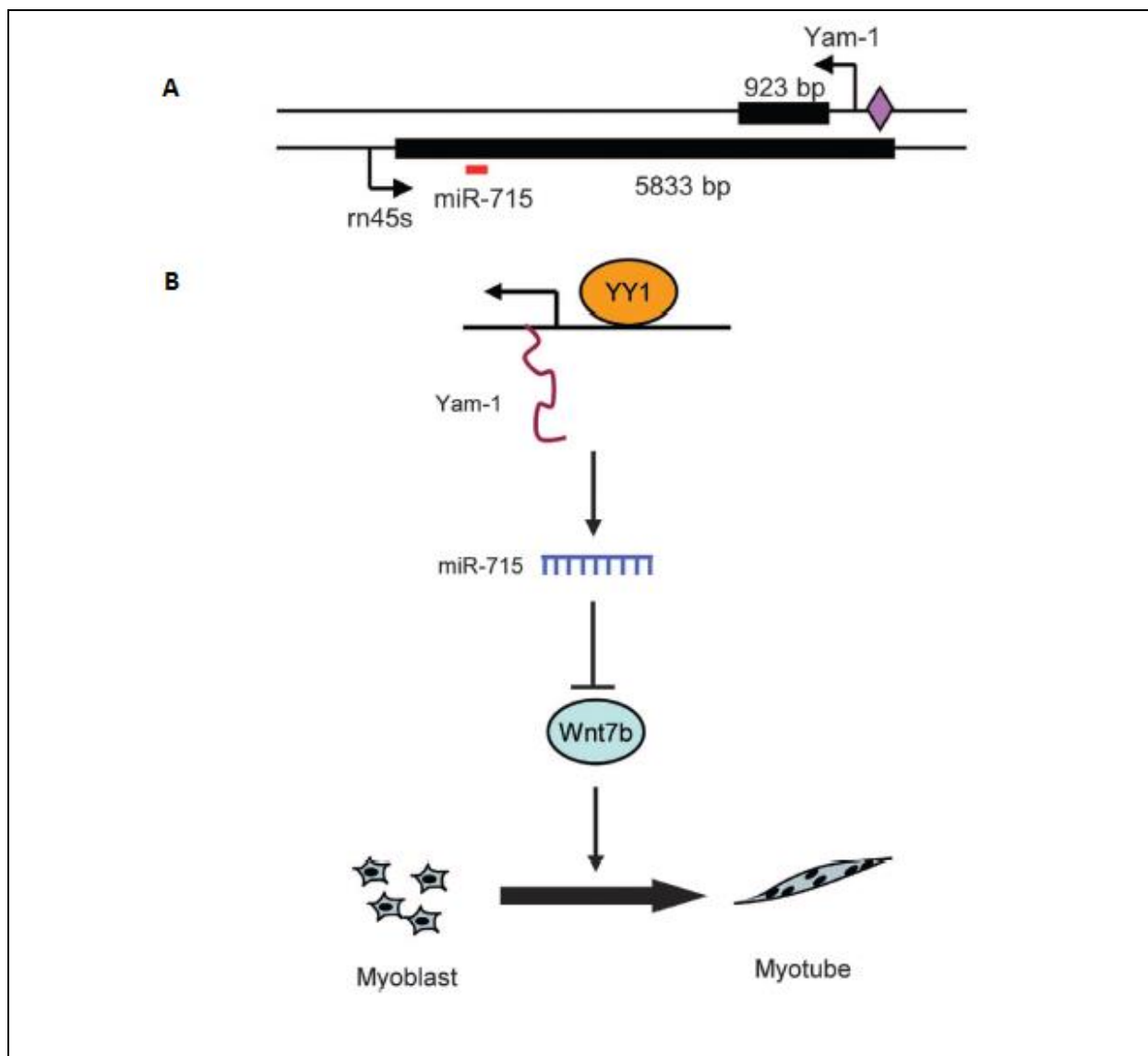


#### Abbildung 51: Prozessierung der 47S prä-rRNA in der Maus

Nach der Transkription der 45-kb-Transkriptionseinheit entsteht die 47S prä-rRNA. Die von Wei und Kollegen entdeckte Schnittstelle A0 ist 127 Nukleotide stromaufwärts der miR-715 entfernt. A0 wird von ExoSc10, einer Komponente des Exosomen-Komplex, erkannt und geschnitten. Bei der Prozessierung der 47S prä-rRNA zur 18S rRNA entsteht u.a. als Nebenprodukt die 19S rRNA, auf der der Vorläufer der sncRNA-715 lokalisiert ist (Modifiziert nach Kent et al., 2009).

Ebenfalls wäre interessant zu erfahren, wie die Expression der sncRNA-715 reguliert wird. In jeder Zelle wird während des gesamten Lebenszyklus permanent ribosomale RNA zur Translation der Proteine benötigt. Es ist eher unwahrscheinlich, dass die reife sncRNA-715 ebenfalls in gleichem Ausmaß synthetisiert wird. Es ist wahrscheinlich, dass die 19S rRNA kontinuierlich synthetisiert wird und dass die Regulation der sncRNA-715 Synthese auf der Ebene dieser ribosomalen RNA erfolgt. Es muss weitere Signalwege geben, welche schließlich die Reifung der sncRNA-715 aus der 19S ermöglichen. Als solches Signal könnte TWEAK (*Tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis*) in Frage kommen. TWEAK ist ein Zytokin aus der TNF-Familie (Tumor Nekrose Faktor). Die Bindung von TWEAK an den Rezeptor Fn14 (*fibroblast growth factor-inducible*) löst verschiedene Signalkaskaden in der Zelle aus, welche z.B. Proliferation, Migration, Apoptose und proinflammatorische Antworten induzieren. Panguluri und Kollegen konnten kürzlich in der prämyoblastischen Vorläuferzelllinie C2C12 zeigen, dass TWEAK die Expression von insgesamt 6 miRNAs signifikant hoch reguliert, wobei miR-715 am stärksten reguliert wird (Panguluri et al., 2010). In der Literatur ist die Expression von TWEAK in Oligodendrozyten oder Schwann-Zellen bisher nicht beschrieben. TWEAK spielt aber eine wichtige Rolle im EAE (experimentellen autoimmun Enzephalomyelitis) Tiermodell, welches die Pathologie der Multiplen Sklerose widerspiegelt. Prinz-Hadad und Kollegen konnten zeigen, dass es zu einem mildereren EAE Krankheitsverlauf kommt, wenn TWEAK daran gehindert wird, an seinen Rezeptor Fn14 zu binden und entsprechende Signalkaskaden zu induzieren (Prinz-Hadad et al., 2013). Die Autoren führen den Effekt u.a. auf eine reduzierte Infiltration von Lymphozyten zurück. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Expression von TWEAK in Astrozyten in EAE stark erhöht ist (Desplat-Jego et al., 2002). In Bezug auf diese Arbeit müsste die Expression von TWEAK in Oligodendrozyten untersucht werden. Möglicherweise wird TWEAK in Oligodendrozyten exprimiert und ist an der Synthese der reifen sncRNA-715 beteiligt. Kann dies bestätigt werden, müsste die Expression von TWEAK in humanen chronisch-inaktiven MS Läsionen untersucht werden. Hier könnte durch eine Hochregulation von TWEAK ein Hinweis für den signifikanten Anstieg der sncRNA-715 in diesen Bereichen erbracht werden. Neben TWEAK könnte eine lincRNA (large intergenic non-coding RNA) die Expression der miR-715 regulieren. LincRNAs können die Transkription von Genen in *cis* und in *trans* regulieren und wurden erstmals 2009 entdeckt (Guttman et al., 2009, Ulitsky and Bartel 2013). In der Veröffentlichung von Lu und Kollegen konnte in Myoblasten gezeigt werden, dass die lincRNA Yam-1 die Transkription von miR-715 in *cis* reguliert (Lu et al., 2013). Yam-1 ist in der 45-kb rDNA-Transkriptionseinheit ~3kb stromabwärts der miR-715 lokalisiert (Abbildung 52A). Die Transkription von Yam-1 wird durch den Transkriptionsfaktor YY1 reguliert und erfolgt auf dem Minusstrang. Wie Yam-1 die Transkription der miR-715 reguliert, ist noch nicht bekannt. Es wird vermutet, dass Yam-1 Transkriptionsfaktoren oder Chromatin-modifizierende Komponenten zum Promotor der 45-kb rDNA-Transkriptionseinheit rekrutiert und somit die Transkription von miR-715 beeinflusst. Ob Yam-1 in Oligodendrozyten exprimiert wird und dort an der Transkription der miR-715 beteiligt ist, muss noch erforscht werden. Lu und Kollegen konnten auch zeigen, dass miR-715 in Myoblasten in einem bestimmten Signalweg eine Rolle spielt, der über die Proteine

der *Wingless* Familie (Wnt-Signalweg) aktiviert wird. Dabei interagiert miR-715 mit der theoretischen Bindestelle in der 3'UTR der Wnt7b mRNA und reduziert die Menge an mRNA (Abbildung 52B). Da Wnt7b die Differenzierung von Myoblasten fördert, verhindert die Überexpression der miR-715 die Synthese des Wnt7b Signalproteins und damit die Differenzierung der Zellen. In Oligodendrozyten ist die Expression von Wnt7b nicht bekannt. Im Gegensatz zu Wnt3 kann Wnt7 auch nicht die Proliferation von Oligodendrozyten fördern (Ortega et al., 2013).



**Abbildung 52: Regulation der miR-715 in Myoblasten**

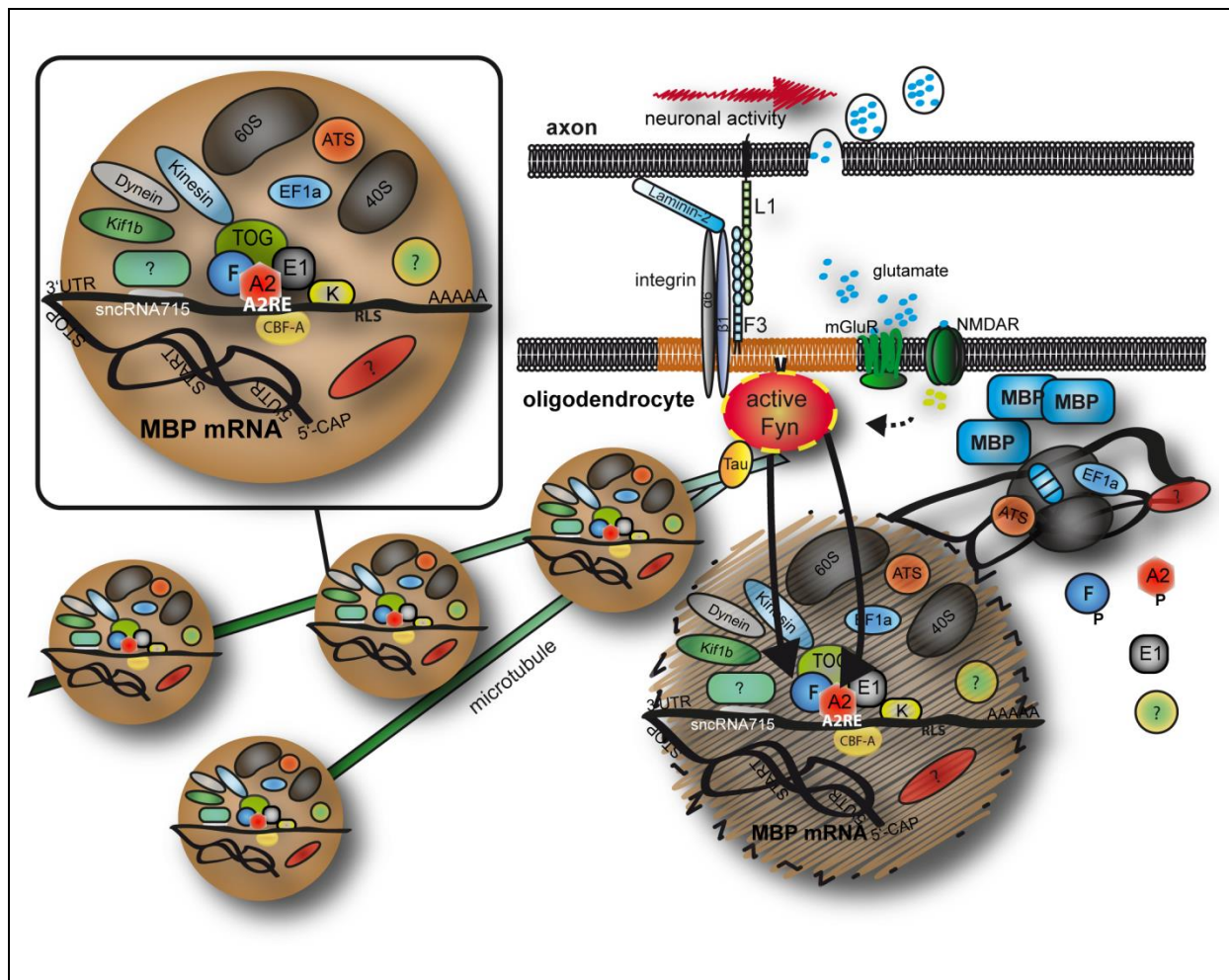
A) LincRNA Yam-1 ist wie miR-715 (rot) in der 45-kb rDNA-Transkriptionseinheit lokalisiert. Die Transkription von Yam-1 erfolgt durch die Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor YY1 (violette Raute) auf dem Minusstrang.

B) Der Transkriptionsfaktor YY1 induziert die Transkription der lincRNA Yam-1. Yam-1 reguliert in cis die Transkription von miR-715. Mir-715 interagiert mit der 3'UTR der Wnt7b 3'UTR, induziert den Abbau der mRNA und verhindert schließlich die Differenzierung der Myoblasten (Modifiziert nach Lu et al., 2013).

## 5.2 Bedeutung der sncRNA-715 für Oligodendrozyten

### 5.2.1 SncRNA-715 reguliert die Translation der MBP mRNA im A2-Transportweg

Im Zuge der Myelinisierung muss ein Oligodendrozyt entscheiden, wie viele und vor allem welche axonalen Segmente myelinisiert werden müssen, und wie oft das Axon umhüllt werden muss. Dabei hängt die Synthese von MBP und anderen Komponenten des Myelins von den Eigenschaften des zu myelinisierenden Axons ab. Dazu zählen zum einen die elektrische Aktivität und zum anderen die Dicke des Axons (G-Ratio, Abschnitt 2.1.1.3). Bestimmte neuronale Signalmoleküle ermöglichen die räumliche Orientierung des Oligodendrozyten (Abschnitt 2.1.1.1). Wenn ein Oligodendrozyt auf ein zu myelinisierendes Axon trifft, muss er in einem engen Zeitfenster Komponenten der Myelinmembran ortsspezifisch und in ausreichenden Mengen synthetisieren. Wie bewältigt ein Oligodendrozyt diese enorme biosynthetische Leistung? Das Myelinprotein MBP wird dezentral synthetisiert und erst nach axo-glialem Kontakt zur wachsenden Myelinmembran transportiert und eingebaut. Die Myelinkomponenten PLP, MAG und MOG hingegen werden durch endosomale Transport- und Sortierungsprozesse in die Myelinmembran integriert (Krämer et al., 2001; Winterstein et al., 2008). Da MBP ein basisches Protein ist, welches mit intrazellulären Membranen interagieren und diese kompaktieren könnte (Staugaitis et al., 1990), wird die mRNA in hnRNP A2 RNA Granula verpackt. Es wird davon ausgegangen, dass die Aktivierung der Nicht-Rezeptor Tyrosinkinase Fyn, durch die Interaktion von axonalem L1-CAM an oligodendrogliales F3/Contactin (White et al., 2008, Laursen et al., 2009) den Mikrotubuli-abhängigen Transport der hnRNP A2 RNA Granula in die distalen Fortsätze der Oligodendrozyten ermöglicht (Krämer-Albers & White, 2011). Während des Transports ist die MBP mRNA in einem translational, inaktiven Zustand. Der molekulare Mechanismus der translationalen Hemmung ist bisher kaum verstanden. Es wird vermutet, dass hnRNP E1 die Translation der mRNA im Granula inhibieren könnte (Kosturko et al., 2006). Allerdings konnten Kosturko und Kollegen bisher keinen direkten Effekt von hnRNP E1 auf die endogene MBP mRNA zeigen, sondern nur, dass hnRNP E1 teilweise mit hnRNP A2 und mikroinjizierter mRNA, welche das 11-Nukleotid lange A2RE enthält, in Oligodendrozyten kolokalisiert (Kosturko et al., 2006). Wahrscheinlich existiert demnach ein weiterer Mechanismus, der die Translation der MBP mRNA während des Transports verhindert. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, dass sncRNA-715 ein Bestandteil der hnRNP A2 Granula ist und dort spezifisch die Translation von MBP verhindert (Abbildung 53). Es konnte gezeigt werden, dass sncRNA-715 mit der vorhergesagten Bindestelle in der MBP 3'UTR interagiert und die Synthese des MBP Proteins verhindert. Weiterhin ist sncRNA-715 in zytoplasmatischen granulären Strukturen lokalisiert und assoziiert mit MBP mRNA und hnRNP A2.



**Abbildung 53: SnRNA-715 reguliert die Translation der MBP mRNA im A2-Transportweg**

Schematisch dargestellt ist der hnRNP A2 Transportweg. MBP mRNA wird in RNA Granula zusammen mit RNA bindenden Proteinen, Motorproteinen und Komponenten der Translationsmaschinerie zur Plasmamembran transportiert. Die Translation der MBP mRNA wird durch die Interaktion mit der snRNA-715 verhindert. Die Bindung von neuronalem L1 an oligodendrogliales F3 führt zur Aktivierung der Fyn-Kinase. hnRNP A2 wird Fyn-abhängig phosphoryliert, wodurch hnRNP A2 vom A2RE der MBP mRNA dissoziiert und MBP ortsspezifisch translatiert werden kann (Müller et al., 2013).

Es ist wahrscheinlich, dass die Interaktion der snRNA-715 mit ihrer Seed-Region in der MBP 3'UTR über exakte Basenpaarung erfolgt. Es könnten auch andere Komponenten die Interaktion vermitteln. Darüber hinaus ist nicht bekannt, ob snRNA-715 ein Teil des *miRNA-induced silencing complex* (miRISC) ist. MiRNAs können auch unabhängig des RISC Komplexes agieren, indem sie direkt an RNA-bindende Proteine binden, und damit die Interaktion dieser Proteine mit Ziel-RNAs verhindern (Garzon et al., 2010). Eiring und Kollegen konnten einen solchen RISC unabhängigen Effekt anhand der miR-328 belegen (Eiring et al., 2010). Diese miRNA kann unabhängig ihrer Seed-Sequenz an das hnRNP E2 Protein binden. Dies hat zur Folge, dass die Interaktion von hnRNP E2 mit der Ziel-mRNA aufgelöst wird und die mRNA translatiert werden kann.

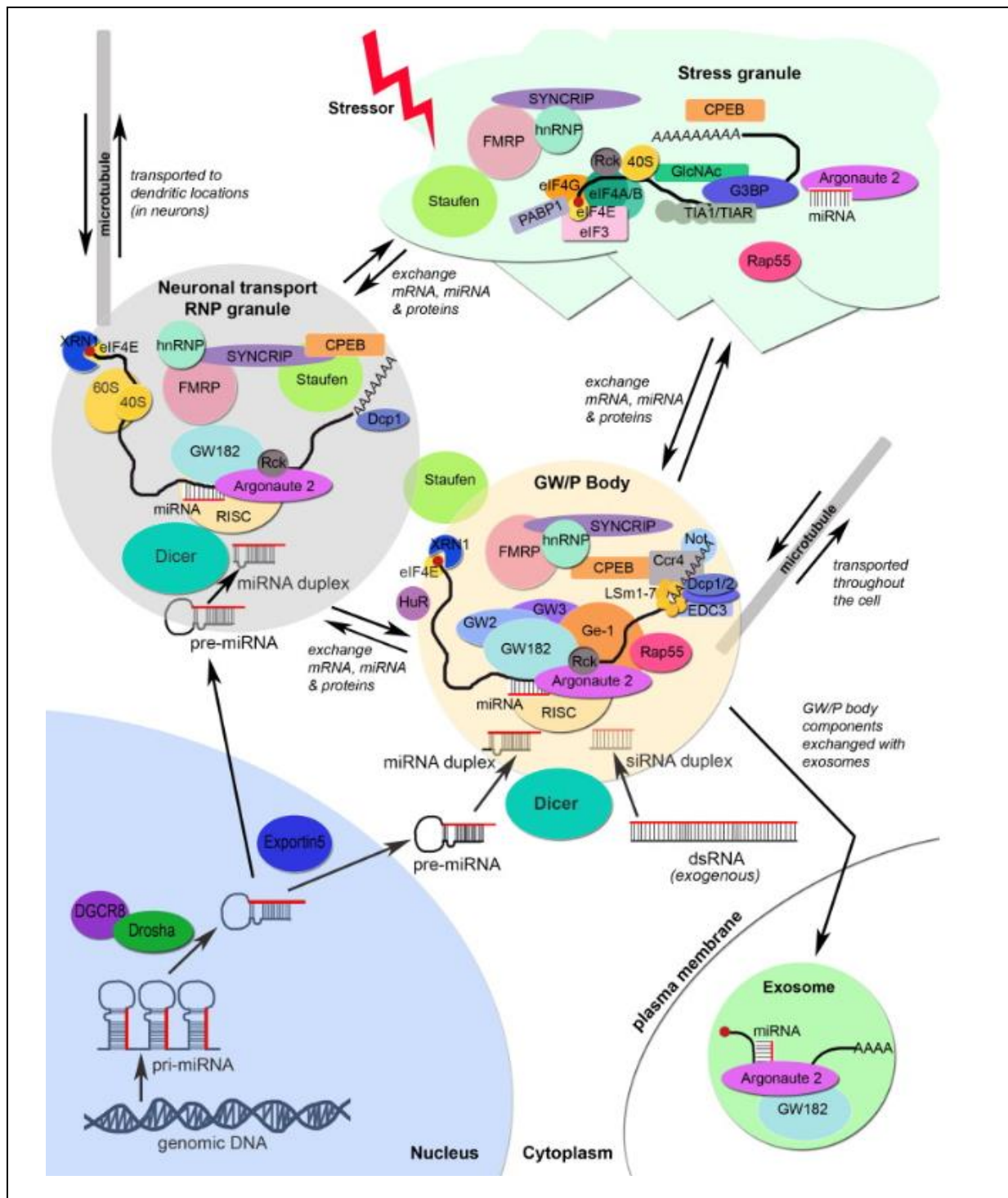
### 5.2.2 SncRNA-715 ist in zytoplasmatischen granulären Strukturen lokalisiert

In primären Oligodendrozyten ist die sncRNA-715 in zytoplasmatischen granulären Strukturen vor allem um den Zellkern, aber auch in den Fortsätzen lokalisiert (Abbildung 37). Dabei könnte es sich, wie bereits erwähnt, um die hnRNP A2 Transportgranula handeln. SncRNA-715 könnte aber auch (teilweise) in Stress Granula oder P-Bodies (*Processing Bodies*) lokalisiert sein. In Abbildung 54 sind die einzelnen zytoplasmatischen Granula dargestellt (Moser & Fritzler, 2010). Viele mRNAs werden nach Import in das Zytoplasma direkt an Polysomen translatiert. Manche mRNAs werden allerdings nicht direkt translatiert, sondern in RNA-Granulen gespeichert, abgebaut oder zum Zielort transportiert und dort lokal translatiert.

Die Bildung der Stress Granula erfolgt unter bestimmten Stressbedingungen, wie z.B. Hitze, UV-Strahlung und Nährstoffmangel. Die mRNAs werden zum Schutz vor dem Abbau in Stress Granula in einem translational inaktiven Zustand gespeichert. Unter günstigen Bedingungen können diese mRNAs wieder freigesetzt und translatiert oder abgebaut werden. Neben den mRNAs werden in den Stress Granula ribosomale Untereinheiten, eukaryotische Translations-Initiationsfaktoren, RNA-bindende Proteine und miRNAs gefunden (Moser & Fritzler, 2010). Kürzlich konnte das RNA-binde Protein QKI-6 als neue Komponente von Stress Granula identifiziert werden (Wang et al., 2010). QKI (*quaking*) Proteine interagieren mit der 3'UTR der MBP mRNA und sind am Transport und der Stabilisation mRNA beteiligt (Li et al., 2000). Wang und Kollegen konnten zeigen, dass QKI-6 zusammen mit Ago2 und MBP mRNA in Stress Granula in Oligodendrozyten kolokalisiert (Wang et al., 2010). In diesen Stress Granula könnte die sncRNA-715 lokalisiert sein und die Translation der MBP mRNA oder anderer mRNA inhibieren.

P-Bodies sind zytoplasmatische Mikrokompimente, in denen der Abbau oder die Speicherung von mRNAs erfolgen kann. Deshalb sind die wichtigsten Komponenten dieser Granulen Enzyme, die den 5'-3' mRNA-Abbau ermöglichen, und der RNA-induced silencing complex (RISC). Darüber hinaus sind RNA-bindende Proteine (hnRNPs, AGOs) und sncRNAs (miRNAs und siRNAs) zu finden (Moser & Fritzler, 2010). Da die MBP mRNA in Oligodendrozyten schon vor dem Protein nachgewiesen werden kann (Colello et al., 1995), könnte die Speicherung der mRNA in diesen P-Bodies erfolgen und sncRNA-715 könnte die Translation verhindern.





**Abbildung 54: Cytoplasmatische RNA Granula**

Insgesamt gibt es drei verschiedene RNA Granula, die sich in ihrer molekularen Zusammensetzung und Funktion unterscheiden. Manche Komponenten, wie z.B. snRNAs, hnRNPs und Ago Proteine sind in allen Granula zu finden. Die P-Bodies (*processing bodies*) dienen dem Abbau oder der Speicherung von mRNAs, in den Stress-Granula werden vorübergehend mRNAs gespeichert und in den RNA-Transport-Granula erfolgt die Lokalisation der mRNAs zum Zielort (Moser & Fritzer, 2009).

### 5.2.3 SncRNA-715 beeinflusst die Morphologie primärer Oligodendrozyten und erhöhte Mengen induzieren Apoptose

Im Rahmen dieser Arbeit konnte beobachtet werden, dass sncRNA-715 transfizierte Oligodendrozyten kürzere oder abnormale Fortsätze besaßen und dass allgemein die Zellen morphologisch verändert waren. Im Vergleich zur Kontrolltransfektion stieg die Anzahl an Zellen mit einer abnormalen Morphologie signifikant an, wobei Zellen mit verzweigten Ausläufern reduziert waren (Abbildung 33). Solche morphologischen Veränderungen konnten auch in *Shiverer* Oligodendrozyten Kulturen beobachtet werden, die kein funktionelles MBP Protein synthetisieren können. Diese Zellen haben vergrößerte Zellkörper, abnormale Zellfortsätze und können keine Membran Sheets ausbilden (Dyer et al., 1995). Zwar konnte in dieser Arbeit kein signifikanter Effekt auf die Ausbildung der Membranflächen beobachtet werden, trotzdem zeigten die Kulturen eine leichte Tendenz, weniger Membranflächen auszubilden. Generell ist hier anzumerken, dass reifere Oligodendrozyten im gewählten experimentellen Ansatz (einer drei Tage alten Kultur) eher selten zu finden sind. Eine Erklärung für die verminderte Ausbildung der Membranflächen könnte die sncRNA-715-bedingte Reduktion des MBP Proteins sein. MBP ist in Oligodendrozyten nicht nur für die Kompaktierung des Myelins essentiell (Wood et al., 1984), sondern kontrolliert auch die molekulare Zusammensetzung der Myelinmembran und der Membranflächen in Kultur (Aggarwal et al., 2011, 2013; Simons et al., 2012). Die abnormale Morphologie der Zellen könnte ebenfalls durch die sncRNA-715-vermittelte Reduktion des MBP Proteins hervorgerufen werden. MBP ist ein wichtiges multifunktionales Protein, welches mit Komponenten des Zytoskeletts interagiert und an dessen Zusammenbau beteiligt ist (Boggs, 2006; Boggs et al., 2011; Smith et al., 2012). In *Shiverer* Oligodendrozyten ist der Zusammenbau des Zytoskeletts gestört und wird vermutet, dass vor allem deshalb die Morphologie der Zellen verändert ist (Dyer et al., 1995). Da MBP auch an der Aufrechterhaltung der oligodendroglialen Homöostase beteiligt ist, könnte dies die reduzierte Zellzahl und die Induktion der Apoptose in Oligodendrozyten erklären.

Eine bestimmte miRNA kann mehrere verschiedene Zielgene haben, umgekehrt kann eine einzelne mRNA durch verschiedene miRNAs beeinflusst werden. Deshalb könnte es sein, dass sncRNA-715 die Synthese weiterer Proteine in der Zelle reguliert, indem sncRNA-715 direkt mit der Ziel-mRNA oder mit RNA-bindenden Proteinen assoziiert. In Oligodendrozyten reguliert zum Beispiel miR-219 die Expression von PDGFR $\alpha$ , Sox6, FoxJ3, und ZFP238 (Dugas et al., 2010). Diese Proteine fördern alle die Proliferation und verhindern die Differenzierung der Oligodendrozyten. Potentielle mRNAs, die in Oligodendrozyten von sncRNA-715 reguliert werden könnten, sind im folgenden Abschnitt aufgeführt.

### 5.2.4 Potentielle Ziel-mRNAs

In Tabelle 10 sind potentielle Ziel-mRNAs zusammengefasst, die für Oligodendrozyten relevant sind und von sncRNA-715 reguliert werden könnten.

**Tabelle 10: Potentielle sncRNA-715 Ziel-mRNAs in Oligodendrozyten**

Protein	Funktion	Vorhergesagt sncRNA-715 Bindestelle
MOBP	Komponente des Myelins	✓
AcetylCoA-Carboxylase	Fettsäuresynthese im Myelin	✓
Retinoid X Rezeptor $\gamma$	Differenzierung der Oligodendrozyten	✓

Das Myelin assoziiertes Oligodendrozyten basisches Protein (MOBP) ist am Aufbau der radialen Komponente des Myelins beteiligt und wird nur in Oligodendrozyten, nicht in Schwann-Zellen exprimiert (Yamamoto et al., 1999, Holz & Schwab, 1997). Interessanterweise haben 4 (MOBP 81A, 71, 99 und 169) der 7 bekannten MOBP Isoformen ein A2RE und werden zur Plasmamembran lokalisiert (Montague et al., 2005, Barbarese et al., 1999). Diese 4 Isoformen könnten zusammen mit der MBP mRNA in den hnRNP A2 Granula transportiert werden. SncRNA-715 könnte die Translation der MOBP mRNA während des Transports verhindern.

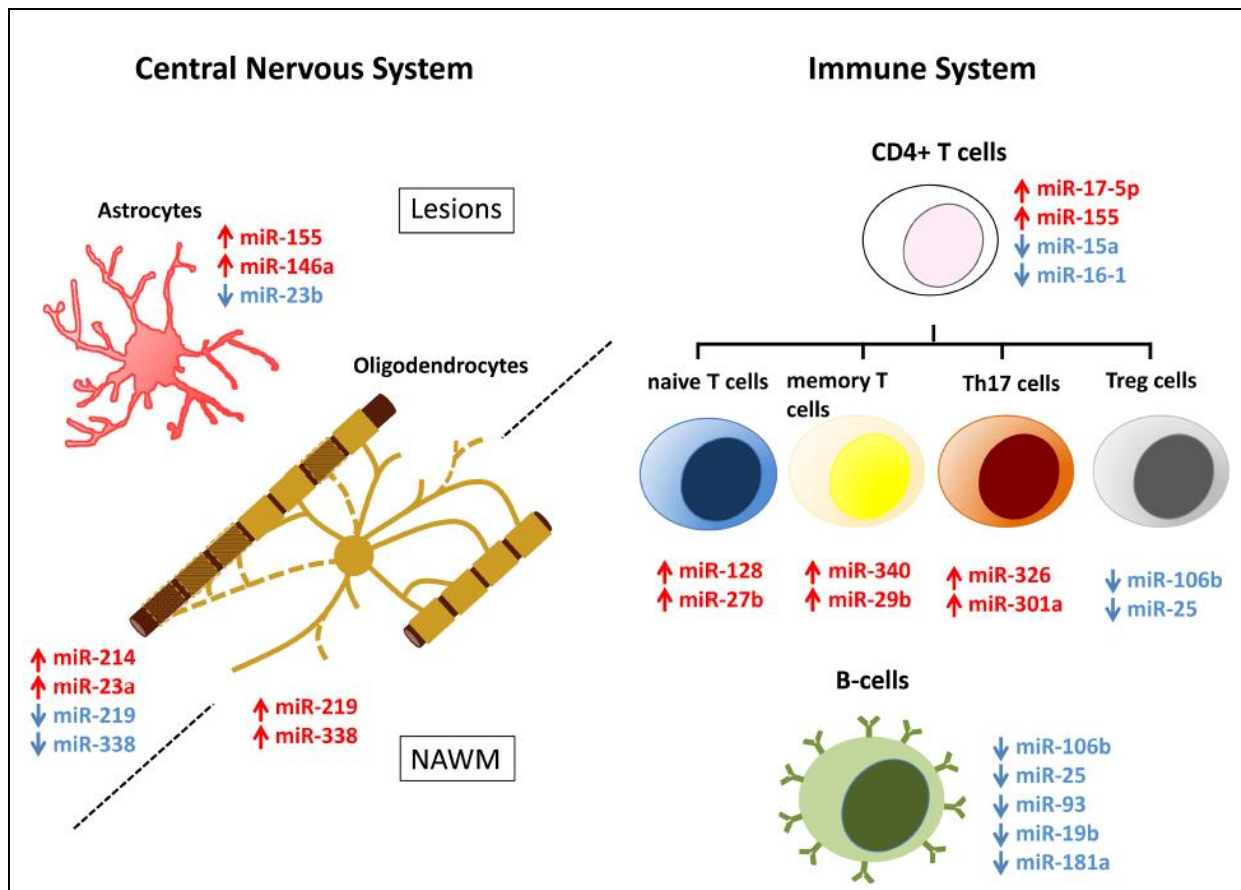
Die AcetylCoA-Carboxylase ist an der Synthese der Fettsäuren im Myelin beteiligt und in aufgereinigtem Myelin zu finden (Chakraborty & Ledeen, 2003). SncRNA-715 könnte die Translation der AcetylCoA-Carboxylase regulieren, und damit nicht nur die Protein-, sondern auch die Lipidsynthese des Myelins beeinflussen.

Der Retinoid X Rezeptor  $\gamma$  ist ein Rezeptor im Zellkern, der Heterodimere bilden und als Transkriptionsfaktor die Transkription von Genen regulieren kann. Es konnte gezeigt werden, dass dieser Rezeptor in Oligodendrozyten in aktiven remyelinisierten MS Läsionen stark hochreguliert wird. In RNAi Experimenten konnte gezeigt werden, dass der Knock-down des Rezeptors in kultivierten Oligodendrozyten die Differenzierung verhindert. Der Retinoid X Rezeptor  $\gamma$  scheint damit für die Differenzierung der Oligodendrozyten und die Remyelinisierung essentiell zu sein (Huang et al., 2011). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sncRNA-715 in chronisch inaktiven MS Läsionen hochreguliert ist. Es könnte sein, dass sncRNA-715 nicht nur die Translation des MBP Proteins, sondern auch des Retinoid X Rezeptors inhibiert, und deshalb die OPCs ihr Remyelinisierungspotential verloren haben. Ob die Expression des Retinoid X Rezeptors in inaktiven MS Läsionen herunter reguliert ist, muss noch untersucht werden.

### 5.2.5 Bedeutung der sncRNA-715 in Multiple Sklerose

Im Menschen kodieren ungefähr 1-4% aller Gene für miRNAs. Eine miRNA kann bis zu 200 mRNAs regulieren (Lu et al., 2008). Man geht davon aus, dass über die Hälfte der menschlichen Gene von miRNAs reguliert werden. Diesen kleinen nicht kodierenden RNAs (sncRNAs) wird eine Schlüsselrolle bei der Regulation der Genexpression zugeschrieben und sie scheinen fast jeden zellulären Prozess zu kontrollieren. Eine Dysregulation dieser sncRNAs kann zu verschiedenen Krankheiten führen (Esteller, 2011). Derzeit enthält die HMDD Datenbank (Human microRNA Disease Database, <http://202.38.126.151/hmdd/tools/hmdd2.html>) 10237 Einträge, die zusammengestellt aus

3450 Publikationen, 572 miRNAs beinhalten, welche mit 378 Krankheiten assoziiert sind. Im ZNS werden fast 60% der bisher identifizierten miRNAs exprimiert und sind dort essentiell für die Neurogenese, das Auswachsen der neuronalen Fortsätze, die Differenzierung der Oligodendrozyten und die Aufrechterhaltung des Myelins (de Faria et al., 2012). Die Störungen ihrer regulatorischen Funktion im ZNS führten unter anderem zu demyelinisierenden Krankheiten wie der Multiplen Sklerose (MS). Um mögliche neue Behandlungsmöglichkeiten zu entwickeln, müssen neue miRNA Targets identifiziert werden und Veränderungen der miRNA Expression in MS Patienten aufgezeigt werden. In Blut von MS-Patienten konnten bereits 165 miRNAs identifiziert werden, die gegenüber eines gesunden Kontroll-Patienten hoch reguliert sind (Keller et al., 2009). In aktiven und inaktiven Läsionen der weißen Substanz von MS-Patienten, sowie in der weißen Substanz von Kontroll-Patienten, haben Junker und Kollegen über quantitative Real-Time PCR die Expression von 365 verschiedener miRNAs untersucht (Junker et al., 2009). Dabei unterscheidet sich das Expressionsmuster der miRNAs nicht nur in den Läsionen gegenüber der gesunden weißen Substanz, sondern auch innerhalb einer aktiven und inaktiven Läsion. Zum Beispiel werden miR-155 und miR-326 nur in aktiven Läsionen stark hochreguliert (Junker et al., 2009). MiR-214 und miR-23a sind einige der wenigen miRNAs, die sowohl in aktiven, als auch in inaktiven Läsionen gegenüber der normal erscheinenden weißen Substanz (NAWM) in MS Patienten stark hochreguliert sind (Junker et al., 2009). Andere miRNAs, wie miR-219 und miR-338-5p werden in inaktiven Läsionen stark herunter reguliert (Junker et al., 2009). MiR-219 reguliert die mRNA des Proteins ELOVL7 (*elongation of very long chain fatty acids protein 7*), und ist damit an der Aufrechterhaltung des Myelins beteiligt (Shin et al., 2009). Die Expression dieser miRNA wird in der NAWM hoch reguliert (Abbildung 55).



**Abbildung 55: Störungen der miRNA Expression in Läsionen und Immunzellen von MS-Patienten im Gehirn**

Dargestellt sind verschiedene miRNAs, die in ZNS Läsionen, NAWM oder im Immunsystem von MS-Patienten hoch-oder runter reguliert werden. Die Störungen der miRNA Expression erfolgt vor allem im ZNS in Oligodendrozyten und Astrozyten, im Immunsystem in naiven T-Zellen, T-Gedächtniszellen, Th17-Zellen, T-Regulatorzellen ( $T_{reg}$ ) und B-Zellen (de Faria et al., 2012).

In dieser Arbeit wurden anhand von immunhistologischen Färbungen von humanem MS Gewebe chronische, inaktive Läsionen identifiziert und klar von der NAWM abgegrenzt (durchgeführt von M. Witte unter der Leitung von J. van Horsen). In diesen Läsionen wurden Olig2<sup>+</sup>-Zellen gefunden. Olig2 ist ein Transkriptionsfaktor, welcher in allen Stadien der Oligodendrozyten-Differenzierung exprimiert wird (Pfeiffer et al., 1993). Diese Oligodendrozyten-Vorläuferzellen können in den Läsionen im Vergleich zu den Oligodendrozyten-Vorläuferzellen in der NAWM kein MBP Protein mehr synthetisieren. Die Menge an MBP mRNA ist ebenfalls reduziert, was vermutlich zum einen auf die verringerte Anzahl an Oligodendrozyten in den Läsionen und zum anderen auf den Differenzierungsgrad der Zellen zurück zu führen ist. Trotzdem ist eine relativ hohe Menge an MBP mRNA in den Läsionen zu finden (Abbildung 41). In diesen chronischen, inaktiven Läsionen konnte gezeigt werden, dass die Expression der sncRNA-715 hochreguliert wird (Abbildung 42). Da sncRNA-715 mit der Bindestelle in der MBP 3'UTR interagiert und spezifisch die Translation hemmt, könnte diese regulatorische RNA in den Läsionen die Synthese des MBP Proteins verhindern und folglich als Inhibitor der Remyelinisierung fungieren. Es ist bekannt, dass in MS unter

anderem die Differenzierung der Oligodendrozyten gestört ist, kein funktionelles Myelin gebildet werden kann und die Remyelinisierung nicht mehr erfolgt. MiR-214, welche in MS Läsionen stark angereichert ist, wird ebenfalls während der Oligodendrozyten-Differenzierung herunter reguliert (Letzen et al., 2010). Diese miRNA besitzt eine konservierte Bindestelle in der MOBP mRNA (Barca-Mayo & Lu, 2012). MiR-214 könnte (neben sncRNA-715) in den MS-Läsionen möglicherweise die Translation des MOBP Proteins verhindern.

Ob die reduzierten sncRNA-715 Mengen spezifisch auf Oligodendrozyten zurück zu führen sind und zur Pathogenese von MS beitragen, kann nicht eindeutig festgelegt werden. Wie in Abbildung 55 dargestellt, können die Dysregulationen der miRNAs auf eine veränderte Expression in Oligodendrozyten, Astrozyten und Immunzellen, die in das ZNS infiltrieren, zurück zu führen sein. Interessanterweise konnten 18 der 21 miRNAs, die unterschiedlich in aktiven und inaktiven Läsionen exprimiert werden, in Astrozyten gefunden werden (Junker et al., 2011). Allerdings konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass sncRNA-715 zwar auch in Neuronen, Mikroglia und Astrozyten zu finden ist, aber in diesen Zelltypen im Vergleich zu Oligodendrozyten deutlich geringer exprimiert wird (siehe Abbildung 23). Darüber hinaus sind in chronisch inaktiven MS Läsionen keine Makrophagen oder Immunzellen vorhanden (Hauw et al., 1992).

Die Dysregulation von miRNAs im Blut oder Läsionen im ZNS von MS Patienten zeigen, dass diese kleinen regulatorischen RNAs möglicherweise zur Pathogenese der Krankheit beitragen und bieten somit einen neuen Ansatzpunkt für Therapien. Ob schließlich die veränderte Expression der Auslöser oder eine Folge der Krankheit ist muss noch geklärt werden. Durch die Verwendung von miRNA Mimics und Inhibitoren könnten durch gezielte Überexpression oder Inhibition der miRNAs diese Dysregulation überwunden werden. Zum Beispiel konnten in der experimentellen autoimmun Enzephalomyelitis (EAE), einem Tiermodell, welche die Pathologie der Multiplen Sklerose widerspiegelt, solche miRNA Inhibitoren und Mimics *in vivo* eingesetzt werden. Zur Überexpression oder Inhibition der miR-326 wurden Mäuse mit Lentiviren transduziert. Es konnte gezeigt werden, dass die Überexpression der miR-326 die Zahl der Immunzellen und damit den Schweregrad der Krankheit erhöht. Die Inhibition dieser miRNA führt hingegen zu einer geringeren Th17 Zellzahl und einer mildereren EAE (Du et al., 2009). MiR-326 zählt zu den drei miRNAs, die in aktiven MS Läsionen am stärksten hoch reguliert werden (de Faria et al., 2012). Da sncRNA-715 ein möglicher Inhibitor der Remyelinisierung während der Pathologie der MS darstellt, könnte durch gezielte Inhibition der sncRNA-715 in Oligodendrozyten zumindest die Synthese des MBP Proteins induziert werden.

### 5.3 Bedeutung der sncRNA-715 für Schwann-Zellen

Ob ein Axon myelinisiert wird, hängt im PNS von der Dicke des Axons (über 1  $\mu\text{m}$ ) (Sherman & Borphy, 2005) und dem axonalen Wachstumsfaktor Neuregulin 1 Typ III (Arthur-Farraj et al., 2011) ab. Dabei umhüllt eine prämyelinisierende Schwann-Zelle zunächst ein Bündel von Axonen und entscheidet dann, welches Axon myelinisiert wird. Auch wenn Schwann-Zellen nur ein axonales Segment myelinisieren, muss garantiert werden, dass die Synthese der

Proteine auch in der wachsenden Myelinmembran aufrechterhalten wird. Es konnte gezeigt werden, dass RNAs in zytoplasmatischen Kanälen, den Cajal-Bändern, transportiert werden können und dass der Transport bis zu einer Woche dauern kann (Gould & Mattingly, 1990). Schwann-Zellen exprimieren neuronale mRNAs (z.B. Neurofilament mRNA), die in diesen Kanälen zusammen mit Ribosomen zum Axonen transportiert werden können (Court et al., 2008; Roberson et al., 1992). Wie bereits in Abschnitt 2.1.2.2 erwähnt, wird die MBP mRNA ebenfalls durch einen unbekanntem Mechanismus in die Myelinmembran transportiert und dort lokal translatiert (Masaki, 2012, Trapp et al., 1987). Die cytoplasmatischen Kanäle könnten auch für den Transport von MBP mRNA verwendet werden. Es ist sehr wahrscheinlich, dass in Schwann-Zellen und Oligodendrozyten die Lokalisation und die translationale Hemmung der MBP mRNA ähnlichen Mechanismen unterliegen.

Die Expression der sncRNA-715 konnte bereits in Schwann-Zellen beschrieben werden. Im Mausmodell konnte nach einer Verletzung des Ischiasnervs gezeigt werden, dass die Expression der sncRNA-715 mit der Expression von Proliferationsgenen korreliert und invers zu Myelinisierungsgenen exprimiert wird (Chang et al., 2013). SncRNA-715 könnte die Differenzierung der Schwann-Zellen verhindern und dadurch die Proliferation begünstigen. In dieser Arbeit konnte auch gezeigt werden, dass die Synthese des MBP Proteins in Schwann-Zellen *in vitro* und *ex vivo* invers mit der Expression der sncRNA-715 korreliert. Weiterhin konnte erstmals gezeigt werden, dass hnRNP A2 in Schwann-Zellen exprimiert wird. Wie in Oligodendrozyten ist die Expression im Zellkern am stärksten. Da hnRNP A2 auch im Zytoplasma zu finden ist, könnte dieses RNA-bindende Protein auch an der Lokalisation der MBP mRNA beteiligt sein. In der hnRNP A2 Immunpräzipitation aus primären Schwann-Zellen konnte die sncRNA-715 zusammen mit hnRNP A2 angereichert werden. Eine inverse Korrelation zwischen der Ziel-mRNA und der miRNA konnte auch anhand eines weiteren Myelinproteins von Verrier und Kollegen in Schwann-Zellen beobachtet werden. Dort reguliert miR-29a die Translation des PMP22 Proteins (Verrier et al., 2009).

HnRNP A2 und sncRNA-715 scheinen in Schwann-Zellen assoziiert zu sein und könnten wie in Oligodendrozyten den Transport der MBP mRNA vermitteln.

#### 5.4 Ausblick

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass in Oligodendrozyten die sncRNA-715 mit der vorhergesagten Bindestelle in der MBP 3'UTR interagiert und die Translation inhibiert. Um einen direkten Effekt auf die Myelinisierung zu untersuchen, könnte der Einfluss der sncRNA-715 auf die Ausbildung von myelinisierten axonalen Segmenten in einem Kokultursystem aus Neuronen und Oligodendrozyten oder organotypischen Gewebekulturen analysiert werden.

Weiterhin konnte die Assoziation der sncRNA-715 mit der MBP mRNA und hnRNP A2 in der Immunpräzipitation aufgezeigt werden. Ob sncRNA-715 ein Teil der hnRNP A2 Granula ist, und die Translation der mRNA während des Lokalisationsprozesses zur Plasmamembran verhindert, muss noch geklärt werden. Hierzu müsste eine Kollokalisierung der MBP mRNA,

der sncRNA-715 und des hnRNP A2 Proteins mit Hilfe von immunzytochemischen Färbungen und der *In situ* Hybridisierung durchgeführt werden.

Die sncRNA-715 vermittelte Regulation der MBP mRNA könnte im miRISC Komplex erfolgen. Proteine der Argonaut (AGO) Familie assoziieren mit miRNAs im miRISC und stellen eine Schlüsselkomponente des miRISC dar (Filipowicz et al., 2008). In Kollisations-Studien und Immunpräzipitationen könnte die mögliche Interaktion zwischen der sncRNA-715 und AGO Proteinen untersucht werden. Die sncRNA-715 könnte aber auch unabhängig des miRISC mit der mRNA interagieren (Garzon et al., 2010).

Weiterhin müsste die Frage geklärt werden, wie die Interaktion der sncRNA-715 mit der MBP mRNA wieder aufgehoben werden kann. Bisher konnte gezeigt werden, dass die Fyn-abhängige Phosphorylierung des hnRNP A2 an der axo-glialen Kontaktstelle zur Auflösung des hnRNP A2 Granula und der Freisetzung der MBP mRNA führt (White et al., 2008). Wenn die sncRNA-715 zusammen mit AGOs im miRISC die Translation der MBP mRNA reguliert, könnte die Phosphorylierung der AGOs durch Fyn das Ablösen des miRISC induzieren und die Translation der mRNA ermöglichen. Rudel und Kollegen konnten bereits zeigen dass die Phosphorylierung von AGO Proteinen die Bindung zur miRNAs beeinflusst (Rudel et al., 2011). Auch miRISC unabhängig könnten sncRNA-715 assoziierte Proteine durch Fyn phosphoryliert werden und dadurch die Interaktion zwischen mRNA und sncRNA auflösen.

Da die sncRNA-715 in zytoplasmatischen granulären Strukturen vor allem um den Zellkern zu finden ist, ist es auch möglich, dass diese kleine regulatorische RNA in Stress Granula oder P-Bodies lokalisiert ist und dort die Translation der MBP mRNA oder anderer Ziel-mRNAs reguliert. Um die granulären Strukturen zu identifizieren und zwischen P-Bodies und Stress-Granula unterscheiden zu können, müssten zusätzlich immunzytochemischen Färbungen durchgeführt werden. Ein spezifischer Marker für Stress Granula ist zum Beispiel das RNA Bindeprotein TIAR-1 (Mazan-Mamczarz et al., 2006). Die beiden Schlüsselkomponenten der P-Bodies sind das GW182 Protein und das Decapping-Enzym Dcp1/2 (Moser & Fritzier, 2010).

Es ist zu vermuten, dass es weitere Ziel-mRNAs der sncRNA-715 in Oligodendrozyten gibt, da die Überexpression der sncRNA-715 die Morphologie der Zellen beeinflusst und Apoptose induziert. Mit einer massenspektrometrischen Analyse, z.B. nach Überexpression der sncRNA-715, könnten potentielle Ziel-mRNAs identifiziert und anschließend validiert werden. Solche Ziel-mRNAs könnten MOBP, AcetylCoA-Carboxylase und der Retinoid X Rezeptor  $\gamma$  sein (Abschnitt 5.2.4).

Die Anreicherung der sncRNA-715 in humanen MS Läsionen führt zu der Hypothese, dass diese regulatorische RNA durch die Interaktion mit den Ziel-mRNAs die Remyelinisierung verhindern kann. Um gezielt die Interaktion mit der Ziel-mRNA zu verhindern und die Remyelinisierung zu ermöglichen, könnten sncRNA-715 Inhibitoren (*antisense sncRNA-715*) in Oligodendrozyten-spezifische lentivirale Vektoren eingebracht und in Cuprizone-induzierte demyelinisierte Mäuse injiziert werden.

Weiterhin ist bekannt, dass miRNAs als Biomarker eingesetzt werden und zur Erkennung von verschiedenen Krankheiten beitragen (Gandhi et al., 2013). Es wäre interessant zu



untersuchen, ob die sncRNA-715 im Blut von MS-Patienten fehlreguliert ist und ebenfalls sich als Blut-basierte Diagnostik eignet.

Da es sich bei der sncRNA-715 nicht um eine „echte“ miRNA handelt, müsste an dieser Stelle noch analysiert werden, wie diese kleine RNA prozessiert und reguliert wird. Sind an der Regulation das Zytokin TWEAK und/oder die lincRNA Yam-1 beteiligt? Wird sncRNA-715 durch die Exosomen Komponente ExoSc10 prozessiert?

Es ist sehr wahrscheinlich, dass in Schwann-Zellen und Oligodendrozyten die Lokalisation und die translationale Hemmung der MBP mRNA ähnlichen Mechanismen unterliegen. Da hnRNP A2 und sncRNA-715 auch in Schwann-Zellen exprimiert werden, kann davon ausgegangen werden, dass sncRNA-715 und hnRNP A2 den Lokalisationsprozess der MBP mRNA im PNS vermitteln. Allerdings müssten noch weitere Versuche durchgeführt werden, um diese Hypothese zu stärken. Es müsste in Schwann-Zellen gezeigt werden, dass MBP mRNA mit der sncRNA-715 und hnRNP A2 kolokalisiert und in hnRNP A2 Granula zur Plasmamembran transportiert werden.

## 6 Zusammenfassung

Im zentralen Nervensystem (ZNS) myelinisieren Oligodendrozyten neuronale Axone, indem sie ihre Zellfortsätze mehrfach um axonale Segmente wickeln. Die Ausbildung dieser multilamellaren Membranstapel ermöglicht eine saltatorische und damit rasche und energie-effiziente Erregungsleitung (Nave, 2010). Eine Schädigung des Myelins beeinträchtigt die Reizweiterleitung und führt zur Degeneration der Axone, wie es zum Beispiel bei der Multiplen Sklerose der Fall ist. Das Myelin basische Protein (MBP) ist ein Hauptbestandteil des Myelin und ist essentiell für die Kompaktierung der Myelinmembran (Wood et al., 1984). Die MBP mRNA wird in hnRNP A2 enthaltenen RNA Granulen in einem translations-inaktiven Zustand zu den distalen Fortsätzen transportiert. Vermittelt durch axonale Signale wird nach axo-glialem Kontakt die Translation von MBP ermöglicht (White et al., 2008). Der genaue Mechanismus der differentiellen Genregulation des MBP Proteins ist bisher nur unzureichend aufgeklärt. In der vorliegenden Arbeit konnte eine kleine regulatorische RNA (sncRNA) identifiziert werden, welche über die seed Region mit der MBP mRNA interagieren und die Translation regulieren kann. In primären Oligodendrozyten führt die Überexpression der sncRNA-715 zu reduzierten MBP Protein Mengen und die Blockierung der endogenen sncRNA-715 führt zu einer gesteigerten MBP Synthese. Interessanterweise korreliert während der Differenzierung der Oligodendrozyten *in vitro* und *in vivo* die Synthese des MBP Proteins invers mit der Expression der sncRNA-715. In Oligodendrozyten beeinflusst eine experimentell erhöhte sncRNA-715 Menge die Zellmorphologie und induziert Apoptose. Weiterhin ist sncRNA-715 in zytoplasmatischen granulären Strukturen lokalisiert und assoziiert mit MBP mRNA in hnRNP A2 Transport-Granula. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass sncRNA-715 ein Bestandteil der hnRNP A2 Granula sein könnte und dort spezifisch die Translation der MBP mRNA während des Lokalisationsprozesses inhibiert. In chronischen MS Läsionen sind Olig2<sup>+</sup>-Zellen zu finden. Obwohl die MBP mRNA in diesen Läsionen nachzuweisen ist, kann kein Protein synthetisiert werden. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass in diesen Läsionen die Expression der sncRNA-715 erhöht ist. SncRNA-715 könnte die Translation von MBP verhindern und folglich als Inhibitor der Remyelinisierung während des Krankheitsverlaufs fungieren.

Schwann-Zellen sind die myelinisierenden Zellen im peripheren Nervensystem (PNS). Im Zuge der Myelinisierung wird die MBP mRNA in diesen Gliazellen ebenfalls in die distalen Fortsätze transportiert und dort lokal translatiert und in die Myelinmembran eingebaut (Trapp et al., 1987). Im Gegensatz zum ZNS ist im PNS nur wenig über den Transportmechanismus der mRNA bekannt (Masaki, 2012). Es ist es sehr wahrscheinlich, dass in Schwann-Zellen und Oligodendrozyten die Lokalisation und die translationale Hemmung der MBP mRNA ähnlichen Mechanismen unterliegen. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass hnRNP A2 und sncRNA-715 in Schwann-Zellen exprimiert werden und in zytoplasmatischen Granula-ähnlichen Strukturen lokalisiert sind. Während der Differenzierung dieser Gliazellen *in vivo* und *in vitro* korreliert die Expression der sncRNA-715 invers mit der Synthese des MBP Proteins. HnRNP A2 und sncRNA-715 scheinen

in Schwann-Zellen assoziiert zu sein und könnten wie in Oligodendrozyten den Transport der MBP mRNA vermitteln.

## 7 Summary

Oligodendrocytes play an important role in the central nervous system (CNS) by producing myelin, a multilammellar membrane which insulates the axon and allows saltatory conduction of action potentials at high velocities and limited energy requirements (Nave 2010). Impaired myelin disrupts saltatory nerve conduction leading to nerve degeneration associated with acquired and inherited disorders such as multiple sclerosis (MS) and leukodystrophies. Myelin basic protein (MBP) is the second most abundant myelin protein and is essential for correct CNS myelin formation (Wood et al., 1984). Mediated by the RNA binding protein hnRNP A2, MBP mRNA is transported to oligodendroglial processes in RNA granules in a translationally silenced state. At the axon-glia contact site, MBP is translated into a protein in response to axonal signals (White et al., 2008). The molecular mechanisms controlling MBP protein synthesis are poorly understood. Here we could identify a small non-coding RNA (sncRNA), which regulates MBP mRNA translation in oligodendrocytes by the interaction of its so called “seed region” with the target mRNAs. Experiments with primary oligodendrocytes show that the overexpression of sncRNA-715 leads to a downregulation of MBP protein and the blocking of endogenous sncRNA-715 leads to higher levels of MBP protein. Interestingly, sncRNA-715 expression inversely correlates with MBP protein synthesis in differentiating oligodendrocytes *in vitro* and *in vivo*. Furthermore, we demonstrate that elevated sncRNA-715 levels induce apoptosis and affects cell morphology of primary oligodendrocytes. Furthermore sncRNA-715 is present in cytoplasmic granule-like structures and co-immunoprecipitates with hnRNP A2 containing MBP mRNA transport granules suggesting that sncRNA-715 is involved in translational repression of MBP mRNA during the localization process. Chronic Multiple Sclerosis lesions contain Olig2<sup>+</sup> cells and MBP mRNA, but lack MBP protein. These lesions contain elevated sncRNA-715 levels alluding to a possible role of sncRNA-715 as an inhibitor of remyelination events during the course of disease.

Schwann cells are the myelinating cells in the peripheral nervous system (PNS). The local translation of MBP mRNA at distal sites has also been observed in these glia cells. So far details about the transport mechanism and translational inhibition of MBP mRNA remain elusive in Schwann cells (Masaki, 2012). It is very likely that Schwann cells and oligodendrocytes operate similar transport mechanisms. We could show that sncRNA-715 and hnRNP A2 are expressed by Schwann cells. During the development of these glia cells *in vitro* and *in vivo*, the expression of sncRNA-715 inversely correlates with MBP protein synthesis. Since sncRNA-715 coimmunoprecipitates with hnRNP A2, these components could mediate the transport of the MBP mRNA to the axo-glia contact site in Schwann cells.

## 8 Abkürzungen

Ago	Argonaut
OPC	Oligodendrozyten-Vorläuferzelle (oligodendrocyte precursor cell)
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserum Albumin (Bovine Serum Albumine)
bzw.	beziehungsweise
ca.	zirka
SVZ	Subventrikuläre Zone
CNPase	2', 3'- Cyclic Nucleotide 3'-Phosphodiesterase
d.h.	das heißt
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
dH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAse	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eGFP	enhanced Green Fluorescent Protein
LIF	Leukämie-induzierter Faktor
hnRNP	heterogene nukleäres Ribonukloprotein
MAG	Myelin-associated Glycoprotein
MBP	Myelin basisches Protein
miRNA	mikroRNA
MOBP	Myelin-associated Oligodendrocytic Basic Protein
MOG	Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein
mRNA	Boten-RNA (messenger RNA)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PLP	Proteolipid Protein
PNS	Peripheres Nervensystem
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
qPCR	Quantitative Realtime-PCR
SEM	Standardfehler des Mittelwerts (standard error of the mean)
TAE	Tris-Acetat-EDTA
z.B.	Zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

## 9 Referenzen

- Aggarwal, S., Snaidero, N., Pähler, G., Frey, S., Sánchez, P., Zweckstetter, M., Janshoff, A., Schneider, A., Weil, M.T., Schaap, I.A., Görlich, D., & Simons, M. (2013). Myelin Membrane Assembly Is Driven by a Phase Transition of Myelin Basic Proteins Into a Cohesive Protein Meshwork. (Ben A. Barres, Ed.) *PLoS Biology*, *11*(6): e100157.
- Aggarwal, S., Yurlova, L., & Simons, M. (2011). Central nervous system myelin: structure, synthesis and assembly. *Trends in cell biology*, *21*(10), 585–93.
- Aggarwal, S., Yurlova, L., Snaidero, N., Reetz, C., Frey, S., Zimmermann, J., Pähler, G., Janshoff, A., Friedrichs, J., Müller, D.J., Boebel, C., & Simons, M. (2011). A size barrier limits protein diffusion at the cell surface to generate lipid-rich myelin-membrane sheets. *Developmental cell*, *21*(3), 445–56.
- Ainger, K., Avossa, D., Diana, a S., Barry, C., Barbarese, E., & Carson, J. H. (1997). Transport and localization elements in myelin basic protein mRNA. *The Journal of cell biology*, *138*(5), 1077–87.
- 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. *The Journal of cell biology*, *123*(2), 431–41.
- Aktas, O., Prozorovski, T., & Zipp, F. (2006). Death ligands and autoimmune demyelination. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry*, *12*(4), 305–16.
- Allen, N. J., & Barres, B. A. (2009). Glia — more than just brain glue, *Nature*, *457*(5), 675–677.
- Araque, A., & Navarrete, M. (2010). Glial cells in neuronal network function. *Philosophical transactions of the Royal Society of London*, *365*(1551), 2375–81.
- Arthur-Farraj, P., Wanek, K., Hantke, J., Davis, C. M., Jayakar, A., Parkinson, D. B., Mirsky, R., et al. (2011). Mouse schwann cells need both NRG1 and cyclic AMP to myelinate. *Glia*, *59*(5), 720–33.
- Azevedo, F.A.C., Carvalho, L. R. B., Grinberg, L. T., Farfel, J. M., Ferretti, R. E. L., Leite, R. E. P., Filho, W.J., Lent, R., & Herculano-Houzel, S. (2009). Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. *The Journal of comparative neurology*, *513*(5), 532–541
- Ballabh, P., Braun, A., & Nedergaard, M. (2004). The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiology of disease*, *16*(1), 1–13.
- Barbarese, E., Brumwell, C., Kwon, S., Cui, H., & Carson, J. H. (1999). RNA on the road to myelin. *Journal of neurocytology*, *28*(4-5), 263–70.

- 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. *Journal of cell science*, *108* (8), 2781–90.
- Barbin, G., MS, A., P, C., A, F., M, G., M, S., B, Z., et al. (2004). Axonal cell adhesion molecule L1 in myelination. *Neuron Glia Biol*, *1*(1), 65-72.
- Barca-Mayo, O., & Lu, Q. R. (2012). Fine-Tuning Oligodendrocyte Development by microRNAs. *Frontiers in neuroscience*, *6*(2), 13.
- Baron, W., & Hoekstra, D. (2010). On the biogenesis of myelin membranes: sorting, trafficking and cell polarity. *FEBS letters*, *584*(9), 1760–70.
- Barres, B.A. (2008). The mystery and magic of glia: a perspective on their roles in health and disease. *Neuron*, *60*(3), 430-40
- Barres, B.A., Hart, I. K., Coles, H. S., Burne, J. F., Voyvodic, J. T., Richardson, W. D., & Raff, M. C. (1992). Cell death in the oligodendrocyte lineage. *Journal of neurobiology*, *23*(9), 1221–30.
- Barres, B.A., & Raff, M. C. (1994). Control of oligodendrocyte number in the developing rat optic nerve. *Neuron*, *12*(5), 935–42.
- Barres, B.A., & Raff, M. . (1993). Proliferation of oligodendrocyte precursor cells depends on electric activity in axons. *Nature*, *361*(6409), 258–60.
- Bartel, D.P. (2009). MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*, *136*(2), 215–33.
- Baumann, N., & Pham-Dinh, D. (2001). Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiological reviews*, *81*(2), 871–927.
- Beirowski, B., Gustin, J., Armour, S.M., Yamamoto, H., Viader, A., & North, B. J. (2011). Sir-two-homolog 2 (Sirt2) modulates peripheral myelination through polarity protein Par-3/atypical protein kinase C (aPKC) signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *108*(43), E952-61.
- Belmokhtar, C. (2001). Staurosporine induces apoptosis through both caspase-dependent and caspase-independent mechanisms. *Oncogene*, *20*(26), 3354-3362.
- Bentwich, I., Hillion, J., & Ségal-Bendirdjian, E. (2005). A postulated role for microRNA in cellular differentiation. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *19*(8), 875–9.
- Bernstein, E., Kim, S. Y., Carmell, M. A, Murchison, E. P., Alcorn, H., Li, M. Z., Mills, A. A, et al. (2003). Dicer is essential for mouse development. *Nature genetics*, *35*(3), 215–7.
- Bhatheja, K., & Field, J. (2006). Schwann cells: origins and role in axonal maintenance and regeneration. *The international journal of biochemistry & cell biology*, *38*(12), 1995–9.

- Birchmeier, C., & Nave, K.-A. (2008). Neuregulin-1, a key axonal signal that drives Schwann cell growth and differentiation. *Glia*, *56*(14), 1491–7.
- Boggs, J.M. (2006). Myelin basic protein: a multifunctional protein. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, *63*(17), 1945–61.
- Boggs, J.M., Rangaraj, G., Gao, W., & Heng, Y. (2006). Effect of Phosphorylation of Myelin Basic Protein By MAPK on its Interactions with Actin and Actin Binding to a Lipid Membrane in Vitro,. *Biochemistry* (9), 391–401.
- Boggs, J.M., Rangaraj, G., Heng, Y.-M., Liu, Y., & Harauz, G. (2011). Myelin basic protein binds microtubules to a membrane surface and to actin filaments in vitro: effect of phosphorylation and deimination. *Biochimica et biophysica acta*, *1808*(3), 761–73.
- Bremer, J., O'Connor, T., Tiberi, C., Rehrauer, H., Weis, J., & Aguzzi, A. (2010). Ablation of Dicer from murine Schwann cells increases their proliferation while blocking myelination. *PLoS one*, *5*(8): e12450.
- Brennecke, J., Stark, A., Russell, R. B., & Cohen, S. M. (2005). Principles of MicroRNA – Target Recognition, *PLoS Biol*, *3*(3):e85.
- Brightman, M.W., & Reese, T.S. (1969). Junctions between intimately apposed cell membranes in the vertebrate brain. *The Journal of cell biology*, *40*(3), 648–77.
- Brophy, P.J., Boccaccio, G.L., & Colman, D.R. (1993). The distribution of myelin basic protein mRNAs within myelinating oligodendrocytes. *Trends in neurosciences*, *16*(12), 515–21.
- Brumwell, C. (2002). Intracellular Trafficking of HnRNP A2 in Oligodendrocytes. *Experimental Cell Research*, *279*(2), 310-20.
- Budde, H., Schmitt, S., Fitzner, D., Opitz, L., Salinas-Riester, G., & Simons, M. (2010). Control of oligodendroglial cell number by the miR-17-92 cluster. *Development*, *137*(13), 2127-32
- Bueno, M. J., Pérez de Castro, I., & Malumbres, M. (2008). Control of cell proliferation pathways by microRNAs. *Cell Cycle* *7*(20), 3143-3148.
- Bueno, M. J., & Malumbres, M. (2011). MicroRNAs and the cell cycle. *Biochimica et biophysica acta*, *1812*(5), 592–601.
- Bullock, T. H., Moore, J. K. & Fields, R. D. (1984). Evolution of myelin sheaths: both lamprey and hagfish lack myelin. *Neurosci Lett*, *48*(2):145-8.
- Burgler, C., & Macdonald, P. M. (2005). Prediction and verification of microRNA targets by MovingTargets, a highly adaptable prediction method. *BMC genomics*, *6*(88), 1-11.
- Campana, W. M. (2007). Schwann cells: activated peripheral glia and their role in neuropathic pain. *Brain Behav Immun*, *21*(5), 522–527.



- Capello, E., Voskuhl, R. R., McFarland, H. F., Raine, C. S., & Frcpath, S. (1997). Multiple Sclerosis: Re-expression of a developmental gene in chronic lesions correlates with remyelination. *Ann Neurol*, 41, 797–805.
- Carnegie, P., Dunkley, P., Kemp, B., & Murray, A. (1974). Phosphorylation of selected serine and threonine residues in myelin basic protein by endogenous and exogenous protein kinases. *Nature*, 249, 147–150.
- Carré, J.-L., Goetz, B. D., O'Connor, L. T., Bremer, Q., & Duncan, I. D. (2002). Mutations in the rat myelin basic protein gene are associated with specific alterations in other myelin gene expression. *Neuroscience letters*, 330(1), 17–20.
- Carson, J. H., & Barbarese, E. (2005). Systems analysis of RNA trafficking in neural cells. *Biol Cell*, 97(1), 51-62.
- Carson, J. H., Gao, Y., Tatavarty, V., Levin, M. K., Francone, V. P., Kosturko, L. D., & Maggipinto, M. J. & Barbarese, E. (2009). *Biochim Biophys Acta* 1779(8), 453–458.
- Chang, A., Nishiyama, A., Peterson, J., Prineas, J., & Trapp, B. D. (2000). NG2-positive oligodendrocyte progenitor cells in adult human brain and multiple sclerosis lesions. *J Neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 20(17), 6404–12.
- Chang, L. W., Viader, A., Varghese, N., Payton, J. E., Milbrandt, J. & Nagarajan R. (2013). An integrated approach to characterize transcription factor and microRNA regulatory networks involved in Schwann cell response to peripheral nerve injury. *BMC Genomics*, 14(84),1-20.
- Cazaux, B., Catalan, J., Veyrunes, F., Douzery, E. J. & Britton-Davidian, J. (2011). Are ribosomal DNA clusters rearrangement hotspots?: a case study in the genus *Mus* (Rodentia, Muridae). *BMC Evol Biol*. 11(124), 1-14.
- Chakraborty, G. & Ledeen, R. (2003). Fatty acid synthesizing enzymes intrinsic to myelin. *Brain Res Mol Brain Res*, 112(1-2):46-52.
- Chiang, H. R., Schoenfeld, L. W., Ruby, J. G., Auyeung, V. C., Spies, N., Baek, D., Johnston, W. K., Russ, C., Luo, S., Babiarz, J. E., Belloch, R., Schroth, G. P., Nusbaum, C. & Bartel, D. P. (2010) Mammalian microRNAs: experimental evaluation of novel and previously annotated genes. *Genes Dev*, 24(10):992-1009.
- Chernoff, G. F. (1981). Shiverer: an autosomal recessive mutant mouse with myelin deficiency. *The Journal of heredity*, 72(2), 128.
- 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(11):e7754.
- 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. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 15(11).
- Colman, D. R., Kreibich, G., Frey, a B., & Sabatini, D. D. (1982). Synthesis and incorporation of myelin polypeptides into CNS myelin. *The Journal of cell biology*, 95(2), 598–608.
- Cornell-bell, A, Finkbeiner, SM., Cooper, MS., & Smith, SJ. (1990). Glutamate Induces Calcium waves in cultured astrocytes: Long-Range Glial Signalling. *Science*. 247(4941):470-3.
- Correia, A. C., Costa, M., Moraes, F., Bom, J., Nóvoa, A., & Mallo, M. (2007). Bmp2 is required for migration but not for induction of neural crest cells in the mouse. *Dev Dyn*, 236(9), 2493–501.
- Court, F. A, Sherman, D. L., Pratt, T., Garry, E. M., Ribchester, R. R., Cottrell, D. F., Fleetwood-Walker, S. M., et al. (2004). Restricted growth of Schwann cells lacking Cajal bands slows conduction in myelinated nerves. *Nature*, 431(7005), 191–5.
- Court, F. A., Hendriks, W.T., Macgillavry, H. D., Alvarez, J., and VanMinnen, J.(2008). Schwann cell to axon transfer of ribosomes: toward a novel understanding of the role of glia in the nervous system. *J.Neurosci*. 28, 11024–11029.
- Czaplinski, K., & Singer, R. H. (2006). Pathways for mRNA localization in the cytoplasm. *Trends in biochemical sciences*, 31(12), 687–93.
- 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. *Developmental Cell*, 25(6), 599–609.
- Da Sacco, L., & Masotti, A. (2012). Recent Insights and Novel Bioinformatics Tools to Understand the Role of MicroRNAs Binding to 5' Untranslated Region. *International journal of molecular sciences*, 14(1), 480–95.
- De Faria, O. Jr., Moore, C. S., Kennedy, T. E., Antel, J. P., Bar-Or, A., & Dhaunchak, A. S. (2012). MicroRNA dysregulation in multiple sclerosis. *Frontiers in genetics*, 3(311), 1-6.
- De Monasterio-Schrader, P., Jahn, O., Tenzer, S., Wichert, S. P., Patzig, J., & Werner, H. B. (2012). Systematic approaches to central nervous system myelin. *Cellular and molecular life sciences*, 69(17), 2879–94.
- Desplat-Jego, S., Varriale, S., Creidy, R., Terra, R., Bernard, D., Khrestchatisky, M., Izui, S., Chicheportiche, Y. & Boucraut, J. (2002). TWEAK is expressed by glial cells, induces astrocyte proliferation and increases EAE severity. *J Neuroimmunol*, 133(4) :116–123.
- Ding, Y., & Brunden, K. R. (1994). The cytoplasmic domain of myelin glycoprotein P0 interacts with negatively charged phospholipid bilayers. *The Journal of biological chemistry*, 269(14), 10764–70.

- Du, C., Liu, C., Kang, J., Zhao, G., Ye, Z., Huang, S., Li, Z., et al. (2009). MicroRNA miR-326 regulates TH-17 differentiation and is associated with the pathogenesis of multiple sclerosis. *Nature immunology*, *10*(12), 1252–9.
- Dugas, J. C., Cuellar, T. L., Scholze, A., Ason, B., Ibrahim, A., Emery, B., Zamanian, J. L., et al. (2010). Dicer1 and miR-219 Are required for normal oligodendrocyte differentiation and myelination. *Neuron*, *65*(5), 597–611.
- Dugas, J. C., & Notterpek, L. (2011). MicroRNAs in oligodendrocyte and Schwann cell differentiation. *Developmental neuroscience*, *33*(1), 14–22.
- D’Urso, D., Brophy, P. J., Staugaitis, S. M., Gillespie, C. S., Frey, a B., Stempak, J. G., & Colman, D. R. (1990). Protein zero of peripheral nerve myelin: biosynthesis, membrane insertion, and evidence for homotypic interaction. *Neuron*, *4*(3), 449–60.
- Dyer, C. A., Philibotte, T. M., Billings-Gagliardi, S. & Wolf, M. K. (1995). Cytoskeleton in myelin-basic-protein-deficient shiverer oligodendrocytes. *Dev Neurosci*, *17*(1):53-62.
- Eiring, A. M., Harb, J. G., Neviani, P., Garton, C., Oaks, J. J., Spizzo, R., Liu, S., Schwind, S., Santhanam, R., Hickey, C. J., Becker, H., Chandler, J. C., Andino, R., Cortes, J., Hokland, P., Huettner, C. S., Bhatia, R., Roy, D. C., Liehaber, S. A., Caligiuri, M. A., Marcucci, G., Garzon, R., Croce, C. M., Calin, G. A., & Perrotti, D. (2010). miR-328 Functions as an RNA Decoy to Modulate hnRNP E2 Regulation of mRNA Translation in Leukemic Blasts. *Cell*, *140*(5):652-65.
- Emery, B. (2010). Regulation of oligodendrocyte differentiation and myelination. *Science*, *330*(6005), 779–82.
- Emery, B., Agalliu, D., Cahoy, J. D., Watkins, T. A., Dugas, J. C., Sara, B., Ibrahim, A., Ligon, A., Rowitch, D.H., & Barres B.A. (2010). Myelin-gene Regulatory Factor as a Critical Transcriptional Regulator Required for CNS Myelination, *Cell*, *138*(1), 172–185.
- Esteller, M. (2011). Non-coding RNAs in human disease. *Nature reviews. Genetics*, *12*(12), 861–74.
- Fabian, M. R., Sonenberg, N., & Filipowicz, W. (2010). Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. *Annual review of biochemistry*, *79*, 351–79.
- Fancy, S. P., Zhao, Z., & Franklin R. J. (2004). Increased expression of Nkx2.2 and Olig2 identifies reactive oligodendrocyte progenitor cells responding to demyelination in the adult CNS. *Mol Cell Neurosci*, *27*(3), 247-54.
- Fields, R. D., & Stevens-Graham, B. (2002). New insights into neuron-glia communication. *Science*, *298*(5593), 556–62.
- Filipovic, R., Rakic, S., & Zecevic, N. (2002). Expression of Golli proteins in adult human brain and multiple sclerosis lesions. *Journal of neuroimmunology*, *127*(1-2), 1–12.

- Filipowicz, W., Bhattacharyya, S. N., & Sonenberg, N. (2008). Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nature reviews. Genetics*, *9*(2), 102–114.
- Flynt, A. S., & Lai, E. C. (2008). Biological principles of microRNA-mediated regulation: shared themes amid diversity, *Nat Rev Genet*, *9*(11), 831–842.
- Franklin, R. J. M., & Ffrench-Constant, C. (2008). Remyelination in the CNS: from biology to therapy. *Nature reviews. Neuroscience*, *9*(11), 839–855.
- Freeman, M. R. & Doherty, J. (2006). Glial cell biology in Drosophila and vertebrates. *Trends Neurosci*, *29*(2):82-90.
- Friedman, R. C., Farh, K. K.-H., Burge, C. B., & Bartel, D. P. (2009). Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome research*, *19*(1), 92–105.
- Frühbeis, C., Fröhlich, D., & Krämer-Albers, E.-M. (2012). Emerging roles of exosomes in neuron-glia communication. *Frontiers in physiology*, *3*(4), 119.
- 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 Biology*, *11*(7), e1001604.
- 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*(1): e00027.
- Fünfschilling, U., Supplie, L. M., Mahad, D., Boretius, S., Saab, A. S., Edgar, J., Brinkmann, B. G., et al. (2012). Glycolytic oligodendrocytes maintain myelin and long-term axonal integrity. *Nature*, *485*(7399), 517–521.
- Gallo, V., Zhou, J. M., McBain, C. J., Wright, P., Knutson, P. L., & Armstrong, R. C. (1996). Oligodendrocyte progenitor cell proliferation and lineage progression are regulated by glutamate receptor-mediated K<sup>+</sup> channel block. *The Journal of neuroscience*, *16*(8), 2659–2670.
- Gandhi, R., Healy, B., Gholipour, T., Egorova, S., Musallam, A., Hussain, M. S., Nejad, P., et al. (2013). Circulating MicroRNAs as biomarkers for disease staging in multiple sclerosis. *Annals of neurology*, *72*9–740.
- Gao, Y., Tatavarty, V., Korza, G., Levin, M. K., & Carson, J. H. (2008). Multiplexed Dendritic Targeting of  $\square$  Calcium Calmodulin-dependent Protein Kinase II , Neurogranin , and Activity-regulated Cytoskeleton-associated Protein RNAs by the A2 Pathway, *19*(5), 2311–2327.
- Garbay, B., Heape, a M., Sargueil, F., & Cassagne, C. (2000). Myelin synthesis in the peripheral nervous system. *Progress in neurobiology*, *61*(3), 267–304.

- Garzon, R., Marcucci, G., & Croce, C. M. (2010). Targeting microRNAs in cancer: rationale, strategies and challenges. *Nature reviews. Drug discovery*, 9(10), 775–89.
- Givogri, M. I., Bongarzone, E. R., Schonmann, V., & Campagnoni, A. T. (2001). Expression and regulation of golli products of myelin basic protein gene during in vitro development of oligodendrocytes. *Journal of neuroscience research*, 66(4), 679–90.
- Gokhan, S., Marin-Husstege, M., Yung, S. Y., Fontanez, D., Casaccia-Bonnet, P., & Mehler, M. F. (2005). Combinatorial profiles of oligodendrocyte-selective classes of transcriptional regulators differentially modulate myelin basic protein gene expression. *The Journal of neuroscience*, 25(36), 8311–21.
- Gould, R. M. & Mattingly, G. (1990). Regional localization of RNA and protein metabolism in Schwann cells in vivo. *J Neurocytol*, 19(3):285-301.
- Gould, R. M., Byrd, a L., & Barbarese, E. (1995). The number of Schmidt-Lanterman incisures is more than doubled in shiverer PNS myelin sheaths. *Journal of neurocytology*, 24(2), 85–98.
- Griffiths, I. (1998). Axonal Swellings and Degeneration in Mice Lacking the Major Proteolipid of Myelin. *Science*, 280(5369), 1610–1613.
- Gudz, T. I., Komuro, H., & Macklin, W. B. (2006). Glutamate stimulates oligodendrocyte progenitor migration mediated via an alpha v integrin/myelin proteolipid protein complex. *The Journal of neuroscience*, 26(9), 2458–66.
- Guttman, M., Amit, I., Garber, M., French, C., Lin, M. F., Feldser, D., Huarte, M., Zuk, O., Carey, B. W., Cassady, J. P., Cabili, M. N, Jaenisch, R., Mikkelsen, T. S., Jacks. T., Hacohen, N., Bernstein, B. E., Kellis, M., Regev, A., Rinn, J. L. & Lander, E. S. (2009) Chromatin signature reveals over a thousand highly conserved large non-coding RNAs in mammals. *Nature* 458(7235):223-7.
- Guo, Z.-N., He, S.-Y., Zhang, H.-L., Wu, J., & Yang, Y. (2012). Multiple sclerosis and sexual dysfunction. *Asian journal of andrology*, 14(4), 530–5.
- Han, S. P., Friend, L. R., Carson, J. H., Korza, G., Barbarese, E., Maggipinto, M., Hatfield, J. T., et al. (2010). Differential subcellular distributions and trafficking functions of hnRNP A2/B1 spliceoforms. *Traffic*, 11(7), 886–98.
- Harauz, G., & Boggs, J. M. (2013). Myelin management by the 18.5-kDa and 21.5-kDa classic myelin basic protein isoforms. *Journal of neurochemistry*, 125(3), 334–61.
- Harauz, G., Ladizhansky, V., & Boggs, J. M. (2009). Structural polymorphism and multifunctionality of myelin basic protein. *Biochemistry*, 48(34), 8094–104.
- Hartline, D. K., & Colman, D. R. (2007). Rapid conduction and the evolution of giant axons and myelinated fibers. *Current biology*, 17(1), 29–35.

- Hauw, J. J., Delaère, P., Seilhean, D., & Cornu, P. (1992). Morphology of demyelination in the human central nervous system. *Journal of neuroimmunology*, 40(2-3), 139–52.
- He, L., & Lu, Q. R. (2013). Coordinated control of oligodendrocyte development by extrinsic and intrinsic signaling cues. *Neuroscience bulletin*, 29(2), 129–43.
- He, X., Yu, Y., Awatramani, R., & Lu, Q. R. (2012). Unwrapping myelination by microRNAs. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry*, 18(1), 45–55.
- Henke, J. I., Goergen, D., Zheng, J., Song, Y., Schüttler, C. G., Fehr, C., Jünemann, C., et al. (2008). microRNA-122 stimulates translation of hepatitis C virus RNA. *The EMBO journal*, 27(24), 3300–10.
- Herculano-Houzel, S. (2009). The human brain in numbers: a linearly scaled-up primate brain. *Frontiers in human neuroscience*, 3(31), 1-11.
- Herz, J., Zipp, F., & Siffrin, V. (2010). Neurodegeneration in autoimmune CNS inflammation. *Experimental neurology*, 225(1), 9–17.
- Holz, A., Schaeren-Wiemers, N., Schaefer, C., Pott, U., Colello, R. J., & Schwab, M. E. (1996). Molecular and developmental characterization of novel cDNAs of the myelin-associated/oligodendrocytic basic protein. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 16(2), 467–77.
- Holz, A. & Schwab, M. E. (1997). Developmental expression of the myelin gene MOBP in the rat nervous system. *J.Neurocytol*, 26: 467-77.
- Hu, QD., Ang, BT., Karsak, M., Hu, WP., Cui, XY., Duka, T., Takeda, Y., et al. (2003). F3/contactin acts as a functional ligand for Notch during oligodendrocyte maturation. *Cell*, 115(2), 163–75.
- Huang, J. K., Jarjour, A. A, Nait Oumesmar, B., Kerninon, C., Williams, A., Krezel, W., Kagechika, H., Bauer, J., Zhao, C., Baron-Van Evercooren, A., Chambon, P., Ffrench-Constant, C. & Franklin, R. J. (2011). Retinoid X receptor gamma signaling accelerates CNS remyelination. *Nat Neurosci*, 14(1):45-53.
- Inui, M., Martello, G., & Piccolo, S. (2010). MicroRNA control of signal transduction. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 11(4), 252–63.
- Ishibashi, T., Dakin, K. A., Stevens, B., Lee, P. R., & Fields, R. D. (2006). Astrocytes Promote Myelination in Response to Electrical Impulses, *Neuron* 49(6), 823–832.
- Jahn, O., Tenzer, S., & Werner, H. B. (2009). Myelin proteomics: molecular anatomy of an insulating sheath. *Molecular neurobiology*, 40(1), 55–72.
- Jessen, K R, & Mirsky, R. (1992). Schwann cells: early lineage, regulation of proliferation and control of myelin formation. *Current opinion in neurobiology*, 2(5), 575–81.

- Jessen, K. R. (2004). Glial cells. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 36(10), 1861–7.
- Jessen, K. R., & Mirsky, R. (2005). The origin and development of glial cells in peripheral nerves. *Nature reviews. Neuroscience*, 6(9), 671–82.
- Junker, A., Hohlfeld, R., & Meinl, E. (2011). The emerging role of microRNAs in multiple sclerosis. *Nature reviews. Neurology*, 7(1), 56–9.
- Junker, A., Krumbholz, M., Eisele, S., Mohan, H., Augstein, F., Bittner, R., Lassmann, H., et al. (2009). MicroRNA profiling of multiple sclerosis lesions identifies modulators of the regulatory protein CD47. *Brain : a journal of neurology*, 132(Pt 12), 3342–52.
- Kamholz, J., Toffenetti, J., & Lazzarini, R. a. (1988). Organization and expression of the human myelin basic protein gene. *Journal of neuroscience research*, 21(1), 62–70.
- Karthigasan, J., Garvey, J. S., Ramamurthy, G. V, & Kirschner, D. a. (1996). Immunolocalization of 17 and 21.5 kDa MBP isoforms in compact myelin and radial component. *Journal of neurocytology*, 25(1), 1–7.
- Kassmann, C. M., Mildner, A., Lappe-Siefke, C., Baes, M., Bru, B., Werner, H. B., Natt, O., et al. (2007). Axonal loss and neuroinflammation caused by peroxisome-deficient oligodendrocytes, 39(8), 969–976.
- Keller, A., Leidinger, P., Lange, J., Borries, A., Schroers, H., Scheffler, M., Lenhof, H.-P., et al. (2009). Multiple sclerosis: microRNA expression profiles accurately differentiate patients with relapsing-remitting disease from healthy controls. *PLoS one*, 4(10), e7440.
- Kent, T., Lapik, Y. R. & Pestov, D. G. (2009). The 5' external transcribed spacer in mouse ribosomal RNA contains two cleavage sites. *RNA*, 15(1): 14–20.
- Kettenmann, H. & Ransom, B. (2012). Developmental and functional properties of *Drosophila* glia. *Neuroglia*, 3(2): 17–18.
- Kim, V. N. (2005). MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 6(5), 376–85.
- Kim, V. N., Han, J., & Siomi, M. C. (2009). Biogenesis of small RNAs in animals. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 10(2), 126–39.
- Kimura, M. (1998). Overexpression of a minor component of myelin basic protein isoform 17.2 kDa can restore myelinogenesis in transgenic shiverer mice, *Brain Research*; 785; 245-252.
- Kirschner, D., & Ganser, A. (1980). Compact myelin exists in the absence of basic protein in the shiverer mutant mouse. *Nature*, 283(10), 207–210.

- Klugmann, M., Schwab, M. H., Pühlhofer, a, Schneider, a, Zimmermann, F., Griffiths, I. R., & Nave, K. a. (1997). Assembly of CNS myelin in the absence of proteolipid protein. *Neuron*, 18(1), 59–70.
- 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, *Molecular biology of the cell*, 17, 3521-3533.
- 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. *Molecular Biology of the cell*, 16, 1938-1947 .
- Kozomara, A., & Griffiths-Jones, S. (2011). miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic acids research*, 39 (Database issue):D152-7.
- Krichevsky, A. M., Sonntag, K.-C., Isacson, O., & Kosik, K. S. (2006). Specific microRNAs modulate embryonic stem cell-derived neurogenesis. *Stem cells*, 24(4):857-64.
- Krol, J., Loedige, I., & Filipowicz, W. (2010). The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nature reviews. Genetics*, 11(9), 597–610.
- Krämer, E. M., Schardt, a, & Nave, K. A. (2001). Membrane traffic in myelinating oligodendrocytes. *Microscopy research and technique*, 52(6), 656–71.
- Krämer-Albers, E., Gehrig-burger, K., Thiele, C., Trotter, J., & Nave, K. (2006). Perturbed Interactions of Mutant Proteolipid Protein / DM20 with Cholesterol and Lipid Rafts in Oligodendroglia : Implications for Dysmyelination in Spastic Paraplegia, *J Neurosci*, 26(45), 11743–11752.
- Krämer-Albers, E.-M., Bretz, N., Tenzer, S., Winterstein, C., Möbius, W., Berger, H., Nave, K.-A., et al. (2007). Oligodendrocytes secrete exosomes containing major myelin and stress-protective proteins: Trophic support for axons? *Proteomics. Clinical applications*, 1(11), 1446–61.
- Krämer-Albers, E.-M., & White, R. (2011). From axon-glia signalling to myelination: the integrating role of oligodendroglial Fyn kinase. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 68(12), 2003–12.
- Kwiecien, J. M., O'Connor, L. T., Goetz, B. D., Delaney, K. H., Fletch, a L., & Duncan, I. D. (1998). Morphological and morphometric studies of the dysmyelinating mutant, the Long Evans shaker rat. *Journal of neurocytology*, 27(8), 581–91.
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Yalcin, A., Meyer, J., Lendeckel, W., & Tuschl, T. (2002). Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Current biology : CB*, 12(9), 735–9.



- Lai, E. C. (2002). Micro RNAs are complementary to 3' UTR sequence motifs that mediate negative post-transcriptional regulation. *Nature genetics*, 30(4), 363–4.
- Lappe-Siefke, C., Goebbels, S., Gravel, M., Nicksch, E., Lee, J., Braun, P. E., Griffiths, I. R., et al. (2003). Disruption of Cnp1 uncouples oligodendroglial functions in axonal support and myelination. *Nat Genet.* 33(3):366-74.
- Larocque, D., Fragoso, G., Huang, J., Mushynski, W. E., Loignon, M., Richard, S., & Almazan, G. (2009). The QKI-6 and QKI-7 RNA binding proteins block proliferation and promote Schwann cell myelination. *PLoS one*, 4(6), e5867.
- Lau, P., Verrier, J. D., Nielsen, J. a, Johnson, K. R., Notterpek, L., & Hudson, L. D. (2008). Identification of dynamically regulated microRNA and mRNA networks in developing oligodendrocytes. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 28(45), 11720–30.
- Laursen, L.S., Chan, C.W., and Ffrench-Constant, C. (2009). An integrin-contactin complex regulates CNS myelination by differential Fyn phosphorylation. *J Neurosci* 29, 9174-9185.
- Laursen, L. S., Chan, C. W., & Ffrench-Constant, C. (2011). Translation of myelin basic protein mRNA in oligodendrocytes is regulated by integrin activation and hnRNP-K. *The Journal of cell biology*, 192(5), 797–811.
- Lee, G., Dallas, S., Hong, M., & Bendayan, R. (2001). Drug transporters in the central nervous system: brain barriers and brain parenchyma considerations. *Pharmacological reviews*, 53(4), 569–96.
- Lee, P. R., & Fields, R. D. (2009). Regulation of myelin genes implicated in psychiatric disorders by functional activity in axons. *Front Neuroanat*, 3(4), 1-8.
- Lee, R. C., Feinbaum, R. L., & Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75(5), 843–54.
- Lee, S., Chong, S. Y. C., Tuck, S. J., Corey, J. M., & Chan, J. R. (2012). A rapid and reproducible assay for modeling myelination by oligodendrocytes using engineered nanofibers. *Nature Protocols*, 8(4), 771–782.
- Lee, S., Leach, M. K., Redmond, S. A., Chong, S. Y. C., Mellon, H., Tuck, S. J., Feng, Z., et al. (2013). A rapid and reproducible assay for modeling myelination by oligodendrocytes using engineered nanofibers. *Nat Protoc.* (9), 917–922.
- Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K.-H., Lee, S., Baek, S. H., & Kim, V. N. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO journal*, 23(20), 4051–60.
- Letzen, B. S., Liu, C., Thakor, N. V., Gearhart, J. D., All, A. H., & Kerr, C. L. (2010). MicroRNA Expression Profiling of Oligodendrocyte Differentiation from Human Embryonic Stem Cells. (R. Linden, Ed.) *PLoS ONE*, 5(5): e10480.

- Li, C., Xiao, L., Liu, X., Yang, W., Shen, W., Hu, C., Yang, G., et al. (2013). A functional role of NMDA receptor in regulating the differentiation of oligodendrocyte precursor cells and remyelination. *Glia*, *61*(5), 732–49.
- Li, Z., Zhang, Y., Li, D., & Feng, Y. (2000). Destabilization and mislocalization of myelin basic protein mRNAs in quaking dysmyelination lacking the QKI RNA-binding proteins. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, *20*(13), 4944–53.
- Liem, K. F., Tremml, G., Roelink, H., & Jessell, T. M. (1995). Dorsal Differentiation of Neural Plate Cells Induced by BMP-Mediated Signals from Epidermal Ectoderm, *Cell*, *82*, 969–979.
- Lu, L., Sun, K., Chen, X., Zhao, Y., Wang, L., Zhou, L., Sun, H., & Wang, H. (2013) Genome-wide survey by ChIP-seq reveals YY1 regulation of lincRNAs in skeletal myogenesis. *EMBO Journal*, (2013), 1–14.
- Lu, J., & Tsourkas, A. (2009). Imaging individual microRNAs in single mammalian cells in situ. *Nucleic acids research*, *37*(14): e100.
- Lu, M., Zhang, Q., Deng, M., Miao, J., Guo, Y., Gao, W., & Cui, Q. (2008). An analysis of human microRNA and disease associations. *PLoS one*, *3*(10), e3420.
- Lu, Z., Ku, L., Chen, Y., & Feng, Y. (2005). Developmental abnormalities of myelin basic protein expression in fyn knock-out brain reveal a role of Fyn in posttranscriptional regulation. *The Journal of biological chemistry*, *280*(1), 389–95.
- Lucchinetti, C., Brück, W., Parisi, J., Scheithauer, B., Rodriguez, M., & Lassmann, H. (1999). A quantitative analysis of oligodendrocytes in multiple sclerosis lesions. A study of 113 cases. *Brain : a journal of neurology*, *122*; 2279–95.
- 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*, *138*(7), 854–858.
- Martin, R., McFarland, H. F., & McFarlin, D. E. (1992). Immunological aspects of demyelinating diseases. *Annual review of immunology*, *10*, 153–87.
- Martini, R., & Schachner, M. (1997). Molecular bases of myelin formation as revealed by investigations on mice deficient in glial cell surface molecules. *Glia*, *19*(4), 298–310.
- Masaki, T. (2012). Polarization and myelination in myelinating glia. *ISRN neurology*, e769412, 1-28.
- Mattick, J. S., & Makunin, I. V. (2006). Non-coding RNA. *Human molecular genetics*, *15*(1), 17–29.

- Mazan-Mamczarz, K., Lal, A., Martindale, J. L., Kawai, T., & Gorospe M. (2006). Translational repression by RNA-binding protein TIAR. *Mol Cell Biol.* 26(7):2716-27.
- Miller, R. H. (2002). Regulation of oligodendrocyte development in the vertebrate CNS. *Progress in neurobiology*, 67(6), 451–67.
- Miron, V. E., Kuhlmann, T., & Antel, J. P. (2011). Cells of the oligodendroglial lineage, myelination, and remyelination. *Biochimica et biophysica acta*, 1812(2), 184–93.
- Mirsky, R., Woodhoo, A., Parkinson, D. B., & Arthur-farraj, P. (2008). Novel signals controlling embryonic Schwann cell development , myelination and dedifferentiation, *Journal of the Peripheral Nervous System*, 135(2), 122–135.
- 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(6):479-87.
- Moser, J. J., & Fritzler, M. J. (2010). Cytoplasmic ribonucleoprotein (RNP) bodies and their relationship to GW/P bodies. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 42(6), 828–43.
- Munro, T. P. (1999). Mutational Analysis of a Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein A2 Response Element for RNA Trafficking. *Journal of Biological Chemistry*, 274(48), 34389–34395.
- Miyoshi, K., Miyoshi, T. & Siomi, H. (2010). Many ways to generate microRNA-like small RNAs: non-canonical pathways for microRNA production. *Mol Genet Genomics*, 284(2):95-103.
- Naguibneva, I., Ameyar-Zazoua, M., Nonne, N., Poleskaya, A, Ait-Si-Ali, S., Groisman, R., Souidi, M., et al. (2006). An LNA-based loss-of-function assay for micro-RNAs. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 60(9), 633–8.
- Nave, K.-A. (2010a). Myelination and support of axonal integrity by glia. *Nature*, 468(7321), 244–52.
- Nave, K.-A. (2010b). Myelination and the trophic support of long axons. *Nature reviews. Neuroscience*, 11(4), 275–83.
- Nave, K.-A., & Salzer, J. L. (2006). Axonal regulation of myelination by neuregulin 1. *Current opinion in neurobiology*, 16(5), 492–500.
- Nave, K.-A., & Trapp, B. D. (2008). Axon-glia signaling and the glial support of axon function. *Annual review of neuroscience*, 31, 535–61.
- Nedergaard, M., Rodríguez, J. J., & Verkhratsky, A. (2010). Glial calcium and diseases of the nervous system. *Cell calcium*, 47(2), 140–9.

- Noseworthy, J., Lucchinetti, C., Rodriguez, M., & Weinshenker, B. (2000). Multiple sclerosis. *N Engl J Med.*, 28(343), 938–52.
- Ostareck-Lederer, A., Ostareck, D. H., Cans, C., Neubauer, G., Bomsztyk, K., Superti-furga, G., & Hentze, M. W. (2002). c-Src-Mediated Phosphorylation of hnRNP K Drives Translational Activation of Specifically Silenced mRNAs, *Molecular and Cellular Biology*, 22(13), 4535–4543. 35
- O'Carroll, D., & Schaefer, A. (2013). General principals of miRNA biogenesis and regulation in the brain. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 38(1), 39–54.
- Ortega, F., Gascón, S., Masserdotti, G., Deshpande, A., Simon, C., Fischer, J., Dimou, L., Chichung Lie, D., Schroeder, T. & Berninger, B. (2013), Oligodendroglial and neurogenic adult subependymal zone neural stem cells constitute distinct lineages and exhibit differential responsiveness to Wnt signalling. *Nat Cell Biol*, 15(6):602-13.
- Paez, P. M., Cheli, V. T., Ghiani, C. A, Spreuer, V., Handley, V. W., & Campagnoni, A. T. (2012). Golli myelin basic proteins stimulate oligodendrocyte progenitor cell proliferation and differentiation in remyelinating adult mouse brain. *Glia*, 60(7), 1078–93.
- 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. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 27(46), 12690–9.
- Panguluri, S. K., Bhatnagar, S., Kumar, A., McCarthy, J. J., Srivastava, A. K., Cooper, N. G., Lundy, R. F. & Kumar, A. (2010). Genomic profiling of messenger RNAs and microRNAs reveals potential mechanisms of TWEAK-induced skeletal muscle wasting in mice. *PLoS One*, 5(1):e8760.
- Paolicelli, R. C., Bolasco, G., Pagani, F., Maggi, L., Scianni, M., Panzanelli, P., Giustetto, M., et al. (2011). Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science (New York, N.Y.)*, 333(6048), 1456–8.
- Papioannou, M. D., Lagarrigue, M., Vejnar, C. E., Rolland, A. D., Kühne, F., Aubry, F., Schaad, O., Fort, A., Descombes, P., Neerman-Arbez, M., Guillou, F., Zdobnov, E. M., Pineau, C. & Nef, S (2011). Loss of Dicer in Sertoli cells has a major impact on the testicular proteome of mice. *Mol Cell Proteomics*, 10(4):M900587MCP200.
- Patzig, J., Jahn, O., Tenzer, S., Wichert, S. P., De Monasterio-Schrader, P., Rosfa, S., Kuharev, J., et al. (2011). Quantitative and integrative proteome analysis of peripheral nerve myelin identifies novel myelin proteins and candidate neuropathy loci. *The Journal of neuroscience*, 31(45), 16369–86.
- Pedraza, L., Fidler, L., Staugaitis, S. M., & Colman, D. R. (1997). The active transport of myelin basic protein into the nucleus suggests a regulatory role in myelination. *Neuron*, 18(4), 579–89.

- Pennisi, E. (2010). Shining a Light on the Genome ' s “ Dark Matter ”. *Science*, 330 (6011), 1614.
- Peters, A. (2003). The effects of normal aging on myelin and nerve fibers, *J Neurocytol.*, 581–593.
- Peters, L., & Meister, G. (2007). Argonaute proteins: mediators of RNA silencing. *Molecular cell*, 26(5), 611–23.
- Pfeiffer, S. E., Warrington, A. E., & Bansal, R. (1993). The oligodendrocyte and its many cellular processes. *Trends in cell biology*, 3(6), 191–7.
- Pham-dinh, D., Boespflug-tanguy, O., Mimault, C., Cavagna, A., Giraud, G., Leberre, G., Lemarec, B., et al. (1993). Pelizaeus-Merzbacher disease: a frameshift deletion / insertion event in the myelin proteolipid gene. *Human Molecular Genetics*, 2(4), 465–467.
- Poliak, S., & Peles, E. (2003). The local differentiation of myelinated axons at nodes of Ranvier. *Nat Rev Neurosci*, 4(12), 968–80.
- Popko, B. (2003). Notch signaling: a rheostat regulating oligodendrocyte differentiation? *Developmental cell*, 5(5), 668–9.
- Prinz-Hadad, H., Mizrachi, T., Irony-Tur-Sinai, M., Prigozhina, T. B., Aronin, A., Brenner, T. & Dranitzki-Elhalel, M. (2013). Amelioration of autoimmune neuroinflammation by the fusion molecule Fn14·TRAIL. *J Neuroinflammation*, 10(36).
- Privat, A., & Jacque, C. (1979). Absence of the myjor dense line in myelin of the mutant mouse *Shiverer*. *Neuroscience Letters*, 12 (1979) 107-112.
- Quarles, R. H. (2002). Myelin sheaths: glycoproteins involved in their formation , maintenance and degeneration. *Cell Mol Life Sci*, 59(11), 1851–1871.
- Quarles, R. H., Macklin, W. B., & Morell, P. (2006). Myelin Formation, Structure and Biochemistry. *Basic Neurochemistry*, 51–72.
- Raff, M. C. ., Barres, B. A. ., Burne, J. F. ., Coles, H. S. ., Ishizaki, Y., & Jacobson, M. D. (1993). Programmed cell death and the control of cell survival: lessons from the nervous sytem. *Science*, 262(29), 695–700.
- Readhead, C., & Hood, L. (1990). The Dysmyelinating Mouse Mutations *Shiverer* (*shi*) and Myelin Deficient (*shi<sup>mild</sup>*), 20(2), 213–234.
- Readhead, C., Popko, B., Takahashi, N., Shine, H. D., Saavedra, R. a, Sidman, R. L., & Hood, L. (1987). Expression of a myelin basic protein gene in transgenic shiverer mice: correction of the dysmyelinating phenotype. *Cell*, 48(4), 703–12.

- Rehmsmeier, M., Steffen, P., Höchsmann, M., & Giegerich, R. (2004). Fast and effective prediction of microRNA/target duplexes. *RNA*, *10*(10), 1507-1517.
- Richardson, W. D., Kessaris, N., & Pringle, N. (2006). Oligodendrocyte wars. *Nature reviews. Neuroscience*, *7*(1), 11-8.
- Roberson, M.D., Toews, A.D., Goodrum, J.F., and Morell, P. (1992). Neurofilament and tubulin mRNA expression in Schwann cells. *J. Neurosci. Res.* *33*, 156-162.
- Rosenbluth, J. (1980a). Peripheral myelin in the mouse mutant Shiverer. *The Journal of comparative neurology*, *193*(3), 729-39.
- Rosenbluth, J. (1980b). Central myelin in the mouse mutant shiverer. *The Journal of comparative neurology*, *194*(3), 639-48.
- Ruvkun, G. (2001). Molecular biology. Glimpses of a tiny RNA world. *Science*, *294*(5543), 797-9.
- Schmittgen, T. D., Lee, E. J., Jiang, J., Sarkar, A., Yang, L., Elton, T. S., & Chen, C. (2008). Real-time PCR quantification of precursor and mature microRNA. *Methods*, *44*(1), 31-8.
- Schulz, P., Cruz, T. F., & Moscarello, M. A. (1988). Endogenous phosphorylation of basic protein in myelin of varying degrees of compaction. *Biochemi*, *27*(20), 7793-7799.
- Shah, A. A., Leidinger, P., Keller, A., 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*(4):637-43.
- Shav-Tal, Y., & Singer, R. H. (2005). RNA localization. *Journal of cell science*, *118*(18), 4077-81.
- Sherman, D. L., & Brophy, P. J. (2005). Mechanisms of axon ensheathment and myelin growth. *Nature reviews. Neuroscience*, *6*(9), 683-90.
- Shimakami, T., Yamane, D., Jangra, R. K., Kempf, B. J., Spaniel, C., Barton, D. J., & Lemon, S. M. (2012). Stabilization of hepatitis C virus RNA by an Ago2-miR-122 complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(3), 941-6.
- Shin, D., Shin, J.-Y., McManus, M. T., Ptáček, L. J., & Fu, Y.-H. (2009). Dicer ablation in oligodendrocytes provokes neuronal impairment in mice. *Annals of neurology*, *66*(6), 843-57.
- Simons, M., & Lyons, D. a. (2013). Axonal selection and myelin sheath generation in the central nervous system. *Current opinion in cell biology*, *25*(4), 512-9.
- Simons, M., Snaidero, N., & Aggarwal, S. (2012). Cell polarity in myelinating glia: from membrane flow to diffusion barriers. *Biochimica et biophysica acta*, *1821*(8), 1146-53.

- Simons, M., & Trajkovic, K. (2006). Neuron-glia communication in the control of oligodendrocyte function and myelin biogenesis. *Journal of cell science*, *119*(21), 4381–9.
- Simons, M., & Trotter, J. (2007). Wrapping it up: the cell biology of myelination. *Current opinion in neurobiology*, *17*(5), 533–40.
- Siomi, M. C., Eder, P. S., Kataoka, N., Wan, L., Liu, Q., & Dreyfuss, G. (1997). Transportin-mediated nuclear import of heterogeneous nuclear RNP proteins. *The Journal of cell biology*, *138*(6), 1181–92.
- Smith, G. S. T., Avila, M. De, Paez, P. M., Spreuer, V., Wills, M. K. B., Jones, N., Boggs, J. M., et al. (2012). Proline Substitutions and Threonine Pseudophosphorylation of the SH3 Ligand of 18.5-kDa Myelin Basic Protein Decrease Its Affinity for the Fyn-SH3 Domain and Alter Process Development and Protein Localization in Oligodendrocytes; *J Neurosci Res.*; *90*(1): 28–47
- Smith, G. S. T., Homchaudhuri, L., Boggs, J. M., & Harauz, G. (2012). Classic 18.5- and 21.5 kDa myelin basic protein isoforms associate with cytoskeletal and SH3-domain proteins in the immortalized N19-oligodendroglial cell line stimulated by phorbol ester and IGF-1. *Neurochemical research*, *37*(6), 1277–95.
- Smith, G. S. T., Paez, P. M., Spreuer, V., Campagnoni, C. W., Boggs, J. M., Campagnoni, A. T., & Harauz, G. (2011). Classical 18.5- and 21.5-kDa isoforms of myelin basic protein inhibit calcium influx into oligodendroglial cells, in contrast to golli isoforms. *Journal of neuroscience research*, *89*(4), 467–80.
- Smith, G. S. T., Samborska, B., Hawley, S. P., Klaiman, J. M., Todd, E., Jones, N., Boggs, J. M., et al. (2013). A Nucleus-Localized 21.5-kDa Myelin Basic Protein Promotes Oligodendrocyte Proliferation and Enhances Neurite Outgrowth in Coculture, Unlike The Plasma Membrane-Associated 18.5-kDa Isoform. *J Neurosci Res.*; *91*(3): 349–362
- Smith-Slatas, C., & Barbarese, E. (2000). Myelin basic protein gene dosage effects in the PNS. *Molecular and cellular neurosciences*, *15*(4), 343–54.
- Soulet, D., & Rivest, S. (2008). Microglia. *Current biology*, *18*(12), R506–8.
- Staugaitis, S. M., Smith, P. R., & Colman, D. R. (1990). Expression of myelin basic protein isoforms in nonglial cells. *The Journal of cell biology*, *110*(5), 1719–27.
- Stewart, H. J., Morgan, L., Jessen, K. R., & Mirsky, R. (1993). Changes in DNA synthesis rate in the Schwann cell lineage in vivo are correlated with the precursor--Schwann cell transition and myelination. *The European journal of neuroscience*, *5*(9), 1136–44.
- Suresh, S., Wang, C., Nanekar, R., Kursula, P., & Edwardson, J. M. (2010). Myelin basic protein and myelin protein 2 act synergistically to cause stacking of lipid bilayers. *Biochemistry*, *49*(16), 3456–63.

- Takada, S., Berezikov, E., Choi, Y. L., Yamashita, Y. & Mano, H. (2009). Potential role of miR-29b in modulation of Dnmt3a and Dnmt3b expression in primordial germ cells of female mouse embryos. *RNA*, 15(8):1507-14.
- Taveggia, C., Feltri, M. L., & Wrabetz, L. (2010). Signals to promote myelin formation and repair. *Nature reviews. Neurology*, 6(5), 276–87.
- Taveggia, C., Zanazzi, G., Petrylak, A., Yano, H., Rosenbluth, J., Einheber, S., Xu, X., et al. (2005). Neuregulin-1 type III determines the ensheathment fate of axons. *Neuron*, 47(5), 681–94.
- Thomson, D. W., Bracken, C. P., & Goodall, G. J. (2011). Experimental strategies for microRNA target identification. *Nucleic acids research*, 39(16), 6845–53.
- Toy, D., & Namgung, U. (2013). Role of glial cells in axonal regeneration. *Experimental neurobiology*, 22(2), 68–76.
- 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(21), 7773–7.
- Trotter, J., Karram, K., & Nishiyama, A. (2010). NG2 cells: Properties, progeny and origin. *Brain research reviews*, 63(1-2), 72–82.
- Ullian, E. M., Sapperstein, S. K., Christopherson, K. S., & Barres, B. a. (2001). Control of synapse number by glia. *Science*, 291(5504), 657–61.
- Ulitsky, I. & Bartel, D. P. (2013) lincRNAs: Genomics, Evolution, and Mechanisms. *Cell*, 145(1), 26-46.
- Vella, M. C., Choi, E., Lin, S., Reinert, K., & Slack, F. J. (2004). The *C. elegans* microRNA let-7 binds to imperfect let-7 complementary sites from the lin-41 3' UTR. *Genes Dev*, 18(2), 132–137.
- Verrier, J. D., Lau, P., Hudson, L., Murashov, A. K., Renne, R., & Notterpek, L. (2009). Peripheral myelin protein 22 is regulated post-transcriptionally by miRNA-29a. *Glia*, 57(12), 1265–79.
- Várallyay, E., Burgyán, J., & Havelda, Z. (2008). MicroRNA detection by northern blotting using locked nucleic acid probes. *Nature protocols*, 3(2), 190–6.
- Viader, A., Chang, L. W., Fahrner, T., Nagarajan, R., & Milbrandt, J. (2011). MicroRNAs Modulate Schwann Cell Response to Nerve Injury by Reinforcing Transcriptional Silencing of Dedifferentiation-Related Genes. *J Neurosci*, 31(48):17358-69.
- Waehneltdt, T. V., Matthieu, J. M. & Jeserich, G. (1986). Appearance of Myelin proteins during vertebrate evolution. *Neurochem Int*, 9(4):463-74.



- Wake, H., Lee, P. R., & Fields, R. D. (2011). Control of Local Protein Synthesis and Initial Events in Myelination by Action Potentials. *Science*, 333(6049), 1647–1651.
- Wang, E., & Cambi, F. (2012). MicroRNA expression in mouse oligodendrocytes and regulation of proteolipid protein gene expression. *Journal of neuroscience research*, 90(9), 1701–12.
- Wang, Y., Lacroix, G., Haines, J., Doukhanine, E., Almazan, G., & Richard, S. (2010). The QKI-6 RNA binding protein localizes with the MBP mRNAs in stress granules of glial cells. *PLoS one*, 5(9): e12824.
- Watabe, K., Fukuda, T., Tanaka, J., Honda, H., Toyohara, K., & Sakai, O. (1995). Spontaneously Immortalizes Mouse Schwann Cells Secrete Autocrine and Paracrine Growth-Promoting Activities. *Journal of Neuroscience*, 41(2), 279-290.
- Watkins, T. a, Emery, B., Mulinyawe, S., & Barres, B. a. (2008). Distinct stages of myelination regulated by gamma-secretase and astrocytes in a rapidly myelinating CNS coculture system. *Neuron*, 60(4), 555–69.
- White, R., Gonsior, C., Bauer, N. M., Krämer-Albers, E.-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 (MBP) synthesis. *J Biol Chem*, 287(3), 1742–54.
- White, R., Gonsior, C., Krämer-Albers, E.-M., Stöhr, N., Hüttelmaier, S., & Trotter, J. (2008). Activation of oligodendroglial Fyn kinase enhances translation of mRNAs transported in hnRNP A2-dependent RNA granules. *The Journal of cell biology*, 181(4), 579–86.
- Wei, H., Zhou, B., Zhang, F., Tu, Y., Hu, Y., Zhang, B. & Zhai, Q. (2013). Profiling and Identification of Small rDNA-Derived RNAs and Their Potential Biological Functions, *PLoS ONE* 8(2): e56842.
- Winterstein, C., Trotter, J., & Krämer-Albers, E.-M. (2008). Distinct endocytic recycling of myelin proteins promotes oligodendroglial membrane remodeling. *Journal of cell science*, 121(6), 834–42.
- Wood, D. D., Vella, G. J., & Moscarello, M. a. (1984). Interaction between human myelin basic protein and lipophilin. *Neurochemical research*, 9(10), 1523–31.
- Yamamoto, Y., Yoshikawa, H., Nagano, S., Kondoh, G., Sadahiro, S., Gotow, T., Yanagihara T. & Sakoda S. (1999). Myelin-associated oligodendrocytic basic protein is essential for normal arrangement of the radial component in central nervous system myelin. *Eur J Neurosci* 11: 847-55.
- Ye, P., Bagnell, R., & D’Ercole, a J. (2003). Mouse NG2+ oligodendrocyte precursors express mRNA for proteolipid protein but not its DM-20 variant: a study of laser microdissection-captured NG2+ cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 23(11), 4401–5.

- Zalc, B. The acquisition of myelin: a success story.(2006). *Novartis Found Symp*,76:15-21; discussion 21-5, 54-7, 275-81.
- Zhang, Y., Lu, Z., Ku, L., Chen, Y., Wang, H., & Feng, Y. (2003). Tyrosine phosphorylation of QKI mediates developmental signals to regulate mRNA metabolism. *The EMBO journal*, 22(8), 1801–10.
- Zhao, L., Tian, D., Xia, M., Macklin, W. B., & Feng, Y. (2006). Rescuing qkV dysmyelination by a single isoform of the selective RNA-binding protein QKI. *J Neurosci*, 26(44), 11278–86.
- Zhao, X., He, X., Han, X., Yu, Y., Ye, F., Chen, Y., Hoang, T., et al. (2010). MicroRNA-mediated control of oligodendrocyte differentiation. *Neuron*, 65(5), 612–26.
- Zuchero, J. B., & Barres, B. a. (2013). Intrinsic and extrinsic control of oligodendrocyte development. *Current opinion in neurobiology*, 23 (3), 1–7.







