
Dissertation

Anke Feldmann

2009

Funktionelle Rolle von SNARE-Proteinen bei der Myelinisierung

Dissertation

zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

am Fachbereich Biologie

der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

von

Anke Feldmann

geboren am 20.09.1980 in Koblenz

Mainz, 2009

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	2
2.1	Oligodendrozyten	2
2.1.1	Funktionen im Zentralen Nervensystem	2
2.1.2	Herkunft und Differenzierung	3
2.2	Myelin	4
2.2.1	Struktureller Aufbau	4
2.2.2	Biochemische Zusammensetzung	5
2.2.3	Proteolipid Protein (PLP)	9
2.3	Myelinisierung	10
2.4	Sortierung von Myelinkomponenten	11
2.5	Vesikulärer Transport	12
2.5.1	Die SNARE-Hypothese	12
2.5.2	Klassifizierung der SNAREs	13
2.5.3	Der SNARE-Zyklus	14
2.5.4	SNARE-Lokalisierung	14
2.5.5	SNARE-Spezifität	17
2.5.6	Regulatorische Proteine	17
2.5.6.1	<i>Tethering</i> -Faktoren	17
2.5.6.2	SM-Proteine	18
2.5.6.3	Rab-Proteine	18
2.5.6.4	Sonstige Regulatoren	18
2.5.6.5	NSF und α -SNAP	19
2.5.7	Clostridiale Neurotoxine	19
2.6	Fragestellung der Arbeit	20
3	Material und Methoden	21
3.1	Materialien	21
3.1.1	Zentrifugen und Zubehör	21
3.1.2	Mikroskope	21
3.1.3	Sonstige Geräte	21
3.1.4	Software	21

3.1.5	Chemikalien	22
3.1.6	Kits	22
3.1.7	Restriktionsenzyme	22
3.1.8	Marker	22
3.2	Puffer und Nährmedien	23
3.2.1	Zellkultur	23
3.2.2	Molekularbiologie	23
3.2.3	Proteinbiochemie	23
3.3	Antikörper	25
3.3.1	Primäre Antikörper	25
3.3.2	Sekundäre Antikörper	26
3.4	Plasmide	27
3.4.1	VAMP3-Plasmid	27
3.4.2	VAMP7-Plasmide	27
3.4.3	Syntaxin-Plasmide	28
3.4.4	PLP-Plasmid	28
3.4.5	PLP-eGFP-Plasmid zur Herstellung der stabilen Zell-Linie	29
3.4.6	Tetanustoxin-Plasmide	29
3.5	Primer	30
3.6	Sonden	30
3.7	<i>Small interfering RNAs</i>	30
3.8	Zellkultur	31
3.8.1	Präparation primärer Oligodendrozyten	31
3.8.1.1	Präparation der Gehirne	31
3.8.1.2	Neuronenkill und Abklopfen der Makrophagen	31
3.8.1.3	Oligodendrozyten- <i>Shake</i>	31
3.8.2	Die Zell-Linien Oli-neu und Oli-neu PLP-eGFP	32
3.8.2.1	Passagieren, Einfrieren und Auftauen	32
3.8.3	Transiente Transfektion von Plasmiden	33
3.8.3.1	Elektroporation	33
3.8.3.2	AMAXA Nukleofektion	33
3.8.4	Transfektion von <i>small interfering RNAs</i> mittels AMAXA Nukleofektion	33
3.8.5	Natriumbutyrat und dbcAMP	34
3.9	Molekularbiologie	35
3.9.1	Transformation	35

3.9.2	Isolierung von Plasmid-DNA	35
3.9.3	Restriktionsverdau	35
3.9.4	Agarose-Gelelektrophorese	35
3.9.5	RNA-Isolierung	36
3.9.6	cDNA-Synthese	36
3.9.7	Quantitative <i>Real-Time-PCR</i>	36
3.9.8	Konzentrationsbestimmung von DNA- oder RNA-Lösungen	36
3.10	Proteinbiochemie	37
3.10.1	Zellaufschluss und Herstellung eines kernfreien Überstandes	37
3.10.1.1	Gehirn-Lysate	37
3.10.1.2	Triton-Lyse	37
3.10.1.3	<i>Cellcracker</i>	37
3.10.2	Subzelluläre Fraktionierung	38
3.10.2.1	Isolierung der Plasmamembran	38
3.10.2.2	Myelinpräparation	39
3.10.3	Co-Immunpräzipitation	39
3.10.4	Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen	40
3.10.5	SDS-PAGE und Westernblot	41
3.10.5.1	Ponceau-S Färbung	42
3.10.5.2	Silberfärbung	42
3.10.5.3	Immundetektion	42
3.10.6	Immunfluoreszenz	43
3.10.7	Mikroskopie und Auswertung der Translokationsstudien	43
3.10.8	Antikörper-Endozytose	44
3.10.9	Zell-ELISA	44
3.11	Statistik	45
4	Ergebnisse	46
4.1	<i>In vitro</i> -Modelle zur Analyse des vesikulären Transports	46
4.2	Expression der SNARE-Proteine während der oligodendroglialen Differenzierung	46
4.3	Expression der SNARE-Proteine in Gehirnlysaten und in isoliertem Myelin unterschiedlichen Alters	49
4.4	Die subzelluläre Lokalisation der SNARE-Proteine in Oligodendrozyten	51
4.4.1	Immunzytochemische Analyse der subzellulären Lokalisation	51

4.4.2	Biochemische Analyse der subzellulären Lokalisation	54
4.5	Oligodendrogliale SNARE-Komplexe	55
4.6	Doppelfärbungen ausgewählter SNARE-Proteine mit PLP	59
4.7	Auswirkungen von dbcAMP auf den PLP-Transport in der Zell-Linie Oli-neu	62
4.8	Die funktionelle Inaktivierung von VAMP3 vermindert den zur Plasmamembran gerichteten PLP-Transport	64
4.9	Die funktionelle Inaktivierung von VAMP7 führt zu einem reduzierten PLP-Transport an die Plasmamembran	67
4.10	Doppel-Knockdown der SNARE-Proteine VAMP3 und VAMP7	69
4.11	Myelinisierung in <i>mocha</i>-Mäusen	70
5	Diskussion	74
5.1	Vesikulärer Transport von Myelinkomponenten	74
5.2	Die Expression und Regulation der SNARE-Proteine	74
5.2.1	Die Expression und Regulation der SNAREs in primären Oligodendrozyten und Gehirnlisaten	74
5.2.2	Die Expression der SNAREs im Myelin	75
5.3	Die subzelluläre Lokalisation der SNARE-Proteine	76
5.4	Die SNARE-Komplexe	77
5.5	Zuordnung der SNAREs zu unterschiedlichen Transportrouten	79
5.6	VAMP3 und VAMP7 kolokalisieren mit PLP	80
5.7	Funktionelle Studien zum SNARE-abhängigen PLP-Transport	81
5.7.1	Die PLP-Translokationsstudie	81
5.7.2	VAMP3 vermittelt den PLP-Transport vom <i>Recycling</i> Endosom zur Plasmamembran	82
5.7.3	VAMP7 vermittelt den PLP-Transport von den späten Endosomen, Lysosomen zur Plasmamembran	82
5.8	Die Transportrouten von PLP	83
5.9	PLP-Transport in AP-3δ-defizienten Mäusen	84
6	Ausblick	86
7	Referenzen	87

8	Anhang	104
8.1	Verzeichnisse	104
8.1.1	Abkürzungsverzeichnis	104
8.1.2	Abbildungsverzeichnis	107
8.1.3	Tabellenverzeichnis	108
8.2	Publikationen	108

1 Zusammenfassung

Die Hauptfunktion der Oligodendrozyten im zentralen Nervensystem ist die Myelinisierung. Dabei umwickelt die Zelle mit Ausläufern ihrer Plasmamembran mehrmals die Axone. In den Phasen der aktiven Myelinisierung produziert ein Oligodendrozyt eine Fläche von 5000-50000 μm^2 Myelin pro Tag, wobei große Mengen der Myelinkomponenten über vesikulären Transport zur Zelloberfläche transportiert werden müssen. Die Fusion der Vesikel mit ihrer Zielmembran wird durch SNARE-Proteine (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment protein receptor proteins*) kontrolliert, die durch spezifische Interaktionen zwischen R- (Vesikel) und Q- (Zielmembran) SNAREs auch zur Spezifität der Fusion beitragen.

Um die SNAREs den oligodendroglialen Transportrouten zuzuordnen, wurde deren Expression, Regulation und subzelluläre Lokalisation in primären Oligodendrozyten, in Oli-neu Zellen und im Myelin untersucht. Die Plasmamembran-Q-SNAREs Syntaxin 3, Syntaxin 4 und SNAP23, sowie das endosomale R-SNAREs VAMP3 zeigten eine zunehmende Expression im Verlauf der Oligodendrozytenreifung, die Expression von SNAP29 hingegen verminderte sich. Zudem akkumulierten die SNARE-Proteine Syntaxin 2, Syntaxin 3, Syntaxin 4 und VAMP7 im adulten Myelin, was für ihre Beteiligung an der Myelinisierung spricht. Co-Immunpräzipitationen ergaben u.a. Interaktionen zwischen den SNARE-Proteinen VAMP3 (R), Syntaxin 4 (Q_a) und SNAP23 (Q_{bc}). Anhand der beschriebenen Analyse konnten die SNARE-Proteine den oligodendroglialen Transportwegen zugeordnet werden.

Immunzytochemische Analysen zeigten, dass das Hauptmyelinprotein PLP mit dem R-SNARE des *Recycling* Endosoms VAMP3, und mit dem spät endosomal, lysosomalen SNARE VAMP7 kolokalisiert. Um deren Rolle im PLP-Transport zu untersuchen, wurden verschiedene VAMP3- bzw. VAMP7-*Silencing*-Experimente durchgeführt. In beiden Fällen führte dies zu einer reduzierten Menge an PLP an der Zelloberfläche. Die Ergebnisse lassen somit auf zwei unabhängige Transportwege für PLP zur Plasmamembran von Oligodendrozyten schließen. Der VAMP7-abhängige PLP-Transport wurde zusätzlich *in vivo* in AP3 δ -defizienten Mäusen, welche VAMP7 fehlsortieren, überprüft. Die Gehirne der mutanten Mäuse enthielten weniger Myelin, das isolierte Myelin enthielt weniger PLP und CNP. VAMP7 scheint also bei der Myelinisierung die Fusion von PLP- und CNP-enthaltenden Vesikeln mit der Myelinmembran zu vermitteln.

2 Einleitung

Das Nervensystem ist ein hierarchisch gegliedertes System verbundener Neurone. Es ist für die Aufnahme und Weiterleitung von Reizen, für die Erregungsverarbeitung, für die Aktivierung von Muskeln, sowie für die Koordination und Aufrechterhaltung von Organfunktionen vielzelliger Organismen zuständig. Das Nervensystem gliedert sich in das periphere (PNS) und das zentrale Nervensystem (ZNS) und besteht aus zwei Grundtypen von Zellen, den Neuronen und den Gliazellen. Neurone sind auf die Weiterleitung von elektrischen Reizen spezialisiert. Gliazellen machen den Hauptanteil der Gehirnzellen aus und lassen sich in drei Subtypen aufteilen: Astrozyten, Mikroglia und Oligodendrozyten.

2.1 Oligodendrozyten

2.1.1 Funktionen im Zentralen Nervensystem

Die Hauptfunktion der Oligodendrozyten im zentralen Nervensystem ist die sogenannte Myelinisierung, eine Isolierung der Axone. Dieser Vorgang findet in periodischen Abständen am Axon statt und ermöglicht die saltatorische Erregungsleitung, welche die Geschwindigkeit der Signalweiterleitung des Neurons optimiert (Nave and Trapp, 2008; Simons and Trotter, 2007). Neben der Myelinisierung erfüllen Oligodendrozyten jedoch auch zahlreiche weitere Funktionen wie z.B. Neuroprotektion, ohne die es zur Degeneration der Axone kommt (Yin et al., 2006). Gliazellen unterstützen das Überleben der Neurone („*axonal support*“). Dies zeigen Mausmutanten, wie z.B. *Knockouts* der zyklischen Nukleotidphosphodiesterase (CNP, *2',3'-cyclic-nucleotide-3-phosphodiesterase*), in denen die Ultrastruktur des Myelins unverändert ist, die Axone hingegen sogenannte „*axonal swellings*“, spezifische morphologische Veränderungen, aufweisen (Lappe-Siefke et al., 2003). Oligodendrozyten senden Signale an Neurone, durch welche es zu Umstrukturierungen z.B. im Bereich der Ranvierschen Schnürringe kommt (Kap. 2.2.1) (Schafer and Rasband, 2006). So sezernieren Oligodendrozyten lösliche Faktoren, welche die Akkumulation von Ionenkanälen induzieren (Kaplan et al., 2001). Außerdem kommt es zu Interaktionen zwischen glialen und axonalen Zelladhäsionsmolekülen, welche anschließend durch Interaktionen mit Proteinen des Zytoskeletts und *Scaffolding*-Proteinen, wie z.B. Ankyrine und Spektrine stabilisiert werden (Rasband et al., 1999; Susuki and Rasband, 2008). Neuste Studien zeigen, dass Oligodendrozyten-Vorläufer-Zellen (OPC, *oligodendrocyte precursor cell*) die das Proteoglykan NG2 exprimieren,

sogenannte Axon-Glia-Synapsen mit glutamatergen und GABA-ergen Neuronen bilden (Bergles et al., 2000; Paukert and Bergles, 2006). Die Zellen sind möglicherweise in der Lage Aktionspotentiale zu generieren (Karadottir et al., 2008). Eine weitere Funktion von Oligodendrozyten liegt in der Regulation der Signalweiterleitung in Axonen. Dies soll zu einer verbesserten Synchronität zwischen den myelinisierten Axonen führen (Fields, 2008; Yamazaki et al., 2007). Ob sich diese Funktionen der Oligodendrozyten jedoch bestätigen bleibt abzuwarten.

2.1.2 Herkunft und Differenzierung

Oligodendrozyten entspringen der Ventrikular- und Subventrikularzone des zentralen Nervensystems (Miller, 2002). Sie werden durch Gradienten der Transkriptionsfaktoren *sonic hedgehog* (Shh) und BMP (*bone morphogen protein*), die wiederum zur Expression der Transkriptionsfaktoren Olig1, Olig2 und der Sox-Familie führen, determiniert und migrieren zu ihrem Zielort (McTigue and Tripathi, 2008; Nicolay et al., 2007). Sind die Zellen an ihrem Zielort angekommen, beginnen die Vorläuferzellen zu differenzieren, was an der zunehmenden Zahl und der Komplexität der Fortsätze deutlich wird. Zudem vermindert sich die Expression von PDGF α R (*platelet-derived growth factor- α receptor*) und NG2 (*nerve-glia antigen 2*). Während der Differenzierung durchlaufen die Zellen mehrere Phasen, die durch die Expression spezifischer Marker und eine bestimmte Morphologie gekennzeichnet sind (Pfeiffer et al., 1993). Mehr und mehr werden spezifische Myelinproteinen, wie z.B. PLP (*proteolipid protein*), MAG (*myelin-associated glycoprotein*), MBP (*myelin basic protein*) und MOG (*myelin oligodendrocyte glycoprotein*) exprimiert. Die als reife Oligodendrozyten bezeichneten Zellen können zuletzt von nicht-myelinisierenden Oligodendrozyten zu myelinisierenden Zellen differenzieren. Dieser Schritt benötigt jedoch den Kontakt zum Axon (Baumann and Pham-Dinh, 2001).

Dennoch differenzieren Oligodendrozyten *in vitro* auch ohne Neurone. Die Zellen scheinen eine innere Uhr zu besitzen, die das Ende der Proliferation und den Ablauf der Differenzierung steuert. Dieser Prozess wird *in vivo* jedoch durch externe Faktoren reguliert. Da mehr Oligodendrozyten differenzieren als nötig, dienen die Signale v.a. der Abstimmung der Zahl an Oligodendrozyten zur myelinisierenden Fläche. Durch den Mangel an Überlebensfaktoren werden überflüssige Zellen apoptotisch (Barres et al., 1992; McTigue and Tripathi, 2008). Es existieren zahlreiche Faktoren, die sowohl von Neuronen als auch von Astrozyten sezerniert werden, so z.B. PDGF-A (*platelet-derived growth factor A*), bFGF (*basic FGF*) und NT-3 (Neurotrophin-3). Auch IGF-1 (*insulin-like growth factor-1*) und Neureguline (NRG) spielen eine wichtige Rolle (Baron et al., 2005; Colognato and French-Constant, 2004; Miller, 2002). Eine weitere Regulation wird durch den *Notch*-Signalweg gewährleistet. Oligodendrozyten-Vorläufer exprimieren den *Notch*-

1-Rezeptor, der mit dem axonalen Liganden *Jagged 1* interagiert. Dies führt zu einer Inhibition der oligodendroglialen Differenzierung. Soll ein Axon myelinisiert werden, wird die Expression von *Jagged-1* vermindert, so dass der Oligodendrozyt das Differenzierungsprogramm startet. Somit können Neurone die Myelinisierung zeitlich steuern (Wang et al., 1998). Die Umhüllung der Axone kann durch eine Inhibition der γ -Sekretase verstärkt werden. Dies könnte einer Remyelinisierung bei demyelinisierenden Erkrankungen wie Multipler Sklerose (MS) dienen. In EAE-Mäusen (*experimental autoimmune encephalomyelitis*, MS-Maus-Modell) konnten Inhibitoren der γ -Sekretase bereits eine Verbesserung des Krankheitsverlaufs erwirken (Barres, 2008; Watkins et al., 2008).

2.2 Myelin

Myelin wurde zum ersten Mal 1717 beobachtet und von Leeuwenhoek als „*fatty part*“ um Neurone bezeichnet (McTigue and Tripathi, 2008). Heute weiß man, dass Myelin aus spiralig gewundenen oligodendroglialen Fortsätzen besteht und viele Funktionen im zentralen Nervensystem übernimmt. Die spezifische Ultrastruktur des Myelins ermöglicht die saltatorische Erregungsleitung.

2.2.1 Struktureller Aufbau

Im Verlauf der Myelinisierung umwickeln Oligodendrozyten mit Ausläufern ihrer Plasmamembran spiralförmig das Axon an bestimmten Bereichen, den Internodien. Stellen des Axons die nicht myelinisiert sind, werden als Ranviersche Schnürringe bezeichnet (Abb. 2.1 A, B). Ein Oligodendrozyt kann bis zu 40 verschiedene Axone myelinisieren (Baumann and Pham-Dinh, 2001; Salzer, 2003). Anschließend wird das Zytoplasma zwischen den beiden Membranen herausgedrängt (Kompaktierung), und das kompakte Myelin entsteht. Es weist eine spezifische elektronenmikroskopische Ultrastruktur auf, bei der die zusammengelagerten zytoplasmatischen Membranoberflächen die „*major dense line*“ und die extrazellulären Membranoberflächen die „*intraperiod line*“ bilden (Abb. 2.1 C). Dennoch bleiben Bereiche des Myelins unkompaktiert. Dazu zählen das äußere sowie das innere Mesaxon und die, direkt am Ranvierschen Schnürring liegenden, Paranodien (Arroyo and Scherer, 2000). Das äußere Mesaxon stellt eine zytoplasmatische Verbindung zum Oligodendrozyten-Zellkörper und den Paranodien her. Es enthält Mikrotubuli und weitere Zytoskelettkomponenten sowie Mitochondrien, die für den Erhalt der Internodien notwendig sind. Das innere Mesaxon und die Paranodien stellen über eine Anreicherung von Zelladhäsionsmolekülen den

direkten Kontakt zum Axon her (Poliak and Peles, 2003; Salzer, 2003; Susuki and Rasband, 2008). Der Bereich neben den Paranodien wird als Juxtaparanodium bezeichnet (Abb. 2.1 C, D).

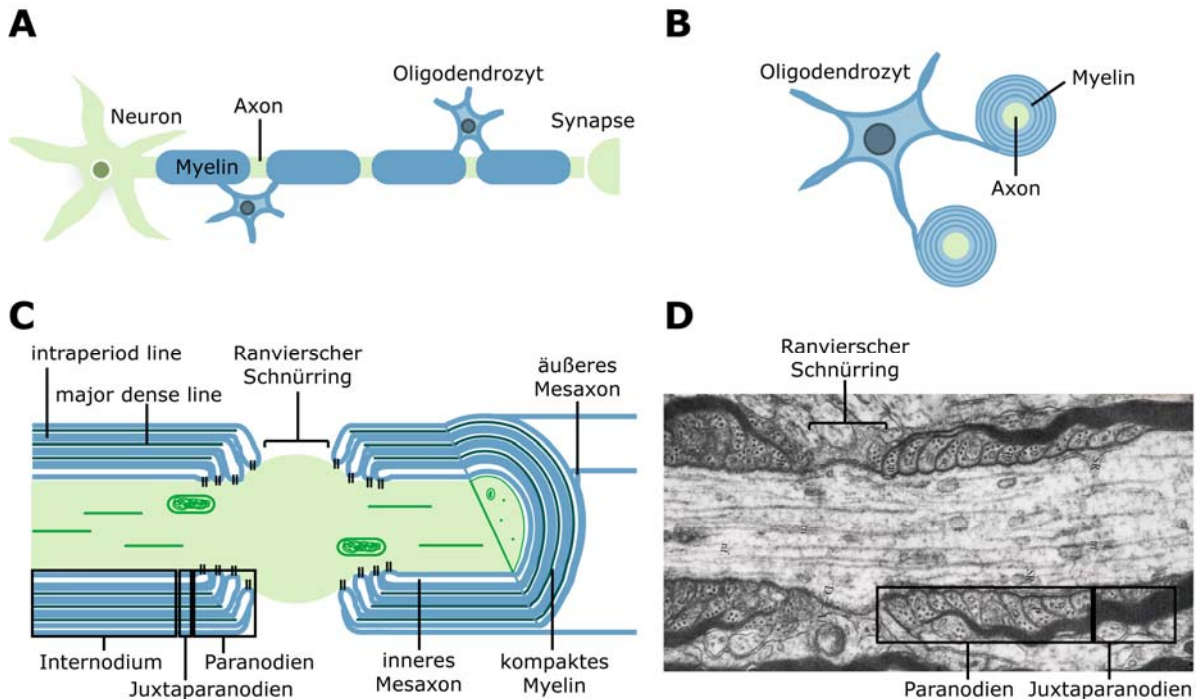


Abb. 2.1: Schematische Darstellung von myelinisierenden Oligodendrozyten

(A) Die Myelinmembran entsteht durch die mehrmalige Umwindung der oligodendroglialen Plasmamembran um das Axon. Dabei umgibt Myelin das Axon an vielen Stellen, den sogenannten Internodien. Dazwischen bleiben freie Bereiche, die Ranvierschen Schnürringe. Oligodendrozyten können mehrere Internodien pro Axon umwinden. (B) Querschnitt durch ein myelinisiertes Axon. (C) Längsschnitt durch ein myelinisiertes Axon im Bereich des Ranvierschen Schnürrings. Die Paranodien, Juxtaparanodien und das Internodium sind markiert. Das kompakte Myelin ist durch die „major dense line“ und die „intraperiod line“ klar zu erkennen. Zu den nichtkompakten Bereichen gehören die Paranodien, sowie das äußere und innere Mesaxon. Modifiziert nach (Maier et al., 2008; Poliak and Peles, 2003). (D) Elektronenmikroskopische Aufnahme eines axonalen Längsschnitts im Bereich des Ranvierschen Schnürrings (Peter et al., 1976).

2.2.2 Biochemische Zusammensetzung

Neben der spezifischen Ultrastruktur des Myelins, weist dieses auch eine charakteristische biochemische Zusammensetzung auf. So machen Lipide ca. 70-80% des Myelintrockengewichtes aus. 25-30% der Lipide stellen die Glykosphingolipide (GSL) Galaktosylceramid (GalCer) und dessen Sulfatidderivat dar. Ein weiterer Hauptbestandteil ist Cholesterin (de Vries and Hoekstra, 2000; Maier et al., 2008). Die spezifische Lipidkomposition ist verantwortlich für die isolierenden Eigenschaften der Myelinmembran. Zudem zeigen die verschiedenen Subdomänen des Myelins unterschiedliche Lipidkompositionen. So weist das äußere Mesaxon der Myelinmembran

ein Verhältnis der Glykosphingolipide zu Cholesterin zu Phospholipiden von 4:5:1 auf. Im inneren Mesaxon zeigt sich eine Verteilung von 0:3:7 (de Vries and Hoekstra, 2000).

Die Proteinkomposition der Myelinmembran ist relativ einfach (Abb. 2.2 A). Es existieren nur wenige Proteine, welche eine spezifische Lokalisation in unterschiedlichen Subdomänen des Myelins aufweisen. PLP (*proteolipid protein*) und MBP (*myelin basic protein*) machen mit 80% des Gesamtmyelinproteins den größten Anteil aus (Maier et al., 2008). Beide sind im kompakten Myelin der Internodien lokalisiert. Das Hauptmyelinprotein PLP / DM20 (insgesamt 50% des Gesamtmyelinproteins) soll im folgenden Kapitel (Kap. 2.2.3) genauer beschrieben werden, da im Rahmen dieser Arbeit v.a. dieses Protein untersucht wurde. Auf die übrigen Myelinproteine soll nun kurz eingegangen werden.

Das arginin- und lysinreiche Protein MBP (*myelin basic protein*) macht 30% des Gesamtmyelinproteins aus (Zearfoss et al., 2008). In der Maus existieren 4 Isoformen, die durch alternatives *Splicing* des MBP-Gens entstehen (14, 17, 18,5 und 21,5 kDa), wobei die Isoformen der Größen 14 und 18,5 kDa den Hauptanteil ausmachen (95%) (Baumann and Pham-Dinh, 2001). MBP ist ein zytoplasmatisches, peripheres Membranprotein (Abb. 2.2 A), das für die Strukturhaltung der *major dense line* erforderlich ist, indem es mit seinen positiven Ladungen an die negativ geladenen Lipide bindet und die gegenüberliegenden Membranseiten aneinander führt. Neuste Studien zeigen auch eine Interaktion mit Aktin, Tubulin, Ca²⁺-Calmodulin und Clathrin. Das Myelinprotein übernimmt eine Funktion bei der Übertragung von extrazellulären Signalen an das Zytoskelett (Boggs, 2006; de Vries and Hoekstra, 2000). MBP-*Knockout*-Mäuse (*shiverer*), in denen eine Deletion des MBP-Gens vorliegt, zeigen keine Myelinbildung, was möglicherweise u.a. auf ein fehlendes *Clustering* der Galaktosylceramide (GalCer) zurückzuführen ist (Fitzner et al., 2006).

Einen weiteren wichtigen Bestandteil des Myelins bilden die Glykoproteine MAG (*myelin-associated glycoprotein*) und MOG (*myelin oligodendrocyte glycoprotein*) (Quarles, 1997). MAG (*myelin-associated glycoprotein*) macht 1% des Gesamtmyelinproteins im zentralen Nervensystem aus und besteht aus einer Transmembrandomäne und einem extrazellulären Teil mit fünf Ig-Domänen (Abb. 2.2 A). Durch alternatives *Splicing* entstehen zwei Isoformen, L-MAG (*large*, 72 kDa) und S-MAG (*small*, 67 kDa) wobei in Nagetieren die große Isoform früher exprimiert wird. Die beiden Isoformen unterscheiden sich in ihrer zytoplasmatischen Domäne. Die Lokalisierung von MAG beschränkt sich auf das innere Mesaxon, was auf seine Rolle bei der axo-glialen Interaktion hinweist (Baumann and Pham-Dinh, 2001; Trapp et al., 1989). MAG-*Knockout*-Mäuse zeigen keinen starken Phänotyp, es kommt zu fehlenden oder deformierten inneren Mesaxonen (Li et al., 1994; Montag et al., 1994). Die Funktion von MAG ist noch nicht hinreichend geklärt, man geht davon aus, dass das Protein bei der Findung von Axonen die

myelinisiert werden sollen beteiligt ist. MAG verbessert die Axon-Myelin-Stabilität, inhibiert hingegen aber auch die Axon-Regeneration nach Verletzungen. Dazu interagiert MAG mit den Mitgliedern zweier Rezeptorproteinfamilien, Sialoglykane (z.B. Ganglioside GD1a und GD1b) und Nogo-Rezeptoren (Mehta et al., 2007; Schnaar and Lopez, 2009). Desweiteren ist auch eine Funktion von MAG in Demyelinisierungsprozessen möglich, da in Multiple Sklerose-Patienten eine lösliche Form von MAG im CSF (*cerebrospinal fluid*) erhöht ist (Moller, 1996).

Das 28 kDa große, glykosylierte Protein MOG (*myelin oligodendrocyte glycoprotein*) kommt ebenfalls im Myelin vor (Birling et al., 1993). Es besitzt eine N-terminale, extrazelluläre Ig-Domäne, eine hydrophobe Domäne, die nur die intrazelluläre Membranhälfte durchzieht, und einen hydrophilen C-Terminus (Pham-Dinh et al., 1993) (Abb. 2.2 A). MOG ist an der äußersten Lamelle des kompakten Myelins lokalisiert (Brunner et al., 1989), an der die extrazelluläre Domäne mit potentiellen Liganden interagieren kann. MOG dient als Zelloberflächenrezeptor, der Signale an den Oligodendrozyten übermittelt (Marta et al., 2005). Zudem fungiert MOG als Autoantigen bei demyelinisierenden Erkrankungen wie Multipler Sklerose (von Budingen et al., 2001). MOG-*Knockout*-Mäuse zeigen keine klinischen oder histologischen Auffälligkeiten (Delarasse et al., 2003).

CNP (*2'3'-cyclic-nucleotide-3'-phosphodiesterase*) macht ca. 4% des Gesamtmyelinproteins aus. Es existieren zwei Isoformen (CNP1 und CNP2) der Größen 46 kDa und 48 kDa von denen v.a. CNP1 *post*-translational acyliert, isoprenyliert und phosphoryliert wird (Braun et al., 1991). Die Lokalisation von CNP beschränkt sich auf zytoplasmatische Bereiche des nicht-kompakten Myelins und die Paranodien (Trapp et al., 1988). Die physiologische Funktion von CNP scheint unabhängig von dessen Enzymaktivität zu sein, da das Substrat, 2'3'-zyklisches Nukleotid, nicht im Gehirn lokalisiert ist. CNP soll eine Rolle bei der Aufrechterhaltung der paranodalen-axoglialen Strukturen spielen (Rasband et al., 2005). Interaktionen von CNP mit Tubulin beeinflussen außerdem das Wachstum der oligodendroglialen Fortsätze (Lee et al., 2005), die Bindung von CNP an mRNAs soll deren Expression in differenzierenden Oligodendrozyten regulieren (Gravel et al., 2008). CNP-*Knockout*-Mäuse zeigen keine Veränderungen der Myelin-Ultrastruktur, sondern sogenannte „*axonal swellings*“. Später kommt es zu einer Degeneration der Axone (Lappe-Siefke et al., 2003).

Neben den beschriebenen Proteinen existieren weitere Myelinproteine (Roth et al., 2006; Taylor et al., 2004), wie u.a. MOBP (*myelin-associated oligodendrocyte basic protein*) (Yamamoto et al., 1994), MAL (*myelin and lymphocyte protein*), OSP (*oligodendrocyte-specific protein*, Claudin-11) (Bronstein et al., 1997), Connexin32 (Dermietzel et al., 1997), OMgp (*oligodendrocyte-myelin glycoprotein*) (Mikol et al., 1990) und MOSP (*myelin/oligodendrocyte specific protein*) (Dyer et al., 1991) (Baumann and Pham-Dinh,

2001). Neuste Studien zeigen zudem Sirtuin2 als ein weiteres Myelinprotein, welches PLP-abhängig im Myelin exprimiert wird (Roth et al., 2006; Werner et al., 2007).

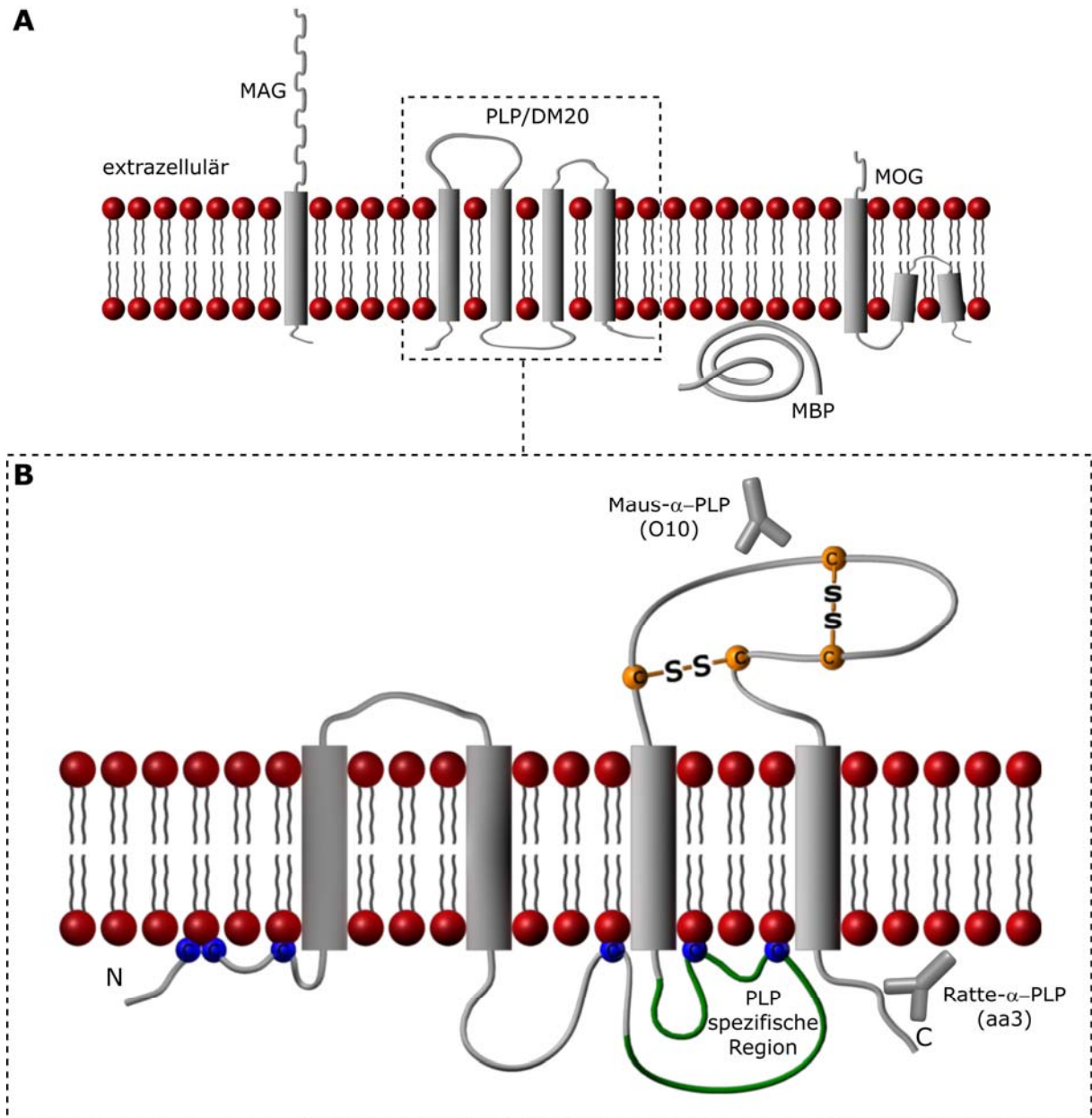


Abb. 2.2: Schematische Darstellung ausgewählter Myelinproteine

(A) Ausgewählte Myelinproteine und ihre Topologie in der Myelinmembran. (B) Genauere schematische Darstellung des Hauptmyelinproteins PLP/DM20. Gezeigt sind: Disulfidbrücken (gelbe Kugeln), acylierte Cysteine (blaue Kugeln), Bindestellen für den aa3- und den O10-Antikörper und die PLP-spezifische Domäne (in DM20 nicht vorhanden, grün). Modifiziert nach (Baumann and Pham-Dinh, 2001; Garbern, 2007).

2.2.3 Proteolipid Protein (PLP)

Das Hauptmyelinprotein PLP (*proteolipid protein*) macht 50% des Gesamtmyelinproteins aus und ist im kompakten Myelin lokalisiert. Das X-chromosomale *PLP1*-Gen kodiert zwei Isoformen, PLP (26 kDa) und die 35 Aminosäuren kürzere Isoform DM20 (20 kDa). PLP / DM20 besitzen einen stark hydrophoben Charakter, und werden durch Acylierung von mehreren Cysteinen an der Membran verankert (Garbern, 2005) (Abb. 2.2 B). Beide Isoformen weisen vier helikale Transmembrandomänen, drei intrazelluläre und zwei extrazelluläre Domänen auf (N- und C-Terminus eingeschlossen). Die physiologische Funktion von PLP ist noch nicht hinreichend geklärt. Man geht davon aus, dass PLP eine wichtige Rolle bei der Stabilisierung und Aufrechterhaltung des Myelins spielt (Griffiths et al., 1998a; Klugmann et al., 1997). PLP-*Knockout*-Mäuse zeigen, angesichts der starken Expression des Proteins im Myelin, einen erstaunlich milden Phänotyp. Die Tiere verhalten sich bis zum Alter von 15 Monaten normal, erst dann entwickeln sie eine progressive Schwäche der Extremitäten (Garbern, 2005; Griffiths et al., 1998b; Rosenbluth et al., 2006). Betrachtet man die Myelinisierungsprozesse in den Null-Mutanten, so verlaufen diese normal. Die Ultrastruktur des Myelins ist lediglich leicht verändert. Interessanterweise kommt es zu axonalen, morphologischen Veränderungen, sogenannten „*axonal swellings*“. Später zeigen die Tiere eine Degeneration der Axone (Garbern et al., 2002), welche auch in Patienten mit PLP-Defizienz zu erkennen ist. Dabei sind meist die Beine stärker betroffen, was zu der Annahme führt, dass v.a. lange Axone beeinträchtigt sind. Mutationen im humanen PLP1-Gen führen zu dysmyelinisierenden Erkrankungen (fehlerhafte Myelinisierung) wie z.B. die Pelizaeus-Merzbacher Krankheit (PMD, *pelizaeus merzbacher disease*) oder die Typ-2 Spastische Paraplegie (SPG-2, *spastic paraplegia type-2*) (Garbern, 2005; Garbern, 2007; Kramer-Albers et al., 2006; Werner et al., 1998). Existierende Mausmutanten zeigen dabei verschiedene Stärkegrade der Phänotypen. Die natürliche Mausmutante „*jimpy-msd*“ zeigt z.B. einen starken Phänotyp, der sich durch einen Tremor, Krämpfe und dem Tod der Tiere nach drei bis vier Wochen äußert. Die Mutante „*rumpshaker*“ hingegen zeigt einen milden Phänotypen mit Ataxien aber einer normalen Lebenserwartung (Duncan, 2005; Kramer-Albers et al., 2006). Dabei korreliert die Stärke der Phänotypen mit den zu beobachtenden Myelindefekten. Zudem kann in den stark beeinträchtigten Mutanten ein apoptotischer Tod der Oligodendrozyten beobachtet werden, nicht aber in nur schwach beeinträchtigten Tieren (Knapp et al., 1986). Wahrscheinlich folgt die Apoptose auf eine zu starke Akkumulation des mutanten, fehlgefalteten PLP im rauen endoplasmatischen Retikulum (rER) (Southwood et al., 2002).

2.3 Myelinisierung

Alle heutigen Vertebraten myelinisieren die Axone des zentralen und peripheren Nervensystems. Lediglich noch existierende Urfische wie z.B. das Neunauge oder der Schleimaal haben kein Myelin (Bullock et al., 1984; Nave and Trapp, 2008). Welche Axone im zentralen Nervensystem myelinisiert werden hängt von der Gehirnregion ab. So werden in der weißen Substanz lediglich große Axone myelinisiert, im optischen Nerv oder im Cortex auch kleinere Axone (Nave and Trapp, 2008). Die Myelinisierung kann in vier Teilabschnitte unterteilt werden. Zunächst erfolgen die Erkennung des zu myelinisierenden Axons und die Anheftung an dieses. Anschließend synthetisiert der Oligodendrozyt große Mengen der Myelinkomponenten und transportiert diese zum Axon. Es folgt die Umwicklung des Axons und zuletzt die Kompaktierung, bei der das Zytoplasma zwischen den Membranschichten herausgequetscht wird (Arroyo and Scherer, 2000; Simons and Trotter, 2007).

Diese Vorgänge passieren nicht zufällig in den Zellen. Eine Reihe von unterschiedlichen Regulationsmechanismen wirkt positiv oder negativ auf den Myelinisierungsprozess ein. Bei der Auswahl des zu myelinisierenden Axons spielt u.a. der Axondurchmesser eine wichtige Rolle. Es werden nur Axone myelinisiert, die einen Durchmesser von mehr als 0,2 μm überschreiten. So kann zudem ausgeschlossen werden, dass Dendriten myelinisiert werden. Zur Erkennung des Axons im peripheren Nervensystem dient das auf der axonalen Oberfläche exprimierte Protein Neuregulin1 TypIII (*NRG1 typeIII*) (Taveggia et al., 2005). Gleichzeitig wird durch die Expression von NRG1 die Dicke der Myelinschicht bestimmt, die synthetisiert wird (Michailov et al., 2004). Transgene Mäuse mit einer reduzierten NGR1-Expression zeigen daher eine Hypomyelinisierung, eine Überexpression des Proteins führt zu einer dickeren Myelinschicht. Ein weiterer wichtiger Mechanismus zur Regulation des Myelinisierungsprozesses ist die elektrische Aktivität des Axons (Demerens et al., 1996), durch die es zur Sekretion pro-myelinisierender Faktoren wie Adenosin kommt (Stevens et al., 2002). Zudem sezernieren Astrozyten als Antwort auf die elektrische Aktivität des Neurons LIF (*leukemia inhibitory factor*), was die Myelinisierung von Oligodendrozyten stimuliert (Barres, 2008; Ishibashi et al., 2006). Defekte in diesem Mechanismus führen zu Dysmyelinisierungen (Nave and Trapp, 2008). Neben diesen regulatorischen Mechanismen wirken weitere fördernde oder inhibitorische Faktoren auf die Myelinisierung ein (Coman et al., 2005; Rosenberg et al., 2006). So wird die Myelinisierung durch die Anwesenheit von axonalem PSA-NCAM (*polysialylated-neural cell adhesion molecule*) inhibiert (Charles et al., 2000; Nave and Trapp, 2008), das Neurotrophin NGF (*nerve growth factor*) hingegen stimuliert diese (Chan et al., 2004).

2.4 Sortierung von Myelinkomponenten

Während der aktiven Phase der Myelinisierung produziert jeder Oligodendrozyt eine Fläche von 5000-50000 μm^2 Myelin pro Tag (Pfeiffer et al., 1993). Dabei müssen alle Myelinkomponenten kontrolliert transportiert werden. Dies bedarf eines genauen Transportmechanismus vom Ort der Synthese zur wachsenden Myelinmembran (Anitei and Pfeiffer, 2006; Kramer et al., 2001). Hinzu kommt, dass die unterschiedlichen Komponenten auch in verschiedene Subdomänen der Myelinmembran eingebracht werden müssen. So sind in der Myelinmembran z.B. PLP/DM20 und MBP im kompakten Myelin lokalisiert, MAG hingegen im inneren Mesaxon. Wie der Oligodendrozyt diesen Transport organisiert ist noch nicht hinreichend geklärt. Im Folgenden sollen jedoch bereits bekannte Transportmechanismen kurz beschrieben werden.

Das Myelinprotein MBP wird in Form der mRNA zur Myelinmembran transportiert. Dazu ist die mRNA in sogenannte „*granules*“ gepackt (Ainger et al., 1997; Ainger et al., 1993; Carson et al., 2001). Die Translation der mRNA erfolgt durch einen, durch die Src-Kinase Fyn vermittelten, Signalweg. Durch einen axo-glialen Kontakt kommt es dabei zu einer ortsspezifischen Translation des Proteins (White et al., 2008).

Das zweite Hauptmyelinprotein PLP wird durch vesikulären Transport zur Myelinmembran transportiert (Colman et al., 1982). Dazu trägt PLP am N-Terminus eine 13 Aminosäuren lange Myelin-Signalsequenz, die nach Palmitoylierung ausreicht, um PLP zum Myelin zu leiten (Schneider et al., 2005). Außerdem kann eine Assoziation mit Cholesterol und Galaktosylceramiden im Golgi-Apparat beobachtet werden (Simons et al., 2000; Simons and Trajkovic, 2006). Zahlreiche Studien postulieren daher eine Beteiligung von „*Lipid rafts*“ am Transport von PLP (Marta et al., 2003; Simons et al., 2002; Simons et al., 2000). Das Myelinprotein wird zunächst, in die späten Endosomen, Lysosomen endozytiert und anschließend signalabhängig zur Plasmamembran transportiert. Die oligodendrogliale PLP-Endozytose wird dabei vermindert, die Exozytose verstärkt (Simons and Trajkovic, 2006; Trajkovic et al., 2006).

Neben PLP werden auch die Myelinproteine MAG und MOG auf ihrem Transport zur Myelinmembran zunächst endozytiert. So finden sich PLP und MAG nach der Endozytose in LAMP1-positiven späten Endosomen, Lysosomen, MOG hingegen im Transferrin-Rezeptor-positiven *Recycling* Endosom. Dabei verläuft die Endozytose von MAG und MOG clathrin-abhängig, die von PLP clathrin-unabhängig, aber cholesterol-abhängig. Da die drei Proteine im Myelin in unterschiedlichen Subdomänen lokalisiert sind, geht man davon aus, dass das unterschiedliche *Recycling* dazu dient, die Proteine für die verschiedenen Transportwege vor zu sortieren (Winterstein et al., 2008).

2.5 Vesikulärer Transport

Der Transfer von Material zwischen den Organellen wird durch Transportvesikel gewährleistet. Der Transport kann in vier unterschiedliche Abschnitte unterteilt werden: das Abknospen des Vesikels, dessen Transport, das Andocken und die Fusion (Cai et al., 2007). Das Abknospen wird durch sogenannte *Coat*-Proteine kontrolliert (McMahon and Mills, 2004). Dabei unterscheidet man „Clathrin-*coats*“, dessen Vesikel vom Golgi-Apparat oder von der Plasmamembran stammen und COPI- bzw. COPII-*coats* (COP, *coat protein complex*). COPI-Vesikel interagieren vom Golgi-Apparat zum Endoplasmatischen Retikulum (ER), COPII-Vesikel kontrollieren den umgekehrten Transport. In den letzten Jahren wurden zudem weitere „Nicht-Clathrin-*coats*“ identifiziert (Wang et al., 2006). Die Funktion der *Coat*-Proteine liegt zum einen in der Verformung der Membran zu einer Art Knospe, so dass ein Vesikel gebildet werden kann, und zum anderen in der Selektion des vesikulären Inhalts (*Cargo*) über bestimmte Sortiersignale (Cai et al., 2007). Nach dem Abknospen des Vesikels wird dieser entlang des Zytoskeletts zur Akzeptormembran transportiert. Dabei sind die molekularen Motoren Kinesin, Dynein und Myosin beteiligt (Hammer and Wu, 2002; Matanis et al., 2002). Das Andocken des Vesikels, wird durch *Tethering*-Faktoren gewährleistet (Kap. 2.5.6.4). Der letzte Schritt, also die Fusion des Vesikels mit der Zielmembran wird durch die Proteinfamilie der SNAREs kontrolliert. Diese Proteine sind Gegenstand der Untersuchungen dieser Arbeit.

2.5.1 Die SNARE-Hypothese

Eine der wichtigsten und am besten untersuchten Proteinfamilien im Bereich des vesikulären Membrantransports sind die SNARE-Proteine (Duman and Forte, 2003). Im Jahr 1993 arbeiteten Jim Rothman und Kollegen an der Beteiligung von NSF (*N-ethylmaleimide-sensitive-factor*) und α -SNAP (*soluble-NSF-attachment-protein*) an der Fusion synaptischer Vesikel. Dabei entdeckten sie eine mit NSF und α -SNAP interagierende Protein-Familie, die sie SNAP-Rezeptoren oder SNAREs (*soluble-NSF-attachment-protein-receptor*) benannten. Basierend auf den Ergebnissen der Studie postulierte Rothman die SNARE-Hypothese, nach der jeder Transportvesikel in einer Zelle ein v-SNARE (*vesicle*) trägt, das mit einem spezifischen t-SNARE an einer Zielmembran (*target membrane*) interagieren kann. Dadurch kommt es zur Bildung eines sehr stabilen Vier-Helix-Bündels (*trans*-SNARE-Komplex oder *core*-Komplex) und zur Fusion der beiden Membranen. Die Hypothese postuliert, dass durch die spezifische Interaktion der, an unterschiedlichen Kompartimenten lokalisierten, v- und t-SNAREs eine Spezifität der Vesikelfusion erreicht wird (Gagescu, 2000; McNew et al., 2000; Sollner et al., 1993).

2.5.2 Klassifizierung der SNAREs

SNAREs sind Membranproteine (100-300 Aminosäuren), die einer großen Proteinfamilie angehören (Hong, 2005). So finden sich z.B. in Hefezellen (*Saccharomyces cerevisiae*) 25 Mitglieder. Das menschliche Genom kodiert insgesamt 36 verschiedene SNARE-Proteine, und die Schattenkresse (*Arabidopsis thaliana*) sogar 54 unterschiedliche SNAREs (Jahn and Scheller, 2006).

Bis vor einigen Jahren nahm man eine funktionelle Unterteilung der SNARE-Proteine in v- und t-SNAREs vor. Diese Einteilung ging jedoch von einer strikten Verteilung der SNAREs zwischen Donor- und Akzeptorkompartimenten aus. Da SNARE-Proteine jedoch zum einen auch an homotypischen Fusionen zwischen Endosomen und zum anderen an mehreren Fusionen in unterschiedlichen Transportwegen beteiligt sein können, bevorzugt man heute eine strukturelle Unterteilung in Q- und R-SNAREs (Fasshauer et al., 1998). Die Klassifizierung basiert auf der Kristallstruktur des Vier-Helix-Bündels, welches in 16 Schichten unterteilt werden kann. Alle Schichten, außer der zentralen Schicht, dem sogenannten „0-layer“, sind hydrophob. Der „0-layer“ beinhaltet vier konservierte Aminosäuren: drei Glutamine (Q) und ein Arginin (R), welche von jeweils einem SNARE-Protein zur Verfügung gestellt werden (Fasshauer, 2003; Fasshauer et al., 1998). Das bedeutet, dass in der Regel ein *trans*-SNARE-Komplex jeweils aus einer R-SNARE-Helix (vom vesikulären SNARE) und drei Q-SNARE-Helices, die wiederum in ein Q_a-, Q_b- und ein Q_c-SNARE unterteilt werden, besteht (Duman and Forte, 2003; Ungar and Hughson, 2003) (Tab. 2.1). Alle SNARE-Proteine tragen ein sehr konserviertes SNARE-Motiv, welches aus 60-70 Aminosäuren besteht und zur Bildung des *trans*-SNARE-Komplexes nötig ist. Zudem weisen fast alle SNAREs eine C-terminale, hydrophobe Transmembrandomäne auf, die über eine Linker-Region mit dem SNARE-Motiv verbunden ist. SNARE-Proteine ohne Transmembrandomäne, werden durch *post*-translationale Prenylierung, Palmytolierung (Fasshauer, 2003; Fukasawa et al., 2004; Veit et al., 1996) oder durch Interaktionen mit anderen SNARE-Proteinen an der Membran verankert (Hong, 2005; Vogel et al., 2000). Der weitere Aufbau der SNARE-Proteine unterscheidet sich je nach Subklasse im N-Terminus des Proteins, der v.a. zur Interaktion mit regulatorischen Proteinen dient (Fasshauer, 2003; Jahn and Scheller, 2006). Alle R-SNAREs tragen eine N-terminale Domäne. Diese wird im Fall von VAMP7 als Longin Domäne bezeichnet, im Fall von VAMP4 als „TGN-targeting-motif“ (Hong, 2005). Q_a-SNAREs tragen N-terminal drei antiparallele Helices (Habc) die zur Regulation der SNARE-Komplex-Bildung dienen. Die Subklasse der Q_{bc}-SNAREs beinhaltet zwei SNARE-Motive (Q_b und Q_c). Sind diese SNARE-Proteine in einen *trans*-SNARE-Komplex involviert, so besteht dieser lediglich aus drei SNARE-Proteinen (R-, Q_a-, Q_{bc}-SNARE). In allen anderen Fällen werden die vier Helices (R-, Q_a-, Q_b-, Q_c-SNARE) durch vier unterschiedliche SNARE-Proteine zur Verfügung gestellt (Tab. 2.1).

2.5.3 Der SNARE-Zyklus

Wie bereits erwähnt dienen SNARE-Proteine der Fusion von Vesikeln mit einer Akzeptormembran (Jahn and Scheller, 2006). Bevor es zur Fusion kommt, wird zunächst ein sogenannter Akzeptorkomplex gebildet. Dazu lagern sich zunächst Q_a-, Q_b und Q_c-SNAREs in *Clustern* zusammen (Abb. 2.3) (Lang et al., 2001; Predescu et al., 2005). Die *Cluster* sind bevorzugte Andockstellen für sekretorische Vesikel. Nicht alle SNARE-Proteine zeigen eine solche Akkumulation an bestimmten Membranstellen, man geht aber davon aus, dass eine erhöhte Anzahl an Q-SNAREs zu einer effizienteren Vesikelfusion führt (Jahn and Scheller, 2006). Anschließend lagern sich die N-Termini der Q-SNAREs zu einem Akzeptorkomplex zusammen. Dieser hoch reaktive Komplex wird durch regulatorische Proteine, wie z.B. SM- (*Sec1/Munc18-related*) Proteine, stabilisiert (Kap. 2.5.6.2). Erreicht der Vesikel mit dem gebundenen R-SNARE den Akzeptorkomplex, wird ein *trans*-SNARE-Komplex aus allen vier benötigten SNARE-Motiven gebildet. Dies verläuft nach dem sogenannten „*Zippering Model*“ vom N-Terminus zur C-terminalen Transmembrandomäne. Die beiden Membranen kommen sich dadurch so nah, dass die Energiebarriere durchbrochen werden kann, und die Membranen fusionieren (Fasshauer, 2003). Bei der Bildung des Vier-Helix-Bündels sind u.a. regulatorische Proteine, wie Synaptotagmine und Complexine involviert (Kap. 2.5.6.4). Nach der Fusion des Vesikels liegen die SNAREs in einer biologisch inaktiven *cis*-Konfiguration (*cis*-SNARE-Komplex) in der Akzeptormembran vor. Zum Lösen des Komplexes müssen NSF (*N-ethylmaleimide-sensitive-factor*), ein Mitglied der AAA+ Proteasen und dessen Cofaktor α -SNAP (*soluble-NSF-associated-protein*) binden. Unter ATP-Hydrolyse können die einzelnen SNAREs dann zunächst gelöst und anschließend wieder zu ihrem Wirkungsort transportiert werden (Jahn and Scheller, 2006).

2.5.4 SNARE-Lokalisierung

Eukaryotische Zellen exprimieren meist viele Mitglieder einer SNARE-Subfamilie, d.h. die unterschiedlichen Kompartimente müssen mit den richtigen SNARE-Proteinen ausgestattet sein, um einen kontrollierten vesikulären Transport zu gewährleisten. Die SNARE-Proteine sind dabei nicht ausschließlich in dem Kompartiment lokalisiert, dessen Fusion sie kontrollieren. Nach der Fusion befinden sich die SNAREs in der Akzeptormembran, und müssen wieder an ihren Wirkungsort zurücktransportiert werden. Es sind somit zahlreiche Lokalisationen eines SNARE-Proteins möglich (Jahn and Scheller, 2006). Andererseits wurde gezeigt, dass der Großteil des Proteins jeweils am Wirkungsort lokalisiert ist, so dass die Ermittlung der „*steady-state*“-Lokalisation einen Hinweis auf den Transportweg, an dem das SNARE-Protein beteiligt sein könnte, liefern kann (Lafont et al., 1999; Weimbs et al., 2003).

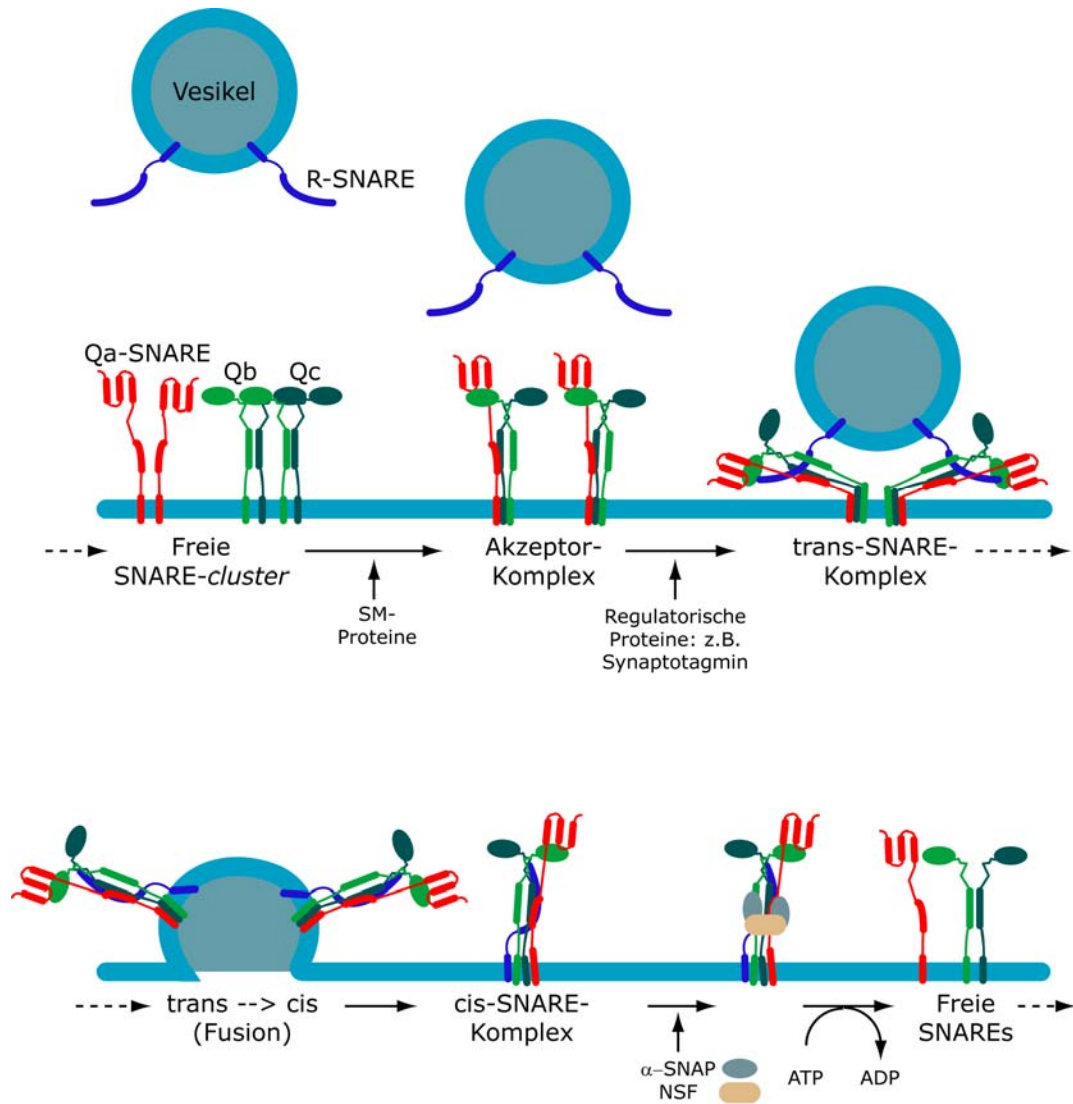


Abb. 2.3: Schematische Darstellung des SNARE-Zyklus

Beispielhaft ist ein Komplex aus drei Q-SNAREs und einem R-SNARE gezeigt (möglich wäre ebenfalls ein Komplex aus zwei Q-SNAREs und einem R-SNARE). Freie SNARE-Proteine sind in sogenannten *Clustern* angeordnet. Durch regulatorische Proteine, wie z.B. SM- (*Sec1/Munc18-related*) Proteine bildet sich ein Akzeptor-Komplex der mit dem vesikulären R-SNARE interagiert. Weitere Regulatoren, wie z.B. Synaptotagmin führen zur Bildung eines *trans*-SNARE-Komplexes, der die beiden Membranen fusionieren lässt. Anschließend wird der entstandene *cis*-SNARE-Komplex durch NSF (*N-ethylmaleimide-sensitive factor*) zusammen mit α -SNAP (soluble NSF attachment protein) aufgelöst und die freien SNAREs werden wieder zu ihren Wirkungsorten transportiert. Modifiziert nach (Jahn and Scheller, 2006).

So ist z.B. Syntaxin 3 in Epithelzellen hauptsächlich an der apikalen Plasmamembran lokalisiert (Li et al., 2002). Funktionelle Studien zeigen, dass das SNARE die Fusion ankommender Vesikel mit diesem Kompartiment kontrolliert (Low et al., 1998; Weimbs et al., 2003). Tabelle 2.1 zeigt eine Übersicht der bereits untersuchten Lokalisationen verschiedener SNAREs in anderen Zelltypen.

Typ	SNARE (Synonym)	Lokalisation	SNARE-Komplex	Referenz
Q _a	Syntaxin 2 (Epimorphin)	PM, intrazelluläre V	SNAP23	(Band and Kuismanen, 2005) (Flaumenhaft et al., 2007) (Low et al., 2000)
	Syntaxin 3	PM, intrazelluläre V	SNAP23, SNAP25, VAMP2, VAMP3, VAMP7	(Galli et al., 1998) (Low et al., 2006) (Sharma et al., 2006) (Curtis et al., 2008)
	Syntaxin 4	PM, Endosomen, intrazelluläre V	SNAP23, VAMP2, VAMP3, VAMP7, VAMP8	(Tian et al., 2008) (Wang et al., 2004) (Rao et al., 2004) (Fields et al., 2007)
	Syntaxin 7	Endosomen, PM	Syntaxin 8, vti1b, VAMP7, VAMP8	(He and Linder, 2008) (Prekeris et al., 1999) (Pryor et al., 2004)
	Syntaxin 13	<i>Recycling</i> Endosomen	Syntaxin 6, vti1a, SNAP25, VAMP2, VAMP3, VAMP4,	(Brandhorst et al., 2006) (Mallard et al., 2002) (Prekeris et al., 1998)
	Syntaxin 16	Golgi-Apparat	Syntaxin 10, Syntaxin 16, vti1a, VAMP3, VAMP4	(Simonsen et al., 1998) (Mallard et al., 2002) (Chua and Tang, 2008) (Ganley et al., 2008)
Q _b	vti1a	Golgi-Apparat	Syntaxin 6, Syntaxin 10, Syntaxin 13, Syntaxin 16, VAMP3, VAMP4	(Brandhorst et al., 2006) (Mallard et al., 2002) (Ganley et al., 2008) (Sehgal et al., 2007)
	vti1b	Späte Endosomen, Lysosomen	Syntaxin 6 Syntaxin 7, Syntaxin 8, VAMP7, VAMP8	(Pryor et al., 2004) (Bilan et al., 2008) (Mascia and Langosch, 2007) (Murray et al., 2005b)
Q _c	Syntaxin 6	Golgi-Apparat	Syntaxin 13, Syntaxin 16, vti1a, vti1b, VAMP3, VAMP4	(Brandhorst et al., 2006) (Mallard et al., 2002) (Kabayama et al., 2008) (Murray et al., 2005b)
	Syntaxin 8	Späte Endosomen, Lysosomen	Syntaxin 7, vti1b, VAMP7, VAMP8	(He and Linder, 2008) (Prekeris et al., 1999) (Pryor et al., 2004)
Q _{bc}	SNAP23 (Syndet)	PM, intrazelluläre V	Syntaxin 2, Syntaxin 3, Syntaxin 4, VAMP3, VAMP7, VAMP8	(Kawanishi et al., 2000) (Sander et al., 2008) (Flaumenhaft et al., 2007) (Low et al., 2006) (Predescu et al., 2005)
	SNAP29	PM, intrazelluläre V	Syntaxin 4, Syntaxin 6, Syntaxin 7	(Hohenstein and Roche, 2001) (Steggmaier et al., 1998) (Schardt et al., 2009, im Druck)
R	VAMP2 (Synaptobrevin2)	intrazelluläre V PM	Syntaxin 3, Syntaxin 4, Syntaxin 13, SNAP23, SNAP25	(Curtis et al., 2008) (Tian et al., 2008) (Prekeris et al., 1998)
	VAMP3 (Cellubrevin)	<i>Recycling</i> Endosom, intrazelluläre V	Syntaxin 4, Syntaxin 6, Syntaxin 10, Syntaxin 16, vti1a, SNAP23	(Hu et al., 2007a) (Fields et al., 2007) (Murray et al., 2005a) (Mallard et al., 2002) (Ganley et al., 2008)
	VAMP4	TGN, Endosomen, PM	Syntaxin 6, Syntaxin 13, Syntaxin 16, vti1a	(Tran et al., 2007) (Brandhorst et al., 2006) (Steggmaier et al., 1999) (Mallard et al., 2002)
	VAMP7 (TI-VAMP)	Späte Endosomen, Lysosomen	Syntaxin 3, Syntaxin 7, Syntaxin 8, vti1b, SNAP23	(Martinez-Arca et al., 2000a) (Martinez-Arca et al., 2000b) (Pryor et al., 2004) (Proux-Gillardeaux et al., 2007)

Tab. 2.1: Übersichtstabelle zur Lokalisation und zu bestehenden SNARE-Komplexen der untersuchten SNARE-Proteine

Verwendete Abkürzungen: Syn, Syntaxin; V, Vesikel; TGN, *trans*-Golgi-Netzwerk; PM, Plasmamembran.

2.5.5 SNARE-Spezifität

Eine Vielzahl an *in vitro* Experimenten zeigen, dass durch die SNARE-Proteine allein keine ausreichende Spezifität in der Bildung der *trans*-SNARE-Komplexe und keine Kontrolle der Zielrichtung des Transports erreicht werden kann. So kann ein SNARE-Protein der gleichen Subfamilie in einem SNARE-Komplex ausgetauscht werden (Fasshauer et al., 1999; Yang et al., 1999). Zudem wurden nicht-spezifische Interaktionen zwischen SNARE-Proteinen des endosomalen und exozytotischen Systems beobachtet, was auf eine nicht ausreichende Spezifität der Paarungen in gleichen Membranen hinweist (Bethani et al., 2007). Deletionen der SNARE-Proteine führen meist nur zu einem milden Phänotyp, was wohl darauf zurückzuführen ist, dass SNARE-Proteine die Funktion eines anderen SNAREs zumindest teilweise übernehmen können, und dazu mit anderen SNARE-Proteinen interagieren (Borisovska et al., 2005; Jahn and Scheller, 2006; Sorensen et al., 2003). Diese Beobachtungen sind, betrachtet man die hohe Konservierung der SNARE-Proteine und v.a. der SNARE-Motive, nicht verwunderlich (Antonin et al., 2002; Sutton et al., 1998). Andererseits zeigen Versuche in Hefezellen (*Saccharomyces cerevisiae*) eine hohe Spezifität der SNARE-Interaktion (Parlati et al., 2000; Paumet et al., 2004). In wie weit von den SNARE-Proteinen allein eine Spezifität in der Bildung des *trans*-SNARE-Komplexes ausgeht, bleibt offen. Zudem stellt sich die Frage, wie ein Vesikel einen Akzeptorkomplex zur Fusion auswählen kann und einen, möglicherweise auf der gleichen Membran sitzenden, anderen Komplex nicht. Obwohl es derzeit keine klare Antwort auf diese Frage gibt, so ist es jedoch denkbar, dass die Bildung des Akzeptorkomplexes stark reguliert ist, und daher *in vivo* eine höhere Spezifität der SNARE-Interaktion erzielt wird, als *in vitro* beobachtet.

2.5.6 Regulatorische Proteine

Zur Regulation des SNARE-Zyklus bedarf es vieler Proteine. Darunter existieren sowohl negative als auch positive Regulatoren (Cai et al., 2007; Malsam et al., 2008). Im Folgenden soll auf die wichtigsten Vertreter kurz eingegangen werden.

2.5.6.1 *Tethering*-Faktoren

Tethering-Faktoren gehören einer sehr heterogenen Proteinfamilie an, können aber in zwei Hauptgruppen unterteilt werden: „*long coiled-coil proteins*“ und „*large hetero-oligomeric complexes*“ (Ungar and Hughson, 2003). Zur ersten Gruppe gehören z.B. die *Tethering*-Faktoren p115/Usol und EEA1. Zur zweiten Gruppe zählen z.B. der Exocyst, der HOPS-Komplex oder TRAPPI/II. Für fast alle *Tethering*-Faktoren sind Interaktionen mit spezifischen Rab- und SNARE-Proteinen beschrieben (Malsam et al., 2008). Ihre

Aufgabe liegt darin, den ersten Kontakt zwischen dem Transportvesikel und der Zielmembran herzustellen (Cai et al., 2007).

2.5.6.2 SM-Proteine

In der Maus werden sieben Mitglieder der SM-Proteine (*Sec1/Munc18-related* proteins) exprimiert. Munc18-1, Munc18-2 und Munc18-3 sind hauptsächlich an der Plasmamembran lokalisiert und binden an die Syntaxine 1, 2, 3 und 4. Die SM-Proteine mSly1 und mVps45 regulieren den vesikulären Transport des Golgi-Apparates und binden dazu an die Syntaxine 5, 18 und 16. Vps33a und Vps33b interagieren mit den SNARE-Proteinen der Endosomen (Hong, 2005; Malsam et al., 2008). Die Funktion der Proteinfamilie ist noch nicht ausreichend untersucht. Bekannt ist, dass SM-Proteine an Syntaxine in der sogenannten geschlossenen Konformation binden, bei der die Habc-Domäne zurückgefaltet ist, und die Bildung des SNARE-Komplexes dadurch blockiert ist. Somit nehmen in diesem Fall SM-Proteine eine negative Regulation vor (Dulubova et al., 1999). Neuere Studien zeigen jedoch, dass die SM-Proteine mSly1, mVps45 und Munc18-c auch an die offene Konformation der Syntaxine binden können (Hu et al., 2007b). Zudem interagieren alle SM-Proteine auch direkt mit *trans*-SNARE-Komplexen, indem sie über eine Interaktion mit Syntaxinen das Zusammenbringen des Komplexes ermöglichen (Burkhardt et al., 2008; Latham et al., 2006; Rodkey et al., 2008; Sudhof and Rothman, 2009).

2.5.6.3 Rab-Proteine

Rab-Proteine sind kleine, kompartiment-spezifische GTPasen, die entweder frei im Zytoplasma (inaktiver GDP-gebundener Zustand) oder an Membranen (aktiver GTP-gebundener Zustand) vorkommen. In Säugertierzellen wurden bereits 66 verschiedene Rab-Proteine identifiziert (Schultz et al., 2000). Bindet ein Rab-Protein an einer Membran, kommt es zur Rekrutierung spezifischer Rab-Effektoren (z.T. *Tethering*-Faktoren). Diese haben Einfluß auf vielseitige Prozesse, wie *Cargo*-Sortierung, Modellierung von Membran-Subdomänen und Regulation der SNARE-Aktivität (Malsam et al., 2008; Zerial and McBride, 2001).

2.5.6.4 Sonstige Regulatoren

Neben den genannten Hauptregulatoren des SNARE-Zyklus gibt es noch weitere Proteine, die die Fusion der Vesikel mit der Zielmembran kontrollieren. So binden die Mitglieder der Munc13-Familie direkt an den N-Terminus von Syntaxinen und bringen diesen in eine offene Konformation (Betz et al., 1997). Einen negativen Regulator stellt Tomosyn dar. Das 130 kDa große, Syntaxin-bindende Protein spaltet Munc18 von der Habc-Domäne der Syntaxine ab, bindet selbst an diese (Cheviet et al., 2006; Malsam et al., 2008;

Sakisaka et al., 2008) und fungiert als eine Art „Platzhalter“ für das noch fehlende R-SNARE (Hatsuzawa et al., 2003; Pobbati et al., 2004). Eine weitere Gruppe der regulatorischen Proteine bilden die Synaptotagmine. In Vertebraten sind 16 verschiedene Familienmitglieder bekannt, die an spezifischen sekretorischen Vesikeln lokalisiert sind und kalziumabhängig die Fusion des Vesikels kontrollieren. So ist z.B. Synaptotagmin I an synaptischen Vesikeln lokalisiert (Marqueze et al., 2000). Synaptotagmin VII hingegen kontrolliert die kalziumabhängige Exozytose lysosomaler Vesikel (Arantes and Andrews, 2006). Gemeinsam mit den Synaptotagminen regulieren auch Complexine die kalziumabhängige Exozytose (Sudhof and Rothman, 2009). In Vertebraten existieren vier verschiedene Complexin-Isoformen (Reim et al., 2005) welche am Vier-Helix-Bündel des SNARE-Komplexes binden und eine Art „Klammer“ bilden (Tang et al., 2006). So wird ohne Kalzium der Akzeptorkomplex stabilisiert, in Anwesenheit von Kalzium löst sich die „Klammer“ und der Vesikel kann fusionieren (Brose, 2008; Malsam et al., 2008; Yoon et al., 2008).

2.5.6.5 NSF und α -SNAP

Wie bereits in Kapitel 2.5.3 beschrieben, werden zum Lösen des *cis*-SNARE-Komplexes die Proteine NSF (*N-ethylmaleimide-sensitive-factor*) und α -SNAP (*α -soluble-NSF-associated-protein*) benötigt (Block et al., 1988; Malsam et al., 2008). NSF ist ein Hexamer und kann nur über drei Adapterproteine α -SNAP binden. Durch die Hydrolyse von ATP entstehen freie, energiereiche, ungefaltete SNAREs. Eine Inaktivierung von NSF *in vivo* führt zum sofortigen Tod der Zelle, da es zu einer Akkumulation von SNARE-Komplexen kommt.

2.5.7 Clostridiale Neurotoxine

Clostridien sind grampositive Bakterien, die sich mit Hilfe von Geißeln fortbewegen. Sie kommen im Verdauungstrakt von Menschen und Tieren und in Böden vor. Für die Neurowissenschaften sind zwei Arten von Clostridien von besonderer Bedeutung – *Clostridium tetani* und *Clostridium botulinum*. Diese Bakterienarten produzieren die clostridialen Neurotoxine Tetanustoxin und Botulinumtoxin (Goonetilleke and Harris, 2004). Beide Toxine zeigen gleiche Merkmale. Sie werden als einzelnes Polypeptid synthetisiert und anschließend durch *post*-translationale Modifikation in eine schwere (*heavy*, H, 100 kDa) und eine leichte (*light*, L, 50 kDa) Kette gespalten, die über eine Disulfidbrücke verbunden sind. Die schwere Kette dient zur Anheftung des Toxins an Neurone, worauf hin es endozytiert werden kann. Anschließend kommt es zur Spaltung der Disulfidbrücke durch Proteasen und die leichte Kette wird ins Zytoplasma der Nervenendigung freigesetzt. Dort agiert diese als Zink-Protease, die spezifisch SNARE-

Proteine spaltet (Brunger et al., 2008; Davletov et al., 2005; Kumaran et al., 2008) (Tab. 2.2). Durch die Spaltung der verschiedenen SNARE-Proteine können synaptische Vesikel nicht freigesetzt werden, es findet somit keine Erregungsweiterleitung statt. Im Fall von Botulinumtoxin bindet das Toxin an neuromuskuläre Endplatten und hemmt dort die Erregungsübertragung vom Neuron zum Muskel, indem die präsynaptische Ausschüttung von Acetylcholin verhindert wird. Der Muskel kann folglich nicht kontrahieren. Es kommt zu einer Lähmung. Im Fall von Tetanustoxin wird das Toxin vom peripheren zum zentralen Nervensystem transportiert und dort endozytiert. Es hemmt die Freisetzung des inhibitorischen Neurotransmitters γ -Aminobuttersäure (GABA, *γ -aminobutyric acid*) und führt so zu Krämpfen (Tetanus, Wundstarrkrampf) (Farrar et al., 2000; McMahon et al., 1993).

Clostridiales Neurotoxin	Zielproteine
Botulinumtoxin: A, E	SNAP25
B, D, F, G	VAMP1, VAMP2, VAMP3
C	Syntaxin 1, Syntaxin 2, Syntaxin 3, SNAP25
Tetanustoxin	VAMP1, VAMP2, VAMP3

Tab. 2.2: Clostridiale Neurotoxine und ihre Zielproteine.

2.6 Fragestellung der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war die Aufklärung der intrazellulären Transportwege von Myelinproteinen und der Kontrolle des zielgerichteten Transports durch SNARE-Proteine. Diese gewährleisten den letzten Schritt des vesikulären Transports, also die Fusion des Vesikels mit der Zielmembran. Dabei wird durch spezifische SNARE-Interaktionen (*trans*-SNARE-Komplexe) die Spezifität der Vesikelfusion kontrolliert. Ziel war es zunächst die oligodendroglial exprimierten SNARE-Proteine zu erfassen und den unterschiedlichen zellulären Transportrouten zuzuordnen. Diese Zuordnung sollte dann als Grundlage für funktionelle Studien zum vesikulären Transport der Myelinproteine dienen. Durch funktionelle Inaktivierung von Kandidaten-SNAREs sollten SNARE-Proteine identifiziert werden, die den Transport von Myelinproteinen zur Plasmamembran und die Fusion von Myelinvesikeln mit der Myelinmembran kontrollieren. Der Transport des Hauptmyelinproteins PLP stand im Mittelpunkt der Arbeit. Die Resultate sollten in geeigneten Mausmodellen bestätigt werden.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Zentrifugen und Zubehör

Zentrifuge / Zubehör	Hersteller
3K20	Sigma-Aldrich, München
Biofuge 17RE	Heraeus, Hanau
Biofuge <i>fresco</i>	Heraeus, Hanau
Megafuge 1.0 R	Heraeus, Hanau
Optima™ MAX-E	Beckman, München
Rotoren: TLA-55, TLS-55, SW40-Ti	Beckman, München

3.1.2 Mikroskope

Mikroskop	Hersteller
DMLB	Leica, Wetzlar
TCS SP5	Leica, Wetzlar

3.1.3 Sonstige Geräte

Gerät	Hersteller
Elektrophoresekammer	Sigma-Aldrich, München
Gel-Elektrophoresekammer, NuPAGE	Invitrogen, Karlsruhe
Gene Pulser	Biorad, München
Image Documentation / UVT-20M	Herolab, Wiesloch
Lightcycler® 1.5	Roche, Mannheim
Nucleofector II	AMAXA, Köln
Photometer Ultrospec 2100 Pro	GE Healthcare, München
Ultra-Turrax	Janke & Kunkel, Staufen

3.1.4 Software

Software	Hersteller
CLC Free Workbench	CLC bio, Aarhus, Dänemark
Endnote 9.0	Wintertree Software Inc., Kanada
Graph Pad Prism 5.00	La Jolla, USA
Illustrator CS2	Adobe, München
Image J	NIH, Bethesda, Maryland
Image-Pro Plus 5.0	Media Cybernetics, Gleichen
LAS AF Lite	Leica, Wetzlar
Photoshop CS2	Adobe, München

3.1.5 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
1-Step Ultra Tetramethylbenzidin-ELISA	Pierce, Rockford, USA
Biorad Protein Assay Farbstoff-Konzentrat	Biorad, München
Dibutyryl-cAMP	Sigma-Aldrich, München
Immobilized NeutrAvidin Protein	Pierce, Rockford, USA
LysoTracker Red DND-99	Molecular Probes, Karlsruhe
Natriumbutyrat	Sigma-Aldrich, München
N-Ethylmaleimid	Sigma-Aldrich, München
Protein-A-Sepharose CL4B	Pharmacia, Freiburg
Streptavidin-HRP	Invitrogen, Karlsruhe
Sulfo-NHS-LC-Biotin	Pierce, Rockford, USA
Super Signal West Pico Luminol / Enhancer	Pierce, Rockford, USA
TPER Tissue Protein Extraction Reagent	Pierce, Rockford, USA
Transferrin-FITC	Molecular Probes, Karlsruhe
Sonstige Chemikalien	Merck, Darmstadt Roth, Karlsruhe Sigma-Aldrich, München

3.1.6 Kits

Kit	Hersteller
PureLink HiPure Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
PureLink Quick Plasmid Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy Plus Mini Kit	Qiagen, Hilden
Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit	Roche, Mannheim
SilverQuest-Kit	Invitrogen, Karlsruhe

3.1.7 Restriktionsenzyme

Restriktionsenzyme wurden von Fermentas (Burlington, Kanada) oder New England Biolabs (Ipswich, USA) bezogen und nach den Angaben des Herstellers verwendet.

3.1.8 Marker

Marker	Hersteller
Bench Mark Pre-stained Western Protein Standard	Invitrogen, Karlsruhe
SeeBlue2 Pre-stained Western Protein Standard	Invitrogen, Karlsruhe
Sigma Marker Wide Range Western Protein Standard	Sigma-Aldrich, München

3.2 Puffer und Nährmedien

3.2.1 Zellkultur

Puffer / Nährmedium	Zusammensetzung
Einfriermedium	70% RPMI 1640; 20% FCS; 10% DMSO
HBSS	4 g/l KCl; 0,6 g/l KH ₂ PO ₄ ; 80 g/l NaCl; 1,13 g/l Na ₂ HPO ₄ x2H ₂ O; 10 g/l α-D-Glucose; 100 mg/l Phenolrot
Poly-L-Lysin	200 mM Poly-L-Lysin; 0,1 M Borsäure
Sato/B27 (primäre Oligodendrozyten)	13,4 g/l DMEM; 2 g/l NaHCO ₃ ; 20 ml/l B27; 0,011% Pyruvat; 500 nM Triiodo-L-Thyronin; 500 mM L-Thyroxin; 1% hitzeinaktiviertes Pferdeserum (HS)
Sato-Medium (Oli-neu)	13,4 g/l DMEM; 2 g/l NaHCO ₃ ; 0,01 mg/ml Transferrin; 100µg/l Insulin; 200 nM Progesteron; 100 µM Putrescin; 220 nM Natriumselenit; 500 nM Triiodo-L-Thyronin; 500 mM L-Thyroxin; 25 µg/ml Gentamycin; 1% hitzeinaktiviertes Pferdeserum (HS)
Trypsin/EDTA	0,01% Trypsin; 0,02% EDTA in HBSS

3.2.2 Molekularbiologie

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

3.2.3 Proteinbiochemie

Puffer / Nährmedium	Zusammensetzung
4x Probenpuffer (SDS-PAGE)	200 mM Tris/HCl (pH 6,8); 40% Glycerin; 10% SDS; 0,4% Bromphenolblau; 400 mM DTT

5x Elektrophoresepuffer (Tris-Glycin)	125 mM Tris; 1,25 M Glycin; 0,5% SDS (pH 8,3)
20x Elektrophoresepuffer (Bis-Glycin NuPAGE MES)	50 mM MES; 50 mM Tris; 0,1% SDS; 1 mM EDTA (pH 7,3)
Blockierlösung (Immunzytochemie)	PBS; 10% Pferdeserum
Blockierlösung (Westerblot)	PBST; 4% Milchpulver
ECL-Lösung	Lösung A: 200 ml 0,1 M Tris-HCl (pH 8,6); 50 mg Luminol Lösung B: 11mg para-hydroxy Cumarsäure Nutzung: 1 ml Lösung A + 0,3 µl H ₂ O ₂ + 100 µl Lösung B
Fixierlösung (Immunzytochemie)	4% Paraformaldehyd (PFA) in PBS
Homogenisierungspuffer	0,25 M Saccharose; 1 mM EDTA; 1 mM Mg-Acetat; 1,6 mM Na ₂ SO ₄ ; 10 mM HEPES/NaOH (pH 7,2)
HBSS ⁺	0,15% MgSO ₄ (Stock: 10%) in HBSS
Moviol	2,4 g Moviol 4-88; 6 g Glycerin; 6 ml H ₂ O; 12 ml 0,2 M Tris (pH 8,5)
PBS	150 mM NaCl; 8 mM Na ₂ HPO ₄ ; 1,7 mM NaH ₂ PO ₄
PBST	PBS; 0,1% Tween20
Permeabilisierungslösung	0,1% TritonX-100 in PBS
Ponceau S	0,2% Ponceau S in 3% TCA
Proteaseinhibitoren	10 mg/ml Leupeptin (1:1000); 1 mg/ml Aprotinin in HEPES (1:1000); 5 mg/ml Pepstatin in DMSO (1:5000); 17,4 mg/ml PMSF in Methanol (1:100)
RIPA-Puffer	50 mM Tris/HCl (pH 7,2); 150 mM NaCl; 1% TritonX-100; 1% Deoxycholat; 0,1% SDS; 1 mM 1,4-Dithiothreitol; Proteaseinhibitoren; 1 mM N-Ethylmaleimid
Sammelgelpuffer	1 M Tris (pH 6,8)
Transferpuffer (Westerblot)	24 mM Tris; 192 mM Glycin; 20% Methanol (pH 10,4)
Trenngelpuffer	1 M Tris (pH 8,8)
Triton-Lysis-Puffer	1% Triton-X100; 50 mM Tris; 150 mM NaCl; Proteaseinhibitoren

3.3 Antikörper

3.3.1 Primäre Antikörper

Epitop	Klon	Spezies	Verdünnung	Herkunft
α -c-myc	9E10	Maus	1:100 (WB) 1:20 (IF)	Sigma-Aldrich, München
BIP/GRP78	40	Maus	1:250 (WB)	BD Transduction Laboratories, San Jose, USA
CNP	11-B5	Maus	1:500 (WB)	Sigma-Aldrich, München
eGFP		Kaninchen	1:2000 (WB)	Clontech Mountain View, Kanada
GM130	35	Maus	1:50 (IF)	BD Transduction Laboratories, San Jose, USA
LAMP1	1D4B	Ratte	1:500 (WB) 1:50 (IF)	BD Transduction Laboratories, San Jose, USA
MOG	8-18-C5	Maus	1:1000 (WB)	C. Linington, Aberdeen, UK
myc-Tag		Kaninchen	1:200 (IF)	Cell Signaling Techn. Inc., Denver, USA
Na ⁺ -K ⁺ - ATPase	464.6	Maus	1:5000 (WB)	Novus Biologicals, Littleton, USA
NG2	AN2	Ratte	1:50 (IF)	Niehaus et al., 1999
PLP (aa3)		Ratte	1:10 (WB) 1:10 (IF)	M. Lees, Waltham, USA
PLP (P6)		Kaninchen	1:500 (IF)	C. Linington, Aberdeen, UK
PLP (O10)	479	Maus	1:10 (WB) unverd. (IF)	M. Schachner, Hamburg
SNAP23		Kaninchen	1:1000 (WB) 1:100 (IF+IP)	Synaptic Systems, Göttingen
SNAP29		Kaninchen	1:1000 (WB) 1:100 (IF)	Synaptic Systems, Göttingen
Syntaxin 2		Kaninchen	1:1000 (WB) 1:100 (IF)	Synaptic Systems, Göttingen
Syntaxin 3		Kaninchen	1:1000 (WB) 1:100 (IF)	Synaptic Systems, Göttingen
Syntaxin 4		Kaninchen	1:5000 (WB) 1:500 (IF+IP)	Synaptic Systems, Göttingen
Syntaxin 6		Kaninchen	1:5000 (WB) 1:500 (IF+IP)	Synaptic Systems, Göttingen
Syntaxin 7		Kaninchen	1:1000 (WB) 1:100 (IF)	Synaptic Systems, Göttingen
Syntaxin 8		Kaninchen	1:1000 (WB) 1:100 (IF+IP)	Synaptic Systems, Göttingen
Syntaxin 13		Kaninchen	1:2000 (WB) 1:200 (IF+IP)	Synaptic Systems, Göttingen
Syntaxin 16		Kaninchen	1:1000 (WB) 1:100 (IF)	Synaptic Systems, Göttingen
Transferrin- Rezeptor	H68.4	Maus	1:500 (IF)	Zymed Laboratories, San Francisco, USA
Tubulin	DM1A	Maus	1:1000 (WB) 1:5000 (WB)	Sigma-Aldrich, München

VAMP2	69.1	Maus	1:1000 (WB) 1:50 (IF)	R. Jahn, Synaptic Systems, Göttingen Synaptic Systems, Göttingen Synaptic Systems, Göttingen
VAMP3		Kaninchen	1:2500 (WB) 1:250 (IF+IP)	
VAMP4		Kaninchen	1:1000 (WB) 1:100 (IF+IP)	
VAMP7	158.2	Maus	1:1000 (WB)	
vti1a	45	Maus	1:2500 (WB) 1:250 (IF)	T. Galli, Paris, Frankreich Covalab, Villeurbanne, Frankr. BD Transduction Laboratories San Jose, USA
vti1b	7	Maus	1:1000 (WB) 1:100 (IF)	BD Transduction Laboratories, San Jose, USA

WB, Westernblot; IF, Immunfluoreszenz; IP, Immunpräzipitation; unverd., unverdünnt

3.3.2 Sekundäre Antikörper

Spezies	Antikörper gegen	Konjugat	Verdünnung
Esel	Ratte	Cy2	1:50
Kaninchen	Ziege	Cy2	1:100
Kaninchen	Maus	-	1:100
Ziege	Kaninchen	HRP	1:10000
Ziege	Maus	HRP	1:10000
Ziege	Maus (spezifisch)	HRP	1:10000
Ziege	Ratte	HRP	1:10000
Ziege	Ratte	HRP	1:10000
Ziege	Kaninchen	Cy3	1:1000
Ziege	Maus	Cy3	1:1000
Ziege	Maus (spezifisch)	Cy3	1:1000
Ziege	Ratte	Cy2	1:50
Ziege	Ratte (spezifisch)	Cy2	1:50
Ziege	Kaninchen	Cy5	1:100
Ziege	Maus	Cy5	1:100
Ziege	Maus (spezifisch)	Cy5	1:100
Ziege	Ratte	Cy5	1:100
Ziege	Ratte (spezifisch)	Cy5	1:100

Alle Sekundären Antikörper wurden von Dianova, Hamburg bezogen.

HRP, Meerrettichperoxidase (*horse raddish peroxidase*)

3.4 Plasmide

3.4.1 VAMP3-Plasmid

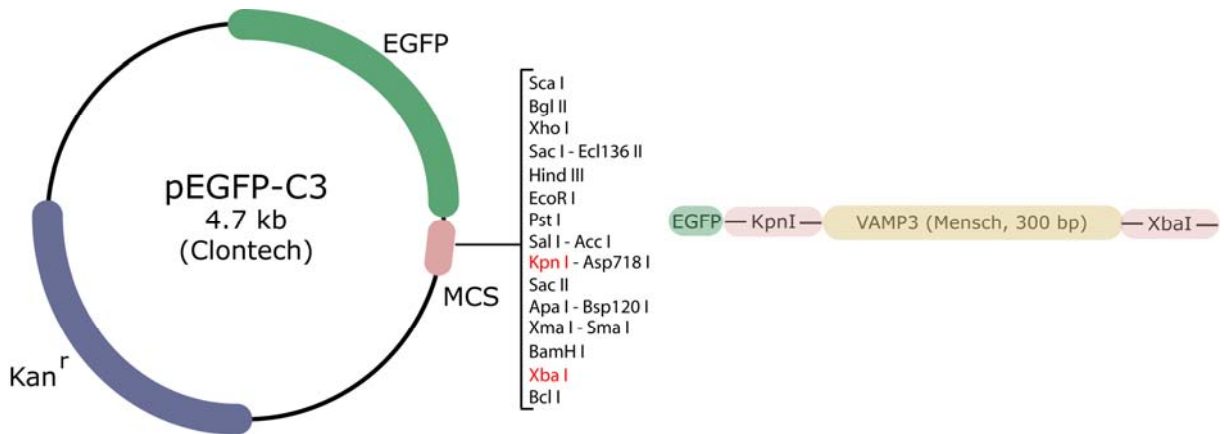


Abb. 3.1: VAMP3-Expressionsvektor

Zur Herstellung des VAMP3-Expressionsvektors wurden die Sequenz (Mensch) von VAMP3 (Cb, Cellubrevin) zwischen den Restriktionsschnittstellen KpnI und XbaI der *Multiple Cloning Site* des pEGFP-C3-Vektors einkloniert. Das resultierende Konstrukt hat eine Größe von 5,0 kb und kann mittels Zugabe von Kanamycin selektiert werden. Das VAMP3-Konstrukte wurden von T. Galli (Paris, Frankreich) zur Verfügung gestellt (Galli et al., 1998; Martinez-Arca et al., 2003a).

3.4.2 VAMP7-Plasmide

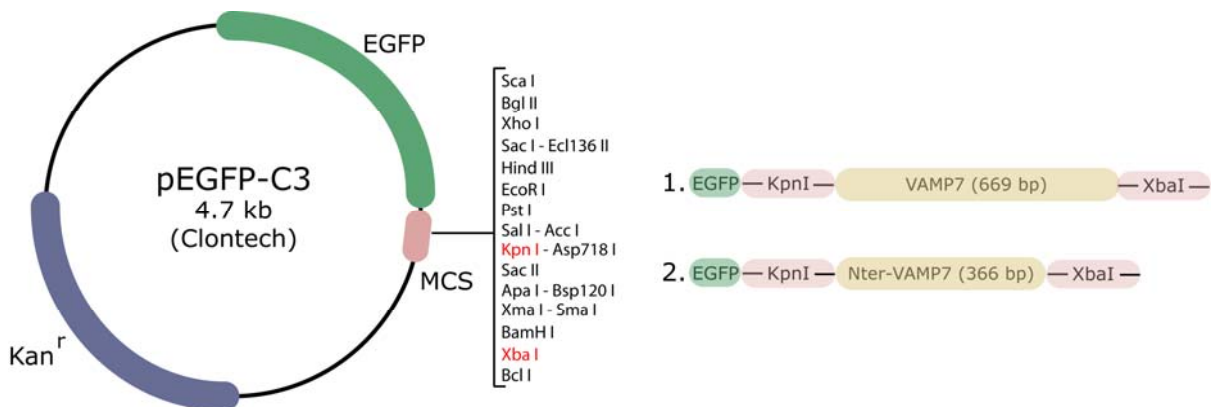


Abb. 3.2: VAMP7-Expressionsvektoren

Zur Herstellung der VAMP7-Expressionsvektoren wurden die Sequenzen (Ratte) von VAMP7 (1.) bzw. dem N-Terminus von VAMP7 (2.), zwischen den Restriktionsschnittstellen KpnI und XbaI der *Multiple Cloning Site* des pEGFP-C3-Vektors einkloniert. Das resultierende Konstrukt hat eine Größe von 5,3 kb (1.) bzw. 5,0 kb (2.) und kann mittels Zugabe von Kanamycin selektiert werden. Die VAMP7-Konstrukte wurden von T. Galli (Paris, Frankreich) zur Verfügung gestellt (Martinez-Arca et al., 2000b).

3.4.3 Syntaxin-Plasmide

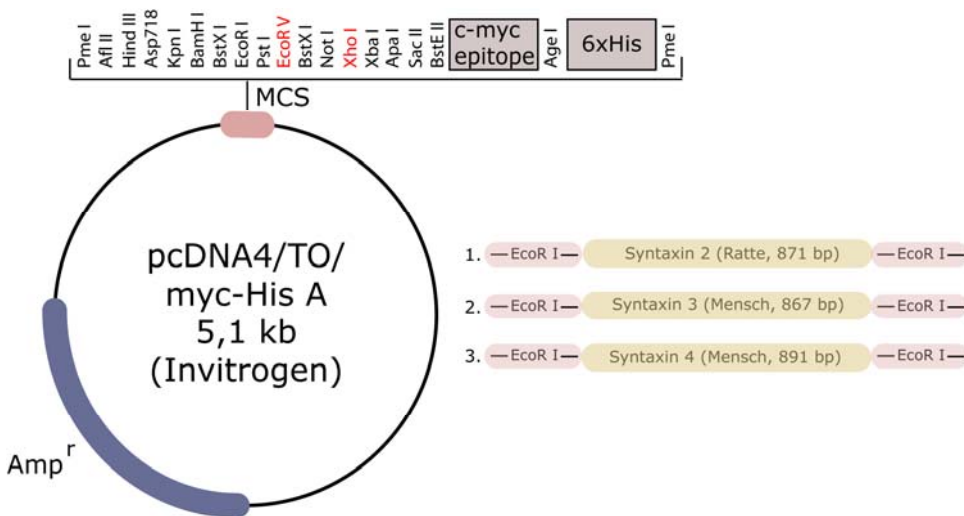


Abb. 3.3: Syntaxin2-, 3- und 4-Expressionsvektoren

Zur Herstellung der Syntaxin 2- (1.), Syntaxin 3- (2.) und Syntaxin 4 (3.) -Expressionsvektoren wurden die jeweilige Sequenzen (Syntaxin 2 aus Ratte; Syntaxin 3 und Syntaxin 4 aus Mensch) zwischen den Restriktionsschnittstellen EcoRI und XhoI der *Multiple Cloning Site* des pcDNA4/TO/myc-HisA-Vektors einkloniert. Die resultierenden Konstrukte haben eine Größe von 5,9 kb und lassen sich mittels Ampizillin selektieren. Zudem tragen alle Konstrukte ein *myc-tag* (Syntaxin 3: 2x myc) und 6 *His-tags*. Die Syntaxin-Konstrukte wurden von T. Weimbs (Santa Barbara, USA) zur Verfügung gestellt.

3.4.4 PLP-Plasmid

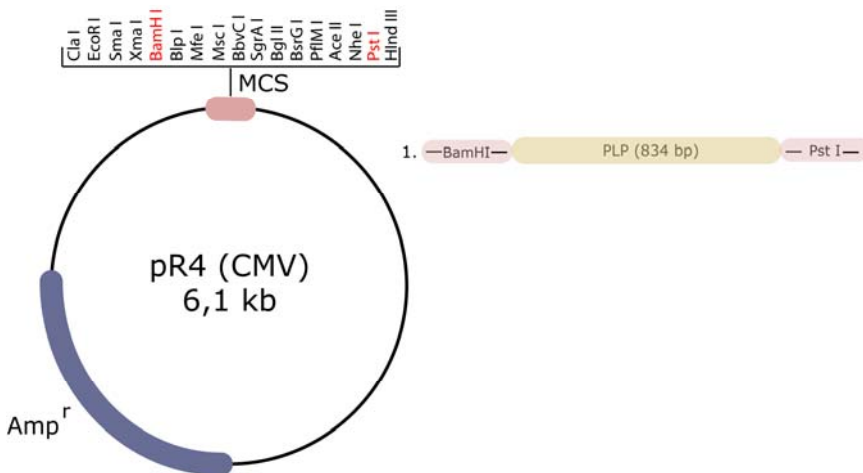


Abb. 3.4: PLP-Expressionsvektor

Zur Herstellung des PLP-Expressionsvektors wurde PLP zwischen den Restriktionsschnittstellen BamHI und PstI der *Multiple Cloning Site* des pR4-Vektors einkloniert. Das resultierende Konstrukt hat eine Größe von 6,9 kb und kann mit Ampizillin selektiert werden.

3.4.5 PLP-eGFP-Plasmid zur Herstellung der stabilen Zell-Linie

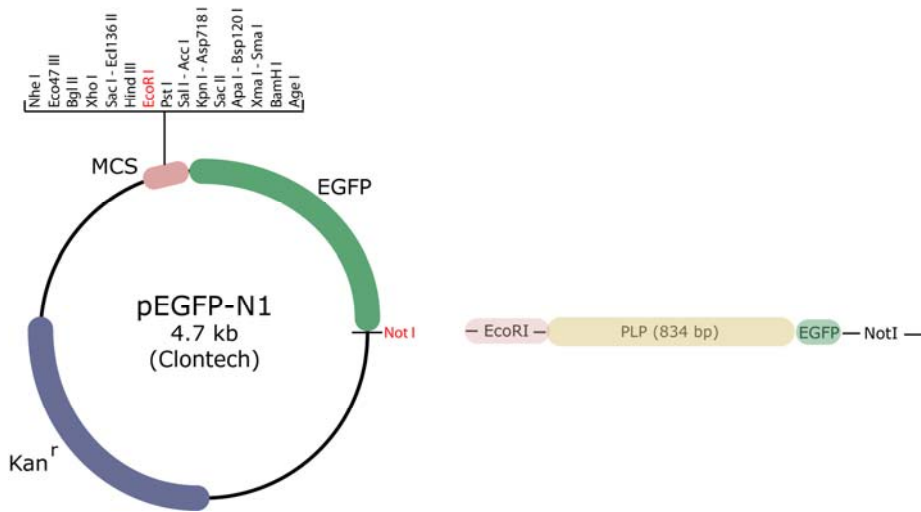


Abb. 3.5: PLP-eGFP-Expressionsvektor

Zur Herstellung des PLP-eGFP-Expressionsvektors wurde zunächst die EGFP-Sequenz aus dem EGFP-N1-Vektor ausgeschnitten und mit der PLP-Sequenz fusioniert. Das Fusionsprodukt wurde zwischen den Restriktionsschnittstellen EcoRI (in der *Multiple Cloning Site*) und NotI einkloniert. Die stabile Zell-Linie Oli-neu PLP-eGFP wurde von K.-A. Nave (Göttingen) zur Verfügung gestellt (Trajkovic et al., 2006).

3.4.6 Tetanustoxin-Plasmide

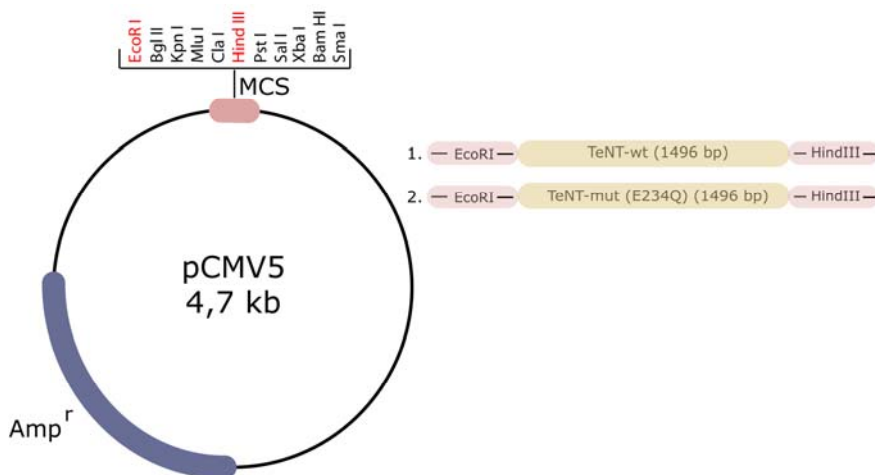


Abb. 3.6: TeNT-Expressionsvektor

Zur Herstellung der TeNT-Expressionsvektoren wurden die Sequenzen von TeNT-wt (1.) bzw. TeNT-mut (E234Q: Punktmutation an Aminosäure 234, Austausch von Glutaminsäure zu Glutamin, keine proteolytische Aktivität, 2.), zwischen den Restriktionsschnittstellen EcoRI und HindIII der *Multiple Cloning Site* des pCMV5-Vektors einkloniert. Die resultierenden Konstrukte haben eine Größe von 6,2 kb und können mittels Zugabe von Ampizillin selektiert werden. Die TeNT-Konstrukte wurden von T. Binz (Hannover) zur Verfügung gestellt (McMahon et al., 1993).

3.5 Primer

Primer (Metabion, Martinsried)	Sequenz
Actin left 1009-1028	TGA CAG GAT GCA GAA GGA GA
Actin right 1066-1083	CGC TCA GGA GGA GCA ATG
PLP left 598-617	GCT AGG ACA TCC CGA CAA GT
PLP right 646-665	CAA ACA CCA GGA GCC ATA CA
Syn3 left 1130-1150	CAA CGG CAG CTT GAA ATT ACT
Syn3 right 1180-1200	TTG CCA CTC TCC AAC ATC TCT
Syn4 left 728-747	TGA AGA TCA CCA ATG CTG GA
Syn4 right 819-838	GAG TCA CCT GCG TGT CCT TC
VAMP3 left 250-269	TCG CAG TTT GAA ACA AGT GC
VAMP3 right 309-327	GAT CCC TAT CGC CCA CAT C
VAMP7 left 101-119	GCG ACC CTA GGA GGA CCT T
VAMP7 right 166-187	AGA ATG GCC ATG ACT TCA ATC T

3.6 Sonden

Sonde	Hersteller
Universal ProbeLibrary Probes Probe #106 (Actin)	Roche, Mannheim
Universal ProbeLibrary Probes Probe #105 (PLP)	Roche, Mannheim
Universal ProbeLibrary Probes Probe #17 (Syntaxin 3 und 4)	Roche, Mannheim
Universal ProbeLibrary Probes Probe #31 (VAMP3)	Roche, Mannheim
Universal ProbeLibrary Probes Probe #78 (VAMP7)	Roche, Mannheim

3.7 Small interfering RNAs

siRNA (Qiagen, Hilden)	Sequenz
VAMP3 (Mm_VAMP3_1_HPsiRNA)	Sense: r(GAU UAU UCU CCG UUU GUA A)dTdT Antisense: r(UUA CAA ACG GAG AAU AAU C) dTdT
VAMP7 (Mm_Sybl1_1_HPsiRNA)	Sense: r(CCU UGU AAA UGA UAC ACA A)dTdT Antisense: r(UUG UGU AUC AUU UAC AAG G)dAdG

3.8 Zellkultur

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen an einem *Laminar-Flow*-Arbeitsplatz durchgeführt. Verwendete Nährmedien und Puffer wurden zuvor autoklaviert oder steril filtriert. Die Zellen wurden bei 37°C und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die Zell-Linien Oli-neu und Oli-neu PLP-eGFP wurden bei 5%, primäre Oligodendrozyten bei 8% CO₂ gehalten.

3.8.1 Präparation primärer Oligodendrozyten

3.8.1.1 Präparation der Gehirne

Zur Präparation primärer Oligodendrozyten wurden NMRI- und C57/Black6-Mäuse der Stadien E14 bis E16 verwendet. Die Primärkulturen wurden gemäß dem Protokoll von Trotter et al. präpariert (Trotter and Schachner, 1989). Nach Entnahme der Gehirne und dessen Befreiung von Hirnhäuten wurden diese in 1%iger Trypsinlösung in HBSS inkubiert und in HBSS⁺ gewaschen. Um eine Einzelzellsuspension zu erhalten wurden die Zellen in einer 0,05%igen DNase-Lösung durch eingeengte Pasteurpipetten dissoziiert. Nach Zentrifugation bei 130 g für 10 min. (4°C) wurde das Zellpellet in HBSS⁺ resuspendiert und erneut in HBSS⁺ gewaschen und zentrifugiert. Die gemischten Gehirnzellen wurde in DMEM, 10% Pferdeserum (*horse serum*, HS) resuspendiert und auf Poly-L-Lysin-beschichtete Kulturflaschen ausplattiert (ca. $3,75 \times 10^6$ Zellen / cm²).

3.8.1.2 Neuronenkill und Abklopfen der Makrophagen

5 Tage nach der Präparation der Gehirne wurden, mittels einer komplementvermittelten Immunzytolyse, die Neuronen aus den gemischten Gehirnkulturen entfernt. Dazu wurden die Zellen für 1 h mit dem monoklonalen M5-Antikörper (358, Verdünnung 1:10) und Meerschweinchenkomplement bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit DMEM, 10% HS gewaschen und in DMEM, 10% HS, 0,5 µg/ml Insulin weiter kultiviert. 11 Tage nach der Präparation der gemischten Gehirnkultur wurden, durch leichtes Klopfen der Kulturflasche, Makrophagen abgelöst und mit DMEM, 10% HS abgewaschen.

3.8.1.3 Oligodendrozyten-*Shake*

14 Tage nach der Präparation hatte sich am Boden der Kulturschale ein dichter Astrozytenrasen gebildet. Die darauf aufsitzenden Oligodendrozyten wurden durch mehrmaliges, kräftiges Schütteln abgelöst. Nach Zentrifugation der Oligodendrozyten bei 130 g für 10 min. (4°C) wurden diese in Sato/B27 resuspendiert und auf Poly-L-Lysin-beschichtete Kulturgefäße oder Deckgläser mit einer Dichte von ca. $1,3 \times 10^5$ Zellen /

cm² ausgesät. Dem Medium wurden zudem 10 ng/ml PDGF und 5 ng/ml bFGF zugesetzt (Colognato and ffrench-Constant, 2004; Miller, 2002).

3.8.2 Die Zell-Linien Oli-neu und Oli-neu PLP-eGFP

Die Zell-Linie Oli-neu entstand durch Immortalisierung muriner, primärer Oligodendrozytenvorläuferzellen mittels Onkogen transfer des *t-neu*-Gens (Jung et al., 1995).

Die Zell-Linie Oli-neu PLP-eGFP exprimiert stabil ein PLP-eGFP-Fusionsprotein. Zur Herstellung wurde eGFP C-terminal an PLP kloniert. Das Fusionsprodukt wurde anschließend in den Expressionsvektor pEGFP-N1 (Clontech, Mountain View, USA) einkloniert (Kap. 3.4.5). Dabei wurden die Restriktionsschnittstellen EcoRI und NotI genutzt. Zur Herstellung einer stabilen Linie wurden Oli-neu Zellen mit den Vektoren pPLP-eGFP-N1 (Abb. 3.5) und pMSCV-hygro (Clontech, Mountain View, USA) co-transfiziert und mittels Hygromycin-Behandlung selektiert. Die Zell-Linie Oli-neu PLP-eGFP wurde von K.-A. Nave (Göttingen) zur Verfügung gestellt (Trajkovic et al., 2006).

3.8.2.1 Passagieren, Einfrieren und Auftauen

Die Kultivierung der Zell-Linien erfolgte in Sato-Medium. Um den Zellen ausreichend Nährstoffe zur Verfügung zu stellen und ein zu dichtes Wachsen der Zellen im Kulturgefäß zu verhindern, wurden diese regelmäßig passagiert. Dazu wurden die Zellen durch Spülen mit warmer Trypsin/EDTA-Lösung vom Zellkulturgefäß abgelöst. Die Wirkung der Protease wurde durch Zugabe von kaltem PBS, 10% HS abgestoppt und die Zellen bei 130 g für 10 min. (4°C) zentrifugiert. Nach Resuspension in Sato-Medium wurden die Zellen in gewünschter Dichte auf neue, mit Poly-L-Lysin beschichtete Kulturgefäße ausgesät.

Zur Lagerung wurden die Zellen einer konfluent bewachsenen 180 cm² - Zellkulturschale abtrypsinisiert, zentrifugiert und das Pellet in 3 ml Einfriermedium resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen für 24 h bei -80°C und langfristig in flüssigem Stickstoff gelagert.

Das Auftauen erfolgte im 37°C-Wasserbad. Um eine Schädigung der Zellen durch DMSO zu verhindern, wurden die Zellen zügig aufgetaut und in PBS, 10% HS verdünnt. Nach einer 10minütigen Zentrifugation bei 130 g (4°C) und Resuspension in Sato-Medium wurden die Zellen auf ein 80 cm²-Zellkulturgefäß ausgesät.

3.8.3 Transiente Transfektion von Plasmiden

Als Transfektion wird in der Zellbiologie das Einbringen von Fremd-DNA in eukaryotische Zellen bezeichnet.

3.8.3.1 Elektroporation

Bei Oli-neu oder Oli-neu PLP-eGFP Zellen eignet sich zur Transfektion u.a. die Methode der Elektroporation. Dabei wird die Zellmembran durch Spannungsimpulse für DNA permeabel gemacht. Zur Transfektion wurden 2×10^6 Zellen in 600 μ l Sato-Medium aufgenommen und in einer Elektroporationskuvette je nach Plasmid (Kap. 3.4) mit 10-20 μ g DNA vermischt. Nach einer Inkubationszeit von 5 min. wurden die Zellen bei 220 V und 950 μ F elektroporiert. Nach einer weiteren fünfminütigen Inkubationszeit wurden die Zellen auf Zellkulturgefäße oder Deckgläser ausgesät.

3.8.3.2 AMAXA Nukleofektion

Nukleofektion ist eine spezielle Art der Elektroporation, bei der bestimmte Lösungen ein Einbringen der DNA in den Zellkern ermöglichen. Dazu wurden 1×10^6 Oli-neu Zellen in 100 μ l der AMAXA-Nukleofectlösung (*Basic Nucleofector Kit Primary Neurons*) resuspendiert und mit 2-5 μ g der Plasmid-DNA in einer Elektroporationskuvette vermischt. Nach der Nukleofektion (Programm O-005) wurden die Zellen für 7 min. in RPMI-Medium inkubiert und anschließend mit einer Dichte von $3,5 \times 10^4$ Zellen / cm^2 ausplattiert.

3.8.4 Transfektion von *small interfering RNAs* mittels AMAXA Nukleofektion

Die AMAXA-Nukleofektion kann auch zur Transfektion von siRNAs (*small interfering RNAs*) in Oli-neu Zellen genutzt werden. *Small interfering RNAs* (siRNAs) sind 21 – 28 Nukleotide lange RNA-Moleküle, die im Zytoplasma von der RNase III *Dicer* aus langen doppelsträngigen RNAs herausgeschnitten werden. Anschließend werden sie in einen Proteinkomplex RISC (*RNA-induced silencing complex*) eingebaut und binden an die komplementäre Ziel-mRNA. So wird der RISC-Komplex mit seinen RNA-Helikasen- und Nuklease-Aktivitäten in räumliche Nähe gebracht. Die Folge ist ein Entwinden und Spalten der mRNA. Da diese mRNA nun in ungeschützter Form vorliegt, wird sie durch intrazelluläre Nukleasen abgebaut. Dieser Mechanismus dient zum einen dem Abbau fremder RNA, z.B. von Viren, andererseits auch der zellinternen Regulation. In der molekularen Forschung werden bevorzugt synthetisch hergestellte siRNAs eingesetzt, um die Expression spezifischer Zielgene zu verringern. Dieser Gen-*Knockdown* ermöglicht es, Hinweise auf die physiologische Bedeutung des Gens zu erhalten. Zur Transfektion der siRNAs wurden nach dem gleichen Prinzip wie bei Plasmiden (Kap. 3.8.3.2) die Zellen mit

160 pmol der entsprechenden siRNA (Kap. 3.7) vermischt, elektroporiert (Programm O-005) und ausgesät.

3.8.5 Natriumbutyrat und dbcAMP

Zur Steigerung der Plasmidexpression wurde 2-3 h nach der Transfektion 2 mM Natriumbutyrat zu den Zellen gegeben. Natriumbutyrat ist ein Hemmstoff der Histondeacetylasen (HDACs), welche durch Deacetylierung der Histon-N-Termini eine positive Ladung der Histone herbeiführen. Die erhöhte Affinität zur DNA blockiert diese für Transkriptionsfaktoren, so dass die Transkription herunterreguliert wird. Durch die Zugabe von Natriumbutyrat wird somit eine verstärkte Transkription der Plasmid-DNA erreicht.

Ebenfalls 2-3 h nach der Transfektion wurde 1 mM dibutyryl-zyklisches AMP (dbcAMP) zugegeben. Zyklisches AMP aktiviert Proteinkinasen vom Typ A (PKA). Dies führt über eine Phosphorylierung verschiedener zellulärer Proteine zu vielfältigen Effekten, wie z.B. die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren. Dies bewirkt die Transkription cAMP-induzierbarer Gene. Der Dibutyryl-Rest sorgt dabei lediglich für die Membrangängigkeit des zyklischen AMPs. Nach Zugabe von dbcAMP ist eine deutliche Differenzierung der oligodendroglialen Vorläuferzelle Oli-neu zu beobachten. Nach Transfektion der Zellen mit PLP wird dieses zudem zur Plasmamembran transportiert (Abb. 4.7). Durch die Zugabe kann somit die natürliche Differenzierung primärer Oligodendrozyten annähernd imitiert werden, bei der es ebenfalls zu einem Transport von endosomalem PLP zur Plasmamembran kommt (Kap. 4.7).

3.9 Molekularbiologie

3.9.1 Transformation

Als Wirtsbakterium für die Transformation der Plasmid-DNA (Kap. 3.4) wurden hitzekompetente *E.coli* TOP10F verwendet. 60 µl der Bakterien wurden dazu mit 50 ng Plasmid-DNA vermischt und für 30 min. auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte für 2 min. bei 42°C. Anschließend wurde die Bakteriensuspension mit 1 ml LB-Medium versetzt und für 30 min. bei 37°C inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde zur Selektion transformierter Bakterien auf LB-Platten mit, dem Plasmid entsprechenden, Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.9.2 Isolierung von Plasmid-DNA

Zur Isolierung von geringen Mengen Plasmid-DNA wurden 5 ml antibiotikum-haltiges LB-Medium mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Bei größerem Plasmid-Bedarf wurden 200 ml antibiotikum-haltiges LB-Medium mit Bakterien, meist aus einem Glycerolstock, versetzt und ebenfalls über Nacht inkubiert. Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe der *Kits* von Qiagen (*PureLink Quick Plasmid Miniprep Kit* bzw. *PureLink HiPure Plasmid Maxi Kit*) nach den Angaben des Herstellers.

3.9.3 Restriktionsverdau

Für einen analytischen Restriktionsverdau wurde 0,2 – 1 µg DNA mit den entsprechenden Restriktionsenzymen (Kap. 3.6.1), dem entsprechenden Puffer (nach Herstellerangaben) und nukleasefreiem Wasser für 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit Probenpuffer versetzt und mittels einer Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

3.9.4 Agarose-Gelelektrophorese

Bei der Agarose-Gelelektrophorese wird eine Auftrennung von Nukleinsäurefragmenten nach ihrer Größe erreicht. Es wurden Gele mit einer Agarosekonzentration von 1% hergestellt. Dazu wurde die Agarose in 50 ml TAE-Puffer gelöst und mit 0,5 µg / ml Ethidiumbromid versetzt. Nach dem Ausgießen, Erhärten und Beladen der Gele wurden die Nukleinsäurefragmente bei 45 V aufgetrennt.

3.9.5 RNA-Isolierung

Zur Isolierung der RNA primärer Oligodendrozyten wurden $2,1 \times 10^5$ Zellen / cm^2 ausgesät und je nach Versuchsansatz für 1, 3, 5 oder 7 Tage in Kultur gehalten. Anschließend wurden die Zellen vom Zellkulturgefäß abtrypsiniert und bei 130 g für 10 min. pelletiert. Das Pellet wurde in 350 μl Lysis-Puffer des „Qiagen – RNeasy Plus Mini Kits“ resuspendiert. Die weitere Isolierung der RNA erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

3.9.6 cDNA-Synthese

Mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase kann aus RNA die dazu komplementäre DNA (cDNA) hergestellt werden. Die Synthese wurde mit dem *Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit* der Firma Roche durchgeführt. Als Primer wurden *random hexamer* Oligonukleotide gewählt. Diese bestehen aus sechs zufällig zusammengesetzten Nucleotiden und binden an alle Arten der RNA, so dass nicht nur die mRNA in cDNA umgeschrieben wird. Zur Synthese wurde 1 μg der isolierten Gesamt-RNA (Kap. 3.9.5) eingesetzt. Die weiteren Schritte erfolgten nach den Angaben des Herstellers.

3.9.7 Quantitative Real-Time-PCR

Die quantitative *Real-Time-PCR* ist eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren, die auf dem Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion beruht und zusätzlich die Quantifizierung der gewonnenen Nukleinsäuren ermöglicht. Die Quantifizierung erfolgt hierbei mittels Fluoreszenzmessungen, wobei die Fluoreszenz proportional mit der Menge der *PCR*-Produkte zunimmt. Die quantitative *Real-Time-PCR* wurde mit Hilfe des *Lightcycler® 1.5 Master* (Roche, Mannheim) durchgeführt. Die relative Gen-Expression wurde mit Hilfe des *Relative Expression Software Tool* (REST© Pfaffl, Horgan) ermittelt, wobei β -Aktin als Referenz-Gen diente.

3.9.8 Konzentrationsbestimmung von DNA- oder RNA-Lösungen

Die Konzentration einer DNA- oder RNA-Lösung wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm in einer Quarzküvette bestimmt. Aus der Extinktion der Lösung kann die Konzentration anhand des folgenden Verhältnisses berechnet werden: $\text{OD}_{260} = 1$ entspricht 50 μg / ml doppelsträngige DNA; 33 μg / ml einzelsträngige DNA bzw. 40 μg / ml RNA. Zudem gibt das Verhältnis der Nukleinsäure-Absorption (OD_{260}) zur Protein-Absorption (OD_{280}) Auskunft über die Reinheit einer DNA- oder RNA-Lösung.

3.10 Proteinbiochemie

3.10.1 Zellaufschluss und Herstellung eines kernfreien Überstandes

3.10.1.1 Gehirn-Lysate

Zur Herstellung von Gehirn-Lysaten wurde 10 ml *T-PER Tissue Protein Extraction Reagent* (Pierce, Rockford, USA) / 1 g Gehirnmasse verwendet. Dazu wurden die Gehirne im Puffer mit Hilfe eines Ultra-Turrax homogenisiert und anschließend für 1 h bei 4°C inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation für 10 min. bei 300 g (4°C) um die Zellkerne abzutrennen. Der Überstand wurde bei – 80°C gelagert.

3.10.1.2 Triton-Lyse

Zur Herstellung eines Triton-Lysats wurden Oli-neu Zellen oder primäre Oligodendrozyten zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit Triton-Lysis Puffer vom Zellkulturgefäß gekratzt. Nach einer 30minütigen Inkubationszeit bei 4°C (Rotor) wurden die Zellkerne bei 300 g für 10 min. (4°C) abzentrifugiert und der Überstand abgenommen.

3.10.1.3 *Cellcracker*

Ziel dieses Schrittes war es, möglichst viele Zellen aufzuschließen, andererseits aber die Organellmembranen intakt zu belassen. Es wurden 2×10^6 Zellen in 800 µl kaltem Homogenisierungspuffer vom Zellkulturgefäß gekratzt und die Zellsuspension durch dreimaliges Aufziehen mit einer 22 x G-Kanüle vereinzelt. Nach dem Spülen des Cellcrackers, bei dem der Zwischenraum des Gehäuses und der Metallkugel 12 µm betrug, wurde die Zellsuspension mittels zweier 1 ml-Spritzen 13 mal hin- und hergedrückt, wobei die Zellen durch Scherkräften aufgebrochen wurden. Anschließend wurde das sich im Gehäuse befindliche Totvolumen der Zellsuspension durch erneutes Durchdrücken von 0,5 ml Homogenisierungspuffer aufgefangen, so dass ein Endvolumen von 1,3 ml entstand. Zu Isolierung der Zellkerne wurde die Zellsuspension auch hier für 10 min. bei 300 g (4°C) zentrifugiert und der Überstand abgenommen.

3.10.2 Subzelluläre Fraktionierung

3.10.2.1 Isolierung der Plasmamembran

Zur Isolierung der Plasmamembran wurde das Biotin-NeutrAvidin-System genutzt. Biotin ist ein Vitamin mit einem Molekulargewicht von nur 244 Da. Das Molekül bindet an Aminogruppen (-NH₂), d.h. Biotin kann sowohl an die Lysine, als auch an die N-Termini von Polypeptiden binden. In dieser Arbeit wurde zur Detektion von Zelloberflächenmolekülen lediglich wasserlösliches, membranimpermeables Sulfo-NHS-LC-Biotin genutzt. Das kommerziell erhältliche Biotin enthält eine Veresterung mit N-Hydroxysuccinimiden (NHS), was eine Bindung von Biotin im pH-Bereich von 7 – 9 ermöglicht. Zudem trägt das Biotin einen *Spacer*-Arm (LC), der sterische Behinderungen während der Biotinylierung verhindert.

Avidin ist 66 kDa groß und zeichnet sich durch eine sehr hohe Affinität zu Biotin aus. Es werden jeweils 4 Moleküle Biotin gebunden. Die Biotin-Avidin-Interaktion ist die stärkste bekannte nicht-kovalente Bindung zwischen Proteinen. Bei NeutrAvidin (60 kDa) handelt es sich um deglykosyliertes Avidin, bei dem zudem der isoelektrische Punkt herabgesetzt wurde. Somit wurden die Bindungseigenschaften verbessert. Ein breites Angebot an immobilisierten NeutrAvidin-Reagenzien ist ebenfalls kommerziell erhältlich.

Zur Detektion von Proteinen in der Plasmamembran wurde diese zunächst isoliert. Dazu wurden Oli-neu Zellen für 10 min. auf Eis heruntergekühlt und anschließend mit 0,5 mg / ml Sulfo-NHS-LC-Biotin in PBS für 20 min. bei 4°C inkubiert. Um überschüssiges Biotin zu entfernen wurden die Zellen zweimal für 5 min. mit 50 mM Glycin in PBS und einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde mit Hilfe eines *Cellcrackers* ein kernfreier Überstand hergestellt (Kap. 3.10.1.3). Zur Isolierung der Plasmamembran-Fragmente wurde der kernfreie Überstand anschließend für eine Stunde mit 100 µl / ml NeutrAvidin-Agarose-*beads* inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der NeutrAvidin-Agarose-*beads* mit PBS wurden diese bei 4°C für 2 min. bei 300 g abzentrifugiert und in 4x Probenpuffer aufgenommen. Nach 10minütigem kochen bei 95°C und erneutem zentrifugieren wurde der Überstand mittels SDS-PAGE und Westernblot analysiert. Als Kontrolle dienten intrazelluläre Membranen, die bei 5 x 10⁵ g, für 30 min. pelletiert wurden.

3.10.2.2 Myelinpräparation

Zur Isolierung der Myelinmembranen wurden die Mausgehirne entnommen und mit Hilfe eines Ultra-Turrax in 10,5% Saccharose in PBS homogenisiert. Es folgte eine Zentrifugation bei $1,7 \times 10^4$ g für 45 min. (4°C). Das Pellet wurde in 30% Saccharose in PBS resuspendiert, mit 10,5%iger Saccharose-Lösung überschichtet und für 50 min. bei $6,8 \times 10^4$ g (4°C) zentrifugiert. Aufgrund der geringen Dichte des Myelins, kann dieses so von anderen Membranen biochemisch getrennt werden (Norton and Poduslo, 1973). Das Myelin wurde von der Interphase abgesammelt und durch Zugabe von H_2O einem hypoosmotischen Schock unterzogen. Durch diesen Schritt werden axonale Membranen „ausgewaschen“. Es folgte eine Zentrifugation von 30 min. bei $6,8 \times 10^4$ g (4°C) und eine erneute Auftrennung des Myelins über einen Stufengradienten. Nach erneutem hypoosmotischen Schock wurde das Myelin in einem kleinen Volumen PBS aufgenommen und bei -80°C gelagert.

3.10.3 Co-Immunpräzipitation

Ziel einer Co-Immunpräzipitation ist es, eine Interaktion zwischen Proteinen nachzuweisen. Man nutzt dazu die Bindung von Protein-A- bzw. Protein-G-Sepharose an Immunglobuline. Protein-A ist ein bakterielles Zellwandprotein von *Staphylococcus aureus* mit einer spezifischen Affinität zur Fc-Region von bestimmten Immunglobulinen. Protein-G ist ein Zelloberflächenprotein aus Streptokokken und unterscheidet sich in seinem Affinitätsspektrum von Protein-A. In dieser Arbeit wurden ausschließlich Co-Immunpräzipitationen mit Kaninchen-Antikörpern durchgeführt, welche eine hohe Affinität zu Protein-A-Sepharose aufweisen. Dazu wurden Oli-neu Zellen bzw. primäre Oligodendrozyten mit einer Dichte von 2×10^4 Zellen / cm^2 bzw. von $1,8 \times 10^5$ Zellen / cm^2 ausgesät und für zwei bzw. vier Tage in Kultur gehalten. Vor Beginn der Co-Immunpräzipitation wurden die Zellen für 10 min. bei 4°C mit 1 mM N-Ethylmaleimid inkubiert, welches zum Nährmedium zugegeben wurde. N-Ethylmaleimid blockiert die Aktivität von NSF (*N-ethylmaleimide-sensitive-factor*), einem Chaperon, das SNARE-Komplexe spaltet. Dies ist unter natürlichen Bedingungen notwendig, um die *cis*-SNARE-Komplexe zu trennen (Kap. 2.5.3). Im Fall der Co-Immunpräzipitation sollen jedoch vorhandene SNARE-Komplexe geschützt werden. Auch zu allen verwendeten Puffern wurde 1 mM N-Ethylmaleimid hinzugefügt. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in 1 ml Triton-Lysis Puffer vom Zellkulturgefäß gekratzt (Kap. 3.10.1.2). Dem kernfreien Überstand wurden 100 μl / ml Protein-A-Sepharose *beads* zugefügt und für 1 Stunde bei 4°C inkubiert (Rotor). Anschließend wurden die *beads* für 20 sec. bei 300 g (4°C) abzentrifugiert und bis zu den späteren Waschschrritten bei -20°C gelagert.

Dieser Inkubationsschritt diente als Negativkontrolle, um unspezifisch bindende Proteine zu detektieren und schon vor der eigentlichen Immunpräzipitation vom Lysat zu entfernen. Der Überstand wurde anschließend über Nacht mit dem polyklonalen Kaninchen-Antikörper und am Folgetag für eine Stunde erneut mit 100 µl / ml Protein-A-Sepharose *beads* inkubiert. Nach dem Abzentrifugieren der *beads* (siehe oben) wurden diese, gemeinsam mit den *beads* der Negativkontrolle, fünf mal mit 1 ml RIPA-Puffer gewaschen, Probenpuffer hinzugefügt und für 10 min. bei 95°C unter Schütteln gekocht. Anschließend wurden die Proben erneut zentrifugiert und der Überstand mittels SDS-PAGE und Westernblot analysiert. Um eine mögliche SNARE-Interaktion zu detektieren, die erst nach der Herstellung der Triton-Lysate entsteht, wurden Oli-neu Zellen entweder mit den Expressionsvektoren VAMP3-GFP und Syntaxin4-myc co-transfiziert oder einzeln transfiziert und die Lysate vereinigt. Die Co-Immunpräzipitationen wurden anschließend wie oben beschrieben durchgeführt.

3.10.4 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen

Zur quantitativen Bestimmung von Proteinen wurde ein Bradford-Test durchgeführt. Dabei bildet der Farbstoff Coomassie-Brillant-Blau G-250 (Bradford-Reagenz, Biorad, München) in saurer Lösung Komplexe mit den Aminosäuren Arginin, Phenylalanin, Tryptophan, Tyrosin und Histidin. Das Absorptionsmaximum des Farbstoffs verschiebt sich von 470 nm zu 595 nm. Anhand einer Eichgerade kann so die Proteinkonzentration photometrisch bestimmt werden. Die Eichgerade und die zu messenden Proben wurden wie folgt pipettiert.

	Konzentration	BSA (0,5 mg/ml)	Puffer	Bradford-Reagenz
Referenz	0 µg / ml	0 µl	800 µl	200 µl
1	1 µg / ml	2 µl	798 µl	200 µl
2	2 µg / ml	4 µl	796 µl	200 µl
3	5 µg / ml	10 µl	790 µl	200 µl
4	10 µg / ml	20 µl	780 µl	200 µl
5	15 µg / ml	30 µl	770 µl	200 µl
6	20 µg / ml	40 µl	760 µl	200 µl
7	25 µg / ml	50 µl	750 µl	200 µl
Probe	-	10 µl	790 µl	200 µl

Anschließend wurden die Proben für 10 bis 30 min. bei Raumtemperatur inkubiert und die Absorption bei 595 nm gemessen.

3.10.5 SDS-PAGE und Westernblot

Unter SDS-PAGE (*Sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) versteht man eine analytische Methode zur Auftrennung von Proteingemischen im elektrischen Feld. Als Trennmedium dient dabei ein Gel auf Polyacrylamidbasis.

Zur Vorbereitung der Proben wurden 0,5 µg – 20 µg Protein mit 4x Probenpuffer versetzt und ggf. 5 min. bei 95°C gekocht um Sekundär- und Tertiärstrukturen aufzubrechen. Das im Probenpuffer enthaltene SDS bindet dabei in einem Verhältnis von 1,4:1 an die Proteine, so dass diese eine konstante Ladungsverteilung aufweisen. Zudem spaltet das enthaltene DTT Disulfidbrücken.

Die Elektrophorese erfolgte entweder in 4%-12% Bis-Tris-Gradienten-Gelen (NuPAGE, Invitrogen, Karlsruhe) oder in diskontinuierlichen Gelen nach dem Lämmli-System. Dazu wurde ein 10%-14%iges Trenngel (Tris-Glycin-Puffer, pH 8,8) mit einem 4%igen Sammelgel (Tris-Glycin-Puffer, pH 6,8) überschichtet.

	Sammelgel (5 ml)	Trenngel (10 ml)		
	4%	10%	12%	14%
H ₂ O	3,4 ml	4,0 ml	3,3 ml	2,6 ml
30% Acrylamid-Mix	0,83 ml	3,3 ml	4,0 ml	4,7 ml
1 M Tris	0,63 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
10% SDS	0,05 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
10% APS	0,05 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
TEMED	0,005 ml	0,004 ml	0,004 ml	0,004 ml

Nach der Auftrennung des Proteingemisches wurde ein Westernblot durchgeführt. Dabei wird ein, senkrecht zum Polyacrylamid-Gel gerichtetes, elektrisches Feld angelegt. Dies führt zu einer Übertragung der Proteine auf eine Membran. Das Muster der elektrophoretischen Auftrennung bleibt dabei erhalten. Für die Übertragung wurde das *semy-dry*-Verfahren angewendet. Dazu wurden zunächst vier in Transferpuffer getränkte Filterpapiere (Whatman) auf die Anode der Westernblotkammer gelegt. Darauf folgte die PVDF-Membran, welche zuvor in Methanol aktiviert und für 10 min. in Transferpuffer äquilibriert wurde. Auf die Membran wurden das Gel und abschließend wieder drei getränkte Filterpapiere geschichtet. Der Transfer der Proteine erfolgte für 90 min. bei einer Stromstärke von 230 mA.

3.10.5.1 Ponceau-S Färbung

Nach dem Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran wurde zunächst überschüssiges SDS mit dH₂O abgewaschen. Zum Fixieren der Proteine auf der Membran und zum Sichtbarmachen der Markerbanden wurde die Membran anschließend für 10 min. in Ponceau-S gefärbt. Beim Entfärben mit dH₂O wurden die Markerbanden erkennbar und konnten angezeichnet werden.

3.10.5.2 Silberfärbung

Sollten alle Proteinbanden visualisiert werden, wurde eine Silberfärbung durchgeführt. Dabei wurden die Proteine zunächst durch eine Fixierlösung aus Eisessig und Ethanol denaturiert und ausgefällt. Anschließend folgte die Inkubation in Silbernitratlösung, wobei sich die Silberionen an die Proteine anlagerten. Im folgenden Entwicklungsschritt wurden, durch Zugabe von Formaldehyd, die Silberionen zu elementarem Silber reduziert. Dies färbte die Proteinbanden braun. Die Silberfärbung wurde mit dem *SilverQuest-Kit* der Firma Invitrogen nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

3.10.5.3 Immundetektion

Zur Detektion einer bestimmten Proteinbande auf der PVDF-Membran wurde eine Immundetektion durchgeführt. Dazu wurden zunächst unspezifische Bindestellen auf der Membran durch Inkubation für 30 min. in 4% Milchpulver in PBST abgesättigt. Anschließend wurde der erste Antikörper verdünnt in 4% Milchpulver in PBST für eine Stunde (oder über Nacht) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBST, folgte eine einstündige Inkubation des an die Meerrettichperoxidase (*horse radish peroxidase*, HRP) gekoppelten Zweitantikörpers. Erneut wurde dreimal für 15 min. mit PBST gewaschen um überschüssigen Antikörper zu entfernen. Die so markierten Proteine wurden mittels ECL-Reagenz detektiert. Dabei spaltet die Meerrettich-Peroxidase das, in der ECL-Lösung vorhandene, Luminol. Dies führt zu einer Lichtreaktion, die eine Schwärzung von Röntgenfilmen zur Folge hat.

Biotinylierte Proteine wurden für 30 min. mit Streptavidin-HRP inkubiert, wie oben beschrieben gewaschen und detektiert.

3.10.6 Immunfluoreszenz

Für Immunfluoreszenz-Färbungen wurden Oli-neu Zellen oder primäre Oligodendrozyten auf Deckgläser ausgesät und je nach Versuchsansatz für einen bis mehrere Tage in Kultur gehalten und ggf. mit dbcAMP behandelt. Das Kulturmedium wurde entfernt und anschließend dreimal mit PBS gewaschen. Zum Fixieren der Zellen wurden diese 15 min. in 4% Paraformaldehyd (PFA) inkubiert. Es folgte ein dreimaliges Waschen mit PBS. Sollte ein intrazelluläres Epitop detektiert werden, wurden die Zellen 2 min. mit 0,1% Triton-X100 in PBS permeabilisiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurden unspezifische Bindestellen abgesättigt. Dazu wurden die Zellen für 20 min. in 10% HS in PBS inkubiert. Anschließend wurde der 1. Antikörper in 10% HS in PBS verdünnt und für 45 min. inkubiert. Nach einem Waschschrift, bei dem überschüssiger Antikörper entfernt wird, wurde der zweite Antikörper, gekoppelt an ein Fluorochrom, auf die Zellen gegeben. Zuletzt wurden die Zellen erneut gewaschen, kurz in dH₂O getaucht und in Moviol eingebettet. Immunzytochemische Analysen mit dem PLP-Antikörper, der ein extrazelluläres Epitop des Myelinproteins detektiert (O10-Antikörper), wurden lebend und auf Eis, vor der weiteren Behandlung der Zellen mit anderen Antikörpern durchgeführt.

3.10.7 Mikroskopie und Auswertung der Translokationsstudien

Fluoreszenzmarkierte Proteine wurden entweder mit einem Fluoreszenzmikroskop oder einem *Laser-Scanning*-Mikroskop visualisiert. Die Auswertung erfolgte anschließend mit ImageJ und Adobe Photoshop.

Zur Quantifizierung der Intensität von Immunfluoreszenzen am *Laser-Scanning*-Mikroskop wurden jeweils ganze Zellen aufgenommen (Dicke: 8 µm) und in 20 Teilschnitte à 0,4 µm unterteilt. Jeder Teilschnitt wurde mit dem Programm Image Pro Plus in 256 Graustufen (Schwarz: Graustufe 1 / Weiß: Graustufe 256) unterteilt, wobei jeder Graustufe eine bestimmte Pixelanzahl zugeordnet wurde. Die Anzahl der Pixel wurde anschließend in Microsoft Excel mit der Graustufe multipliziert. Die Summe aller Teilschnitte ergab die Gesamtintensität der Fluoreszenzmarkierung. In Translokationsstudien, in denen die Menge an oberflächen-transportiertem PLP ermittelt wurde, wurde die Intensität der Plasmamembran-PLP-Färbung (O10-Antikörper) in Relation zur Intensität der Gesamt-PLP-Färbung (aa3-Antikörper) gesetzt.

3.10.8 Antikörper-Endozytose

Zur Visualisierung endozytierter Proteine wurde eine Antikörper-Endozytose durchgeführt. Dazu wurden extrazelluläre Epitope eines Proteins fluoreszenzmarkiert und der Antigen-Antikörper-Komplex anschließend bei 37°C endozytiert. Färbte man die nicht endozytierten Proteine mit einem anderen Fluorochrom gegen, konnte die Menge an endozytiertem Protein ermittelt werden.

Oli-neu Zellen wurden dazu mit PLP transfiziert (Kap. 3.8.3.1) und ggf. für drei Tage mit dbcAMP behandelt. Anschließend wurden die Zellen für 10 min. auf Eis heruntergekühlt und für 40 min. mit einem PLP-Antikörper inkubiert, der ein extrazelluläres Epitop detektiert (Maus-anti-PLP; O10, Abb. 2.2 B). Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen für 30 min. mit einem fluoreszenz-gekoppelten Zweitantikörper (Ziege-anti-Maus-Cy3) inkubiert. Um die Endozytose der markierten Oberflächenproteine zu ermöglichen wurden die Zellen in vorkonditioniertem Kulturmedium für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Der Kontrollansatz verweilte für eine Stunde bei 4°C. Nach der Endozytose wurden die Zellen auf Eis heruntergekühlt. Die nicht-endozytierten Oberflächenproteine wurden anschließend mit einem weiteren fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper (Kaninchen-anti-Ziege-Cy2) gegengefärbt. Anschließend wurden die Zellen fixiert und in Moviol eingebettet (Abb. 3.7).

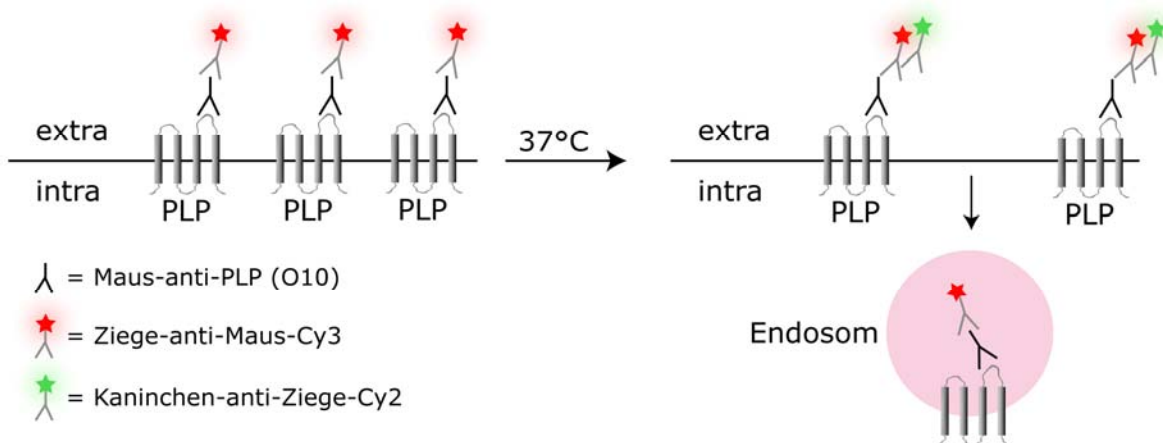


Abb. 3.7: Schematische Darstellung der Antikörper-Endozytose

3.10.9 Zell-ELISA

Als enzymgekoppelten Immunadsorptionstest (ELISA, *enzyme linked Immunosorbent Assay*) bezeichnet man ein immunologisches Nachweisverfahren, das auf einer enzymatischen Farbreaktion basiert. Im Fall des Zell-ELISAs (Abb. 3.8) wurden Oli-neu bzw. Oli-neu PLP-eGFP Zellen auf einer 24-Well-Platte ausgesät (3800 Zellen / cm²) und je nach Versuchsansatz 1-3 Tage mit dbcAMP behandelt (Kap. 3.8.5). Dies führte zur

Differenzierung der Zellen und zu einem Transport von PLP zur Plasmamembran. Zudem wurden die Zellen zuvor entweder mit siRNA oder Expressionsvektoren transfiziert um eine Auswirkung von verschiedenen *Knockdown*- bzw. Überexpressions-Situationen auf den PLP-Transport zu untersuchen. Nach 40minütiger Inkubation mit einem extrazellulär bindenden, und somit nur Oberflächen-PLP detektierenden, Antikörper (O10, Abb. 2.2 B) wurden die Zellen für 20 min. mit 4% PFA fixiert. Nach zwei Waschschritten mit PBS wurde für 30 min. mit PBS, 10% HS blockiert. Der HRP-gekoppelte Zweitantikörper (Ziege-anti-Maus-HRP) verblieb für eine Stunde auf den Zellen. Nach erneutem zweimaligem Waschen folgte die Zugabe des Chromogens TMB (Tetramethylbenzidin). Dieses stellt ein Substrat für die an den Sekundärantikörper gekoppelte Meerrettichperoxidase (HRP) dar. Das farblose TMB wird nach ca. 2-20 min. (bei Raumtemperatur) zu einem blauen Produkt umgewandelt, welches eine Absorption bei 370 und 652 nm zeigt. Durch Zugabe von 1 M Schwefelsäure wird die Reaktion gestoppt und ein gelbes Reaktionsprodukt entsteht. Dies besitzt ein einzelnes Absorptionsmaximum bei 450 nm und kann photometrisch bestimmt werden. Jeder Ansatz wurde sechsfach durchgeführt und anschließend gemittelt. Zudem wurden Kontrollen ohne Zweitantikörper durchgeführt und der resultierende Hintergrundwert subtrahiert.

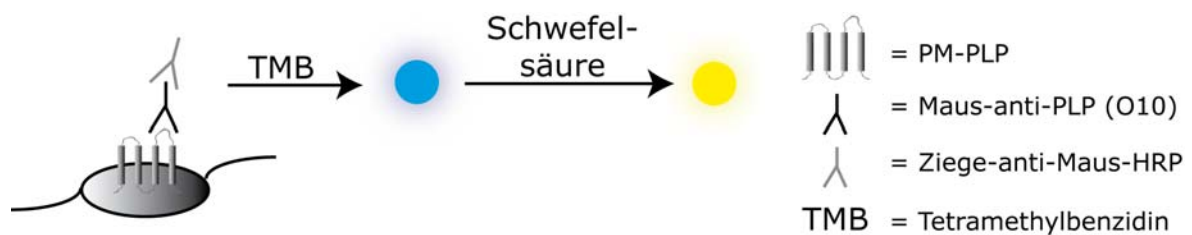


Abb. 3.8: Versuchsablauf des Zell-ELISAs

3.11 Statistik

Die statistische Auswertung und graphische Darstellung aller Versuche erfolgte mit dem Programm Graph Pad Prism 5.00. Es wurde ein nicht-parametrischer, gepaarter, zweiseitiger t-Test durchgeführt. Der Konfidenz-Intervall betrug 95%, d.h. einen Stern erhielten P-Werte < 0,05; zwei Sterne < 0,005 und drei Sterne < 0,001. Die Fehlerbalken zeigen jeweils die Standardabweichung des Mittelwerts (SEM, *standard error of the mean*).

4 Ergebnisse

4.1 *In vitro*-Modelle zur Analyse des vesikulären Transports

Zur Analyse des vesikulären Transports in Oligodendrozyten wurden sowohl primäre Oligodendrozyten als auch Oli-neu Zellen verwendet. Primäre Oligodendrozyten differenzieren ohne den Einfluss neuronaler Signale und exprimieren das Myelinprotein PLP bereits nach wenigen Tagen in Kultur. Die Zellen generieren ein dichtes Netz aus myelinähnlichen Strukturen, welche in dieser Arbeit als „*myelin-like-membranes*“ (MLMs) bezeichnet wurden.

Für funktionelle Untersuchungen wurde, aufgrund der besseren Manipulierbarkeit, bevorzugt die Zell-Linie Oli-neu verwendet. Zwar handelt es sich hierbei um eine oligodendrogliale Vorläufer-Zell-Linie, jedoch zeigen die Zellen starke zellbiologische Ähnlichkeiten zu primären Oligodendrozyten. So lässt sich durch die Zugabe von dbcAMP eine Differenzierung der Zellen hervorrufen, bei der Membranverzweigungen entstehen. Zudem exprimiert die Zell-Linie alle oligodendroglialen SNARE-Proteine und ist somit als Modellsystem zur Analyse des SNARE-abhängigen, vesikulären Transports geeignet.

4.2 Expression der SNARE-Proteine während der oligodendroglialen Differenzierung

Der gerichtete Transport von Myelinkomponenten zur Myelinmembran findet überwiegend nach dem Golgi-Apparat statt. Daher wurde zunächst die Expression der SNARE-Proteine, deren Beteiligung in endo- und exozytische Transportwege aus anderen Zelltypen bekannt ist, in Oligodendrozyten analysiert. Westernblots von Zell-Lysaten zeigten die Expression der Q-SNAREs Syntaxin 2 (Epimorphin), Syntaxin 3, Syntaxin 4, Syntaxin 6, Syntaxin 7, Syntaxin 8, Syntaxin 13, Syntaxin 16, vti1a, vti1b, SNAP23, SNAP29 und der R-SNAREs VAMP2 (Synaptobrevin 2), VAMP3 (Cellubrevin), VAMP4 und VAMP7 (TI-VAMP) (Abb. 4.1 A, Tab. 4.1). Dabei zeigten Lysate von primären Oligodendrozyten und Oli-neu Zellen überwiegend identische Ergebnisse. Die Expression der SNARE-Proteine Syntaxin 3 und VAMP2 war in Oli-neu Zellen schwächer als in primären Oligodendrozyten. Die neuronalen SNARE-Proteine Syntaxin 1, SNAP25, VAMP1 (Synaptobrevin) und VAMP8 (Endobrevin) zeigten hingegen in Oligodendrozyten keine Expression (nicht gezeigt).

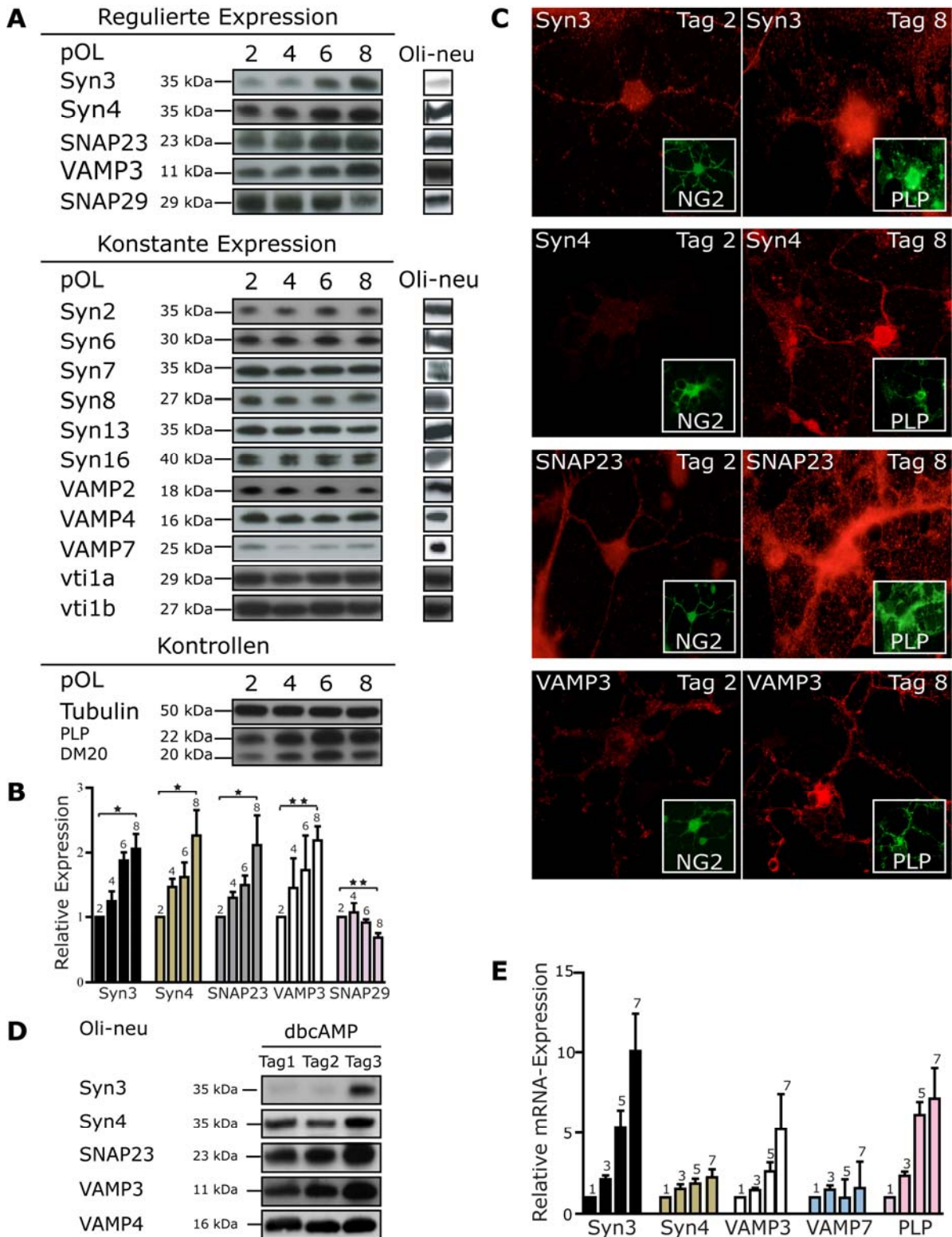


Abb. 4.1: Expression und Regulation der SNARE-Proteine in primären Oligodendrozyten

(A) Westernblots der Lysate primärer Oligodendrozyten, welche für 2, 4, 6 oder 8 Tage kultiviert wurden, und Oli-neu Zellen. Die Lysate wurden mit Antikörpern gegen alle exprimierten SNARE-Proteine inkubiert (um Verwechslungen zu verhindern, wurden SNAREs mit identischem oder ähnlichem Molekulargewicht auf unterschiedlichen PVDF-Membranen untersucht). Als Kontrollen dienen Tubulin und PLP. Dabei zeigt PLP die zunehmende Differenzierung der primären Oligodendrozyten an, Tubulin dient als Ladekontrolle.

(B) Densitometrische Analyse der Westernblot-Signale. Die SNARE-Signale wurden zum Tubulin-Signal normalisiert und in Relation zu Tag 2 dargestellt. Es sind ausschließlich die SNARE-Proteine gezeigt, die im gepaarten t-Test signifikante Expressionsunterschiede zwischen Tag 2 und Tag 8 aufweisen ($n=4$, SEM, gepaarter t-Test). **(C)** Doppelfärbungen primärer Oligodendrozyten mit Antikörpern gegen regulierte SNARE-Proteine und oligodendrogliale Entwicklungsmarker (Tag 2: NG2; Tag 8: PLP). Die Färbungen wurden mit identischen technischen Einstellungen aufgenommen, um Unterschiede in der Intensität der Expression zu erkennen. **(D)** Oli-neu Zellen wurden für 1, 2 bzw. 3 Tage mit dbcAMP behandelt um eine Differenzierung der Zellen zu erreichen. Anschließend wurden Lysate der Zellen mittels Westernblot mit Antikörpern gegen regulierte SNARE Proteine untersucht. VAMP4 dient als Kontrolle für ein konstant exprimiertes SNARE-Protein. **(E)** Relative mRNA-Expression der SNARE-Proteine Syntaxin 3, Syntaxin 4, VAMP3 und VAMP7. Es wurde eine quantitative *RT-PCR* primärer Oligodendrozyten (Tag 1, 3, 5 und 7) durchgeführt und die Ergebnisse in Relation zu Tag 1 dargestellt. Als Kontrolle dient erneut PLP ($n=3$; SEM). pOL, primäre Oligodendrozyten; Syn, Syntaxin.

Um eine mögliche Regulation der SNARE-Expression im Verlauf der oligodendroglialen Differenzierung zu untersuchen, wurden primäre Oligodendrozyten für 2, 4, 6 bzw. 8 Tage kultiviert und mittels Westernblot analysiert (Abb. 4.1 A, B). Zwischen Tag 2 und Tag 8 war eine signifikant verstärkte Expression für die SNARE-Proteine Syntaxin 3 (2,04fach, $\pm 0,2$), Syntaxin 4 (2,25fach, $\pm 0,34$), SNAP23 (2,1fach, $\pm 0,4$) und VAMP3 (2,18fach, $\pm 0,19$) zu beobachten. SNAP29 hingegen zeigte als einziges SNARE-Protein eine verminderte Expression um 32% ($\pm 6,2\%$). Da in Kulturen primärer Oligodendrozyten vereinzelt Kontaminationen durch Astrozyten oder Neuronen auftreten, wurden Doppelfärbungen der SNARE-Proteine Syntaxin 3, Syntaxin 4, SNAP23, VAMP3 und SNAP29 mit oligodendroglialen Entwicklungsmarkern durchgeführt (Abb. 4.1 C, rot). Dabei diene NG2 als Marker für unreife (Tag 2) und PLP als Marker für reife (Tag 8) Oligodendrozyten (Abb. 4.1 C, grün). Die jeweiligen Färbungen der unterschiedlichen Entwicklungsstadien wurden bei identischen technischen Einstellungen vorgenommen, um Unterschiede in der Expressionsintensität vergleichen zu können. Die SNARE-Proteine Syntaxin 3, Syntaxin 4, SNAP23 und VAMP3 zeigten in der immunzytochemischen Analyse eine Steigerung der Expression in differenzierten Oligodendrozyten. Die Verminderung der SNAP29-Expression konnte in den Färbungen nicht bestätigt werden (Daten nicht gezeigt), was wahrscheinlich an der Sensitivität der Detektionsmethode lag. In einem weiteren Versuchsansatz wurden Oli-neu Zellen durch die Zugabe von dbcAMP differenziert und die Expression der SNAREs überprüft (Abb. 4.1 D). Auch hier zeigte sich eine sich steigernde Expression der SNARE-Proteine Syntaxin 3, Syntaxin 4, SNAP23 und VAMP3. VAMP4 wurde, wie auch in primären Oligodendrozyten, konstant exprimiert. Neben der Analyse auf Protein-Ebene wurde zusätzlich die mRNA-Expression ausgewählter SNARE-Proteine im Verlauf der oligodendroglialen Differenzierung (Tag 1, 3, 5 und 7) überprüft (Abb. 4.1 E). Die mRNA-Expression der SNAREs Syntaxin 3, Syntaxin 4 und VAMP3 stieg im Verlauf der Differenzierung an, die mRNA des SNARE-Proteins VAMP7, zeigte eine konstante Expression.

4.3 Expression der SNARE-Proteine in Gehirnlisaten und in isoliertem Myelin unterschiedlichen Alters

Zur weiteren Analyse der SNARE-Expression wurden Lysate von Mausgehirnen verschiedenen Alters (P1, P7, P14, P21, adult) mittels Westernblot analysiert. Es wurden Antikörper ausgewählter SNARE-Proteine (Syntaxin 3, Syntaxin 4, SNAP23, SNAP29, VAMP2, VAMP3, VAMP4 und VAMP7) inkubiert (Abb. 4.2 A). Als Kontrolle für den zunehmenden Myelinisierungsgrad des Gehirns diente PLP. Die SNAREs Syntaxin 3, Syntaxin 4, SNAP23 und VAMP3 zeigten einen Anstieg der Expression, ähnlich der Regulation in primären Oligodendrozyten (Abb. 4.1). Auch die Expression des R-SNAREs VAMP2 stieg an. Die Expression von SNAP29 war im adulten Gehirn vermindert. VAMP4 und VAMP7 zeigten eine konstante Expression im Verlauf der Entwicklung. Im Vergleich zum Myelinprotein PLP waren die Expressionsunterschiede der SNARE-Proteine eher schwach. Dies ist wahrscheinlich darauf zurück zu führen, dass alle Zellen des Gehirns die SNARE-Proteine exprimieren, jedoch evtl. nur in Oligodendrozyten eine Regulation derer stattfindet.

Geht man von einem vesikulären Transport der Myelinproteine zur Myelinmembran aus, so müssen am Transport beteiligte SNAREs im Myelin lokalisiert sein, um ankommenden Vesikeln eine Fusion mit der Zielmembran ermöglichen zu können. Bei zunehmender Myelinisierung sollte eine Akkumulation dieser SNAREs im isolierten Myelin zu beobachten sein. Um dies zu untersuchen wurde Myelin verschiedener Entwicklungsstadien (P15 und adult) isoliert (Abb. 4.2 B) und gleiche Mengen mittels Westernblot analysiert (Abb. 4.2 C). Dabei zeigten die Q-SNAREs Syntaxin 2, Syntaxin 3 und Syntaxin 4 eine Akkumulation im adulten Myelin (A), ein Ergebnis das zu erwarten war, da die Syntaxine 2, 3 und 4 potentielle Plasmamembran-Q-SNAREs darstellen (in anderen Zelltypen finden sich diese SNARE-Proteine vorwiegend an der Plasmamembran) (Tab. 2.1). Auch VAMP7 war leicht im adulten Myelin angereichert. Die SNARE-Proteine Syntaxin 6, Syntaxin 7, Syntaxin 8, Syntaxin 13, Syntaxin 16, VAMP2, VAMP3 und VAMP4 wurden stärker im P15-Myelin exprimiert. SNAP23 und SNAP29 zeigten eine konstante Expression in beiden Entwicklungsstadien. Zur Kontrolle der Reinheit der Kulturen dienten die Kompartimentmarker BiP (ER-Marker), GM130 (Marker für den Golgi-Apparat) und TfR (Transferrin-Rezeptor, Marker für das *Recycling* Endosom). In den Myelinfraktionen war, im Vergleich zu einem Oli-neu Lysat (Ly), von dem gleiche Mengen aufgetragen wurden, keine Kontamination durch intrazelluläre Membranen zu erkennen. Lediglich Spuren von ER-Membranen fanden sich im P15-Myelin.

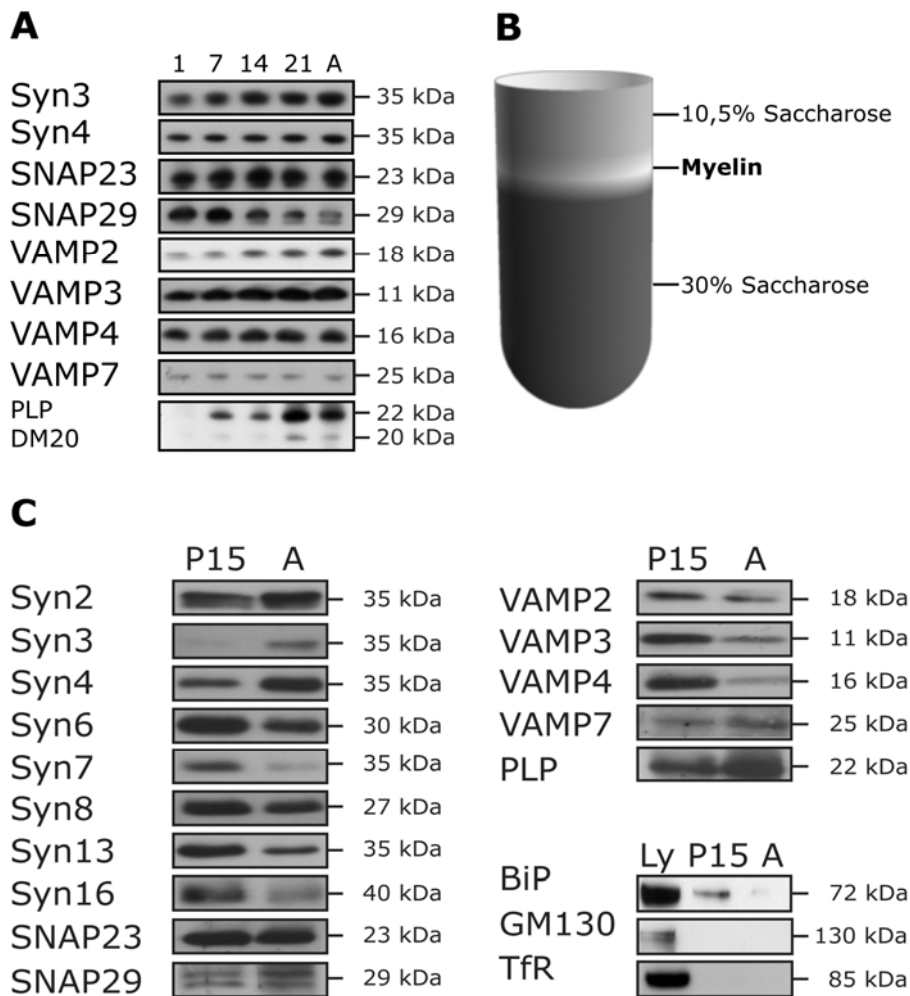


Abb. 4.2: Expression der SNARE-Proteine in Gehirnlisaten und Myelin verschiedenen Alters

(A) Gehirnlisate unterschiedlichen Alters (P1, P7, P14, P21, adult) wurden mittels Westernblot analysiert. Es wurden die SNARE-Proteine Syntaxin 3, Syntaxin 4, SNAP23, SNAP29, VAMP2, VAMP3, VAMP4 und VAMP7 auf deren Regulation im Verlauf der zunehmenden Myelinisierung des Gehirns untersucht. PLP dient als Kontrolle.

(B) Schematische Darstellung des Saccharose-Stufengradienten zur Isolierung von Myelin. Aufgrund der geringeren Dichte im Vergleich zu anderen Membranen lagert sich das Myelin in der Interphase der Saccharose-Schichten ab.

(C) Myelin von P15 oder adulten Mäusen wurden isoliert und mittels Westernblot bezüglich der SNARE-Expression analysiert. PLP dient als Kontrolle für die zunehmende Myelinisierung, BiP, GM130 und Tfr als Kontrollen zur Reinheit der Myelinfraktionen. Ly, Lysat; Syn, Syntaxin; BiP, Chaperone der Hitzeschock-Proteine Hsp70, ER-Marker; Tfr, Transferrin-Rezeptor.

4.4 Die subzelluläre Lokalisation der SNARE-Proteine in Oligodendrozyten

4.4.1 Immunzytochemische Analyse der subzellulären Lokalisation

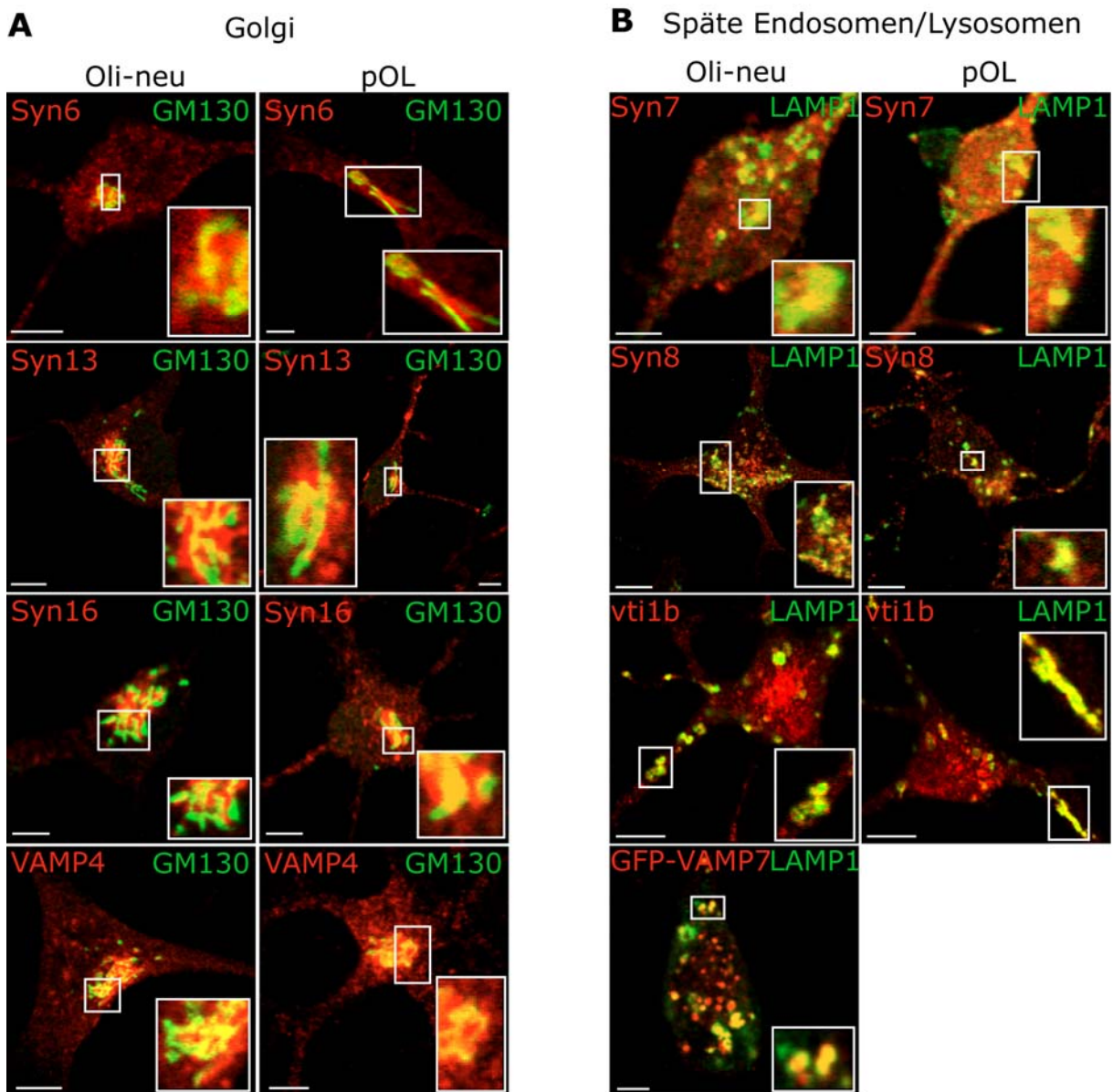
Um die SNARE-Proteine bestimmten vesikulären Transportwegen zuordnen zu können, war es notwendig, deren „*steady-state*“-Lokalisation in Oligodendrozyten zu ermitteln. Während Q-SNAREs (*target membrane*) bevorzugt in der Zielfolmembran lokalisiert sind, sind R-SNAREs (*vesicle*) zunächst in der Donormembran und nach der Fusion, kurzzeitig in der Zielfolmembran akkumuliert (Weimbs et al., 2003). Zur Analyse der subzellulären Lokalisation wurden Doppelfärbungen von Oli-neu Zellen (Abb. 4.3, links) und primären Oligodendrozyten (Abb. 4.3, rechts) mit verschiedenen Kompartimentmarkern angefertigt. Dabei diente GM130 als Marker für den Golgi-Apparat (Abb. 4.3 A), LAMP1 als Marker für späte Endosomen, Lysosomen (Abb. 4.3 B) und Transferrin-Rezeptor als Marker für *Recycling* Endosomen (Abb. 4.3 C).

Die SNARE-Proteine Syntaxin 6, Syntaxin 13 und Syntaxin 16 kolokalisierten mit GM130 und waren somit im Golgi-Apparat akkumuliert (Abb. 4.3 A). Syntaxin 6 und Syntaxin 13 kolokalisierten ebenso mit dem Marker für das *Recycling* Endosom (Abb. 4.3 C). Somit könnten diese beiden SNAREs in einen Transport vom Golgi-Apparat zum *Recycling* Endosom involviert sein. Syntaxin 7, Syntaxin 8 und vti1b kolokalisierten mit Markern der späten Endosomen, Lysosomen und dem *Recycling* Endosom (Abb. 4.3 B, C, nicht gezeigt). Vermutlich sind die SNAREs am vesikulären Transport zwischen den Endosomen beteiligt. Die oligodendroglialen R-SNAREs VAMP3, VAMP4 und VAMP7 ließen sich jeweils nur einem Kompartiment zuordnen. VAMP4 akkumulierte im Golgi-Apparat, VAMP3 im *Recycling* Endosom und VAMP7 kolokalisierte mit dem Marker für späte Endosomen, Lysosomen. Die subzelluläre Lokalisation von VAMP7 wurde mittels Expression eines VAMP7-GFP-Fusionsplasmids ermittelt, da Antikörper-Färbungen keine verlässlichen Ergebnisse lieferten. Die Lokalisation in Oligodendrozyten stimmte jedoch mit der in anderen Zelltypen überein und schien somit durch die Überexpressions-Situation nicht verändert zu sein. Die subzelluläre Lokalisation von VAMP2 konnte nicht ermittelt werden, da der VAMP2-Antikörper nur sehr schwache Signale lieferte.

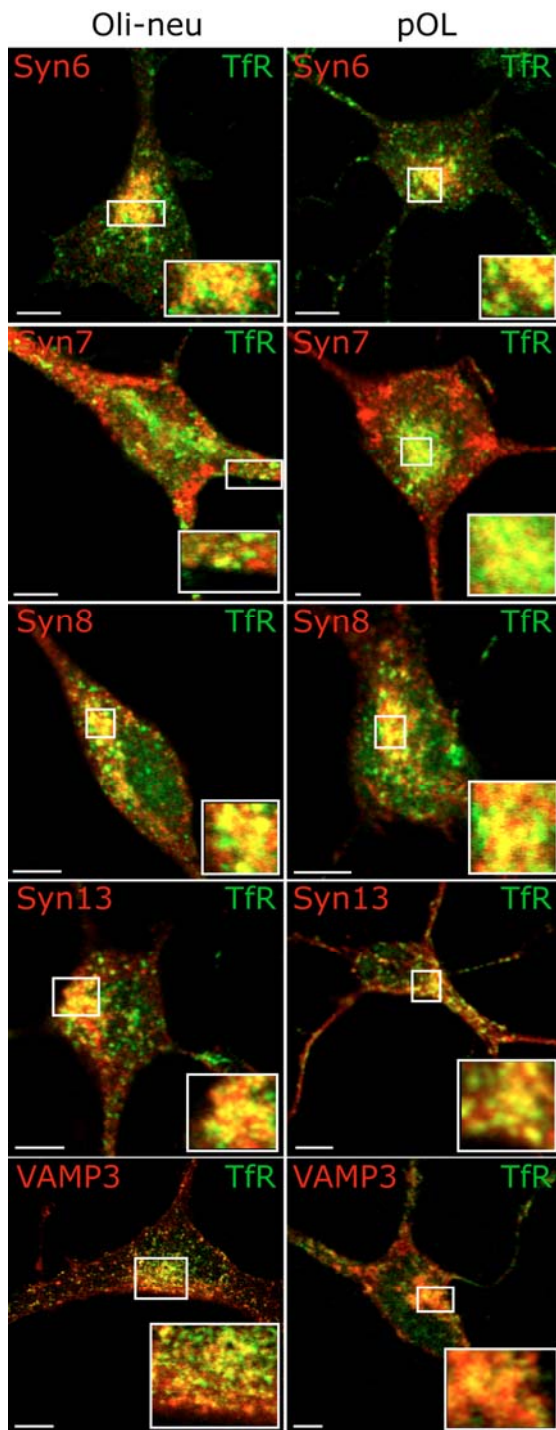
Die SNARE-Proteine Syntaxin 2, Syntaxin 3, Syntaxin 4 und SNAP29 zeigten ein Expressionsmuster, welches sich über die ganze Zelle verteilte (Abb. 4.3 D). Im Fall von Syntaxin 2 und Syntaxin 4 waren kleine Akkumulationen, sogenannte *Cluster*, an den Enden der Fortsätze erkennbar. Diese Bereiche könnten Stellen der erhöhten Fusion von Transportvesikeln sein, was auch in anderen Zelltypen bereits beobachtet wurde (Kap.

2.5.3). SNAP29 zeigte als einziges SNARE ein zytoplasmatisches Expressionsmuster, ähnlich einer Tubulinfärbung.

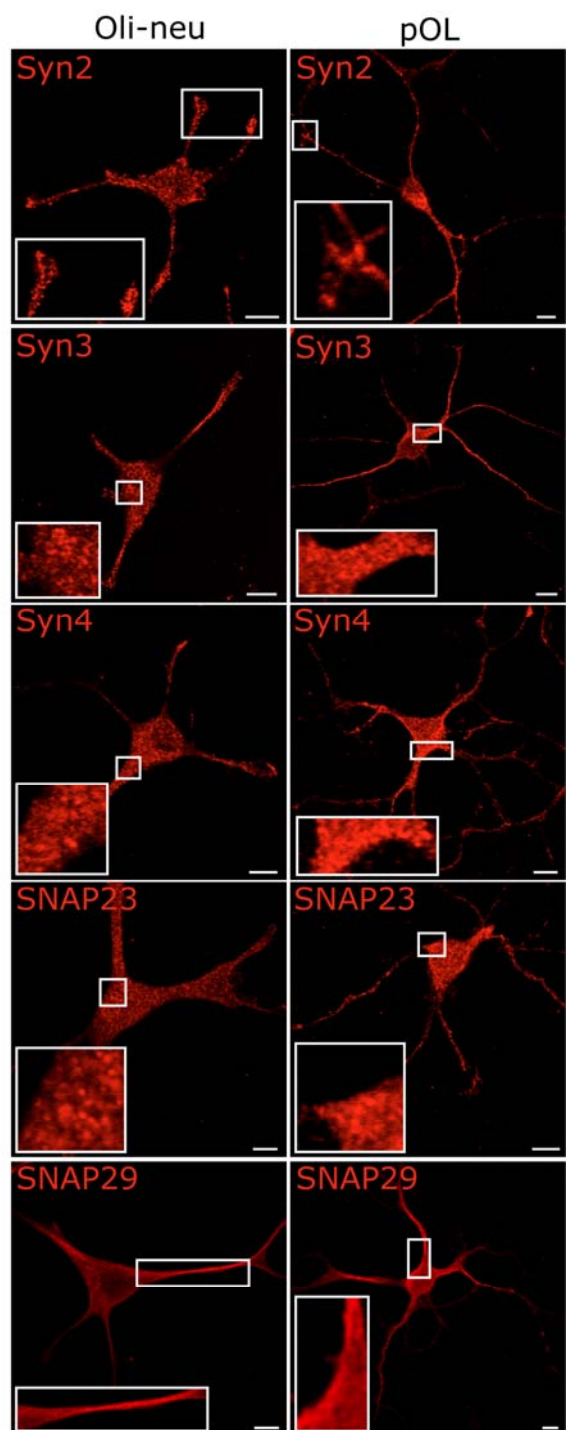
Es bleibt anzumerken, dass die subzelluläre Lokalisation der SNARE-Proteine in Oli-neu Zellen und primären Oligodendrozyten identisch war, was belegt, dass Oli-neu Zellen zu Transportstudien herangezogen werden können. Abbildung 4.3 E zeigt nicht-kolokalisierende Färbungen. Das R-SNARE VAMP3, welches mit dem Transferrin-Rezeptor-positiven *Recycling* Endosom kolokalisierte (Abb. 4.3 C), zeigte keinerlei Kolokalisation mit dem Golgi-Apparat. Das Golgi-assoziierte SNARE-Protein VAMP4 kolokalisierte nicht mit endosomalen Markern. Somit ist von einer Spezifität der immunzytochemischen Analysen auszugehen.



C Recycling Endosomen



D



E

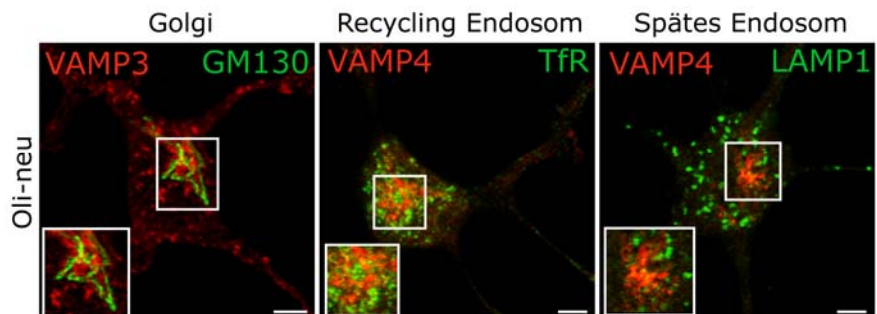


Abb. 4.3: Subzelluläre Lokalisation der SNARE-Proteine

Konfokale Aufnahmen der Doppelfärbungen von Oli-neu Zellen (links) und primären Oligodendrozyten (rechts) mit Antikörpern gegen GM130 (**A**, Marker für den Golgi-Apparat), LAMP1 (**B**, Marker für späte Endosomen, Lysosomen) und Transferrin-Rezeptor (**C**, Marker für das *Recycling* Endosom) in grün und die SNARE-Proteine in rot. Kolokalisationen zwischen Proteinen erscheinen in der Überlagerung der Aufnahmen gelb. Färbungen der SNARE-Proteine (Syntaxin 2, 3, 4, SNAP23 und SNAP29) ohne deutliche Kolokalisation mit den Kompartimentmarkern sind rot dargestellt (**D**). (**E**) Beispiele nicht-kolokalisierender Färbungen in Oli-neu Zellen. Die Kompartimentmarker (GM130, TfR und LAMP1) sind in grün, SNARE-Proteine in rot dargestellt. Messbalken: 5 µm. pOL, primäre Oligodendrozyten; Syn, Syntaxin.

4.4.2 Biochemische Analyse der subzellulären Lokalisation

Da einige SNARE-Proteine in der immunzytochemischen Analyse mit keinem der verwendeten Kompartimentmarker kolokalisierten und kein Marker für die Plasmamembran verwendet wurde, sollte in einem biochemischen Bindungsassay ermittelt werden, welche SNARE-Proteine an der Plasmamembran oligodendroglialer Zellen lokalisiert sind. Dazu wurden Oli-neu Zellen mit nicht-membrangängigem Biotin markiert und durch die Bindung von Neutravidin-*beads* die Plasmamembran (PM) isoliert. Der Überstand enthielt intrazelluläre Membranen (IM) (Kap. 3.10.2.1). Die Effizienz der Isolierung wurde durch die Inkubation mit Streptavidin-HRP im Westernblot überprüft. Es war lediglich in der Plasmamembran-Fraktion ein Streptavidin-Signal zu erkennen (Abb. 4.4, rechts). Als zusätzliche Kontrollen dienten die Natrium-Kalium-ATPase, ein Transmembranprotein der Zellmembran und LAMP1, ein intrazellulärer Marker (Abb. 4.4 rechts). Einige der SNARE-Proteine, die in der immunzytochemischen Analyse keine Kolokalisation mit den gewählten Kompartimentmarkern zeigten (Syntaxin 2, Syntaxin 4 und SNAP29), akkumulierten im biochemischen Ansatz in der Plasmamembran-Fraktion (Abb. 4.4 links). Syntaxin 3 konnte aufgrund der nur schwachen Expression in Oli-neu Zellen nicht getestet werden. Syntaxin 6, Syntaxin 8 und die R-SNAREs VAMP3 und VAMP4 zeigten eine deutliche Akkumulation in der Fraktion der intrazellulären Membranen. Syntaxin 13 und SNAP23 wiesen eine gleichmäßige Verteilung auf beide Fraktionen auf.

Bei allen getesteten SNARE-Proteinen war lediglich eine schwache Anreicherung in einer der beiden Fraktionen zu erkennen. Dies war zu erwarten, da die SNAREs zwischen Donor- und Zielkompartiment „pendeln“ und somit in beiden Fraktionen zu finden sein können. Zudem können Kontaminationen durch intrazelluläre Membranen in der Plasmamembran-Fraktion nicht ganz ausgeschlossen werden.

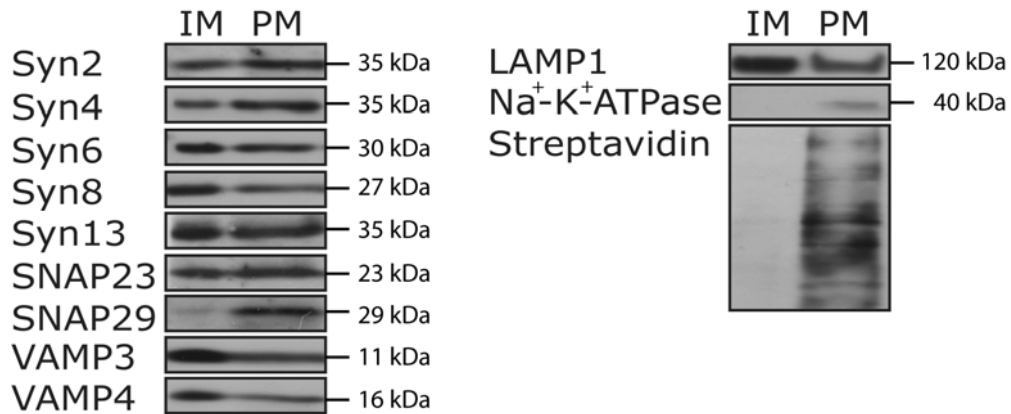


Abb. 4.4: Expression der SNARE-Proteine an der Plasmamembran

Die Plasmamembran von Oli-neu Zellen wurde biotinyliert und die Zellen mittels eines *Cellcrackers* mechanisch homogenisiert. Die Plasmamembranfragmente (PM) wurden mit Hilfe von Neutravidin-*beads* isoliert, der Überstand enthielt intrazelluläre Membranen (IM). Die Fraktionen wurden mittels Westernblot auf verschiedene SNARE-Proteine getestet. Als Plasmamembran-Kontrollen dienen Streptavidin und das Transmembranprotein Natrium-Kalium-ATPase. LAMP1 fungiert als intrazelluläre Kontrolle. Syn, Syntaxin; Na⁺, Natrium; K⁺, Kalium.

4.5 Oligodendrogliale SNARE-Komplexe

Soll ein Vesikel mit seiner Zielmembran fusionieren, so muss ein sogenannter *trans*-SNARE-Komplex gebildet werden. Dieser bringt die beiden Membranen (Vesikel- und Zielmembran) dicht genug beieinander, so dass der Vesikel fusionieren und seinen Inhalt freisetzen kann. Die Spezifität der Vesikelfusion ist dabei u.a. von den SNARE-Proteinen abhängig (Kap. 2.5.5). Nur wenn die passenden SNAREs, bestehend aus einem R, Q_a, Q_b und einem Q_c-SNARE-Motiv, aufeinander treffen, bildet sich der Komplex und der Vesikel fusioniert. Kennt man somit die existierenden SNARE-Komplexe und die Lokalisation der SNAREs, so kann man Rückschlüsse auf die verschiedenen Transportwege in einer Zelle ziehen. Zur Ermittlung der bestehenden oligodendroglialen SNARE-Komplexe wurden primäre Oligodendrozyten oder Oli-neu Zellen mit N-Ethylmaleimid behandelt um ein *Recycling* der SNARE-Komplexe zu verhindern. Anschließend wurden Co-Immunpräzipitationen mit Antikörpern gegen die SNARE-Proteine VAMP3 (Abb. 4.5 A), Syntaxin 4 (Abb. 4.5 B), VAMP4 (Abb. 4.5 C), Syntaxin 6 (Abb. 4.5 D), Syntaxin 13 (Abb. 4.5 E) und Syntaxin 8 (Abb. 4.5 F) durchgeführt. Zusätzlich diente die Immunpräzipitation mit einem Kaninchen-anti-Maus-Antikörper als Kontrolle (Abb. 4.5 G).

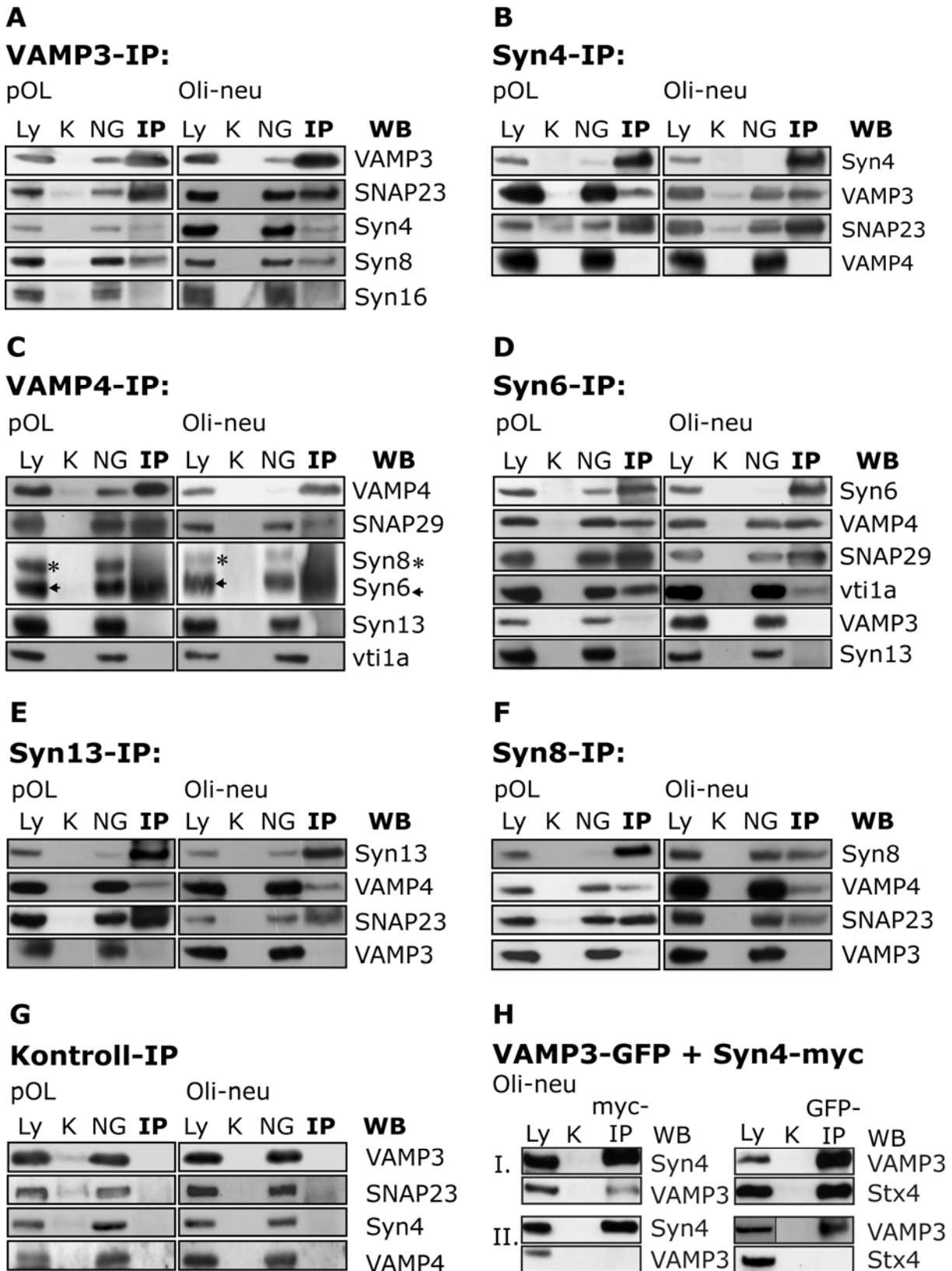


Abb. 4.5: Co-Immünpräzipitationen primärer Oligodendrozyten und Oli-neu Zellen

Immunpräzipitationen der SNARE-Proteine VAMP3 (A), Syntaxin 4 (B), VAMP4 (C), Syntaxin 6 (D), Syntaxin 13 (E), Syntaxin 8 (F) von primären Oligodendrozyten (links) und Oli-neu Zellen (rechts). Mögliche Interaktionspartner wurden mittels Westernblot analysiert. Zusätzlich wurde eine Kontroll-Immunpräzipitation mit einem Kaninchen-anti-Maus-IgG-Antikörper durchgeführt (G). (H) Oli-neu Zellen wurden entweder mit den Expressionsvektoren VAMP3-GFP und Syntaxin4-myc co-transfiziert (I.) oder einzeln transfiziert und nach der Herstellung der Triton-Lysate vereinigt (II.). Die Co-Immunpräzipitation mit α -myc- (links) oder α -GFP-Antikörpern (rechts) ergibt lediglich im Fall der Co-Transfektion Signale in der IP-Fraktion. Ly, Lysat vor IP; K, Kontrolle für unspezifische Bindung der SNARE-Proteine an Protein-A-Sepharose (*preclear*); NG, Lysate nach der IP, zeigen nicht an Protein-A-Sepharose gebundenes Protein; IP, Immunpräzipitation; pOL, primäre Oligodendrozyten; Syn, Syntaxin; WB, Westernblot.

Generell zeigten die Co-Immunpräzipitationen eine Spezifität, da nur bestimmte SNAREs an das zu präzipitierende Protein binden konnten, andere hingegen nicht. Aufgrund der evolutionären Konservierung der SNARE-Proteine und v.a. des SNARE-Motivs wäre es denkbar, dass in einem Lysat alle SNAREs aneinander binden konnten, dem war jedoch nicht der Fall. Es ist jeweils ein SNARE-Protein gezeigt, das in der Immunpräzipitation nicht gebunden hat. Dabei zeigen die Blots im Fall einer VAMP-Immunpräzipitation ein nicht-bindendes Syntaxin, im Fall einer Syntaxin-Immunpräzipitation, ein nicht-bindendes VAMP. Die Kontroll-Co-Immunpräzipitation zeigte keinerlei Signale in der Immunpräzipitationsfraktion, was ebenfalls für die Spezifität der Immunpräzipitationen spricht. Zudem zeigten primäre Oligodendrozyten und Oli-neu Zellen identische Ergebnisse.

In der VAMP3 (R)-Immunpräzipitation (Abb. 4.5 A) konnten die SNARE-Proteine SNAP23 (Q_{bc}) und Syntaxin 4 (Q_a) co-isoliert werden, nicht hingegen Syntaxin 16 (Q_a). Gleiche Ergebnisse fanden sich in der Syntaxin 4 (Q_a)-Immunpräzipitation (Abb. 4.5 B). VAMP4 (R) wurde dagegen nicht co-präzipitiert und zeigte die Spezifität der Interaktionen. Der dargestellte Komplex besteht aus allen benötigten SNARE-Motiven (R, Q_a , Q_b , Q_c) und stellt somit einen möglichen, fusionsfähigen Komplex dar.

Zusätzlich konnten zahlreiche SNARE-Interaktionen gezeigt werden, die entweder nur von einer Seite (nur eine Immunpräzipitation) bestehen, oder nicht fusionsfähige Komplexe darstellen. So co-präzipitierte die VAMP3-Immunpräzipitation (Abb. 4.5 A) das Q_c -SNARE Syntaxin 8. Dies konnte jedoch in einer Syntaxin 8-Immunpräzipitation nicht bestätigt werden. Ein Komplex aus zwei Q_c -SNAREs (Syn8 und SNAP23) ist zudem nicht fusionsfähig.

In der Syntaxin 8-Immunpräzipitation (Abb. 4.5 F) konnten die SNARE-Proteine VAMP4 (R) und SNAP23 (Q_{bc}) co-isoliert werden. Dabei ist ein Komplex aus Syntaxin 8 (Q_c) und VAMP4 (R) prinzipiell möglich, SNAP23 (Q_{bc}) hingegen liefert das falsche SNARE-Motiv und führt damit zu einem nicht-fusionsfähigen SNARE-Komplex.

Zusätzlich konnten Interaktionen zwischen den SNARE-Proteinen VAMP4 (R) und Syntaxin 6 (Q_c) gezeigt werden (Abb. 4.5 C, D). Dies war sowohl in der VAMP4-Immunpräzipitation als auch in der Syntaxin 6-Immunpräzipitation möglich. In beiden Fällen konnte zusätzlich das Q_{bc}-SNARE SNAP29 präzipitiert werden. Dies würde jedoch erneut zu einem nicht fusionsfähigen SNARE-Komplex führen. Die Syntaxin 6-Immunpräzipitation (Abb. 4.5 D) zeigte jedoch zusätzlich ein vti1a (Q_b)-Signal in der Immunpräzipitationsfraktion. Dies würde einen fusionsfähigen Komplex ergeben. Möglicherweise existieren in oligodendroglialen Zellen mehrere Komplexe mit dem SNARE VAMP4. Einerseits könnte VAMP4 mit SNAP23 interagieren, andererseits einen Komplex mit Syntaxin 6 und vti1a bilden.

Die Syntaxin 13 (Q_a)-Immunpräzipitation (Abb. 4.5 E) zeigte Interaktionen mit den SNAREs VAMP4 (R) und SNAP23 (Q_{bc}). Die SNARE-Motive können einen fusionsfähigen Komplex bilden.

Die gezeigten, möglichen SNARE-Interaktionen sind lediglich als Indizien für die, in Fusionsreaktionen involvierten, SNARE-Komplexe anzusehen. Es wurde gezeigt, dass manche SNARE-Proteine in Anwesenheit von Triton-X100 zufällige, nicht fusionsfähige Komplexe bilden können (Bethani et al., 2007). Jedoch zeigen SNARE-Proteine in Anwesenheit von Triton-X100 eine deutliche Präferenz für ihre fusionsfähigen, korrekten Partner, d.h. ermittelte starke Interaktionen können ein Indiz für fusionsfähige SNARE-Komplexe sein. Zur Kontrolle einer möglichen Interaktion der SNAREs VAMP3 und Syntaxin 4 in Anwesenheit des Detergenz (Abb. 4.5 H) wurden Oli-neu Zellen entweder mit den Expressionsvektoren VAMP3-GFP und Syntaxin4-myc co-transfiziert (Abb. 4.5 H, I.) oder einzeln transfiziert (Abb. 4.5 H, II.) und nach der Herstellung der Triton-Lysate gemischt. Signale in der IP-Fraktion waren lediglich im Fall der Co-Transfektionen zu detektieren, was zeigt, dass es sich um zellulär existierende SNARE-Komplexe handelte, nicht aber um Komplexe, die erst im Triton-Lysat entstanden waren. Ob ein Komplex tatsächlich fusionsfähig ist, kann jedoch nur durch funktionelle Studien ermittelt werden. Die hier gezeigten Co-Immunpräzipitationen sollen jedoch Hinweise auf existierende SNARE-Komplexe liefern, um eine bestmögliche Auswahl für funktionelle Studien treffen zu können.

4.6 Doppelfärbungen ausgewählter SNARE-Proteine mit PLP

Zur Analyse des PLP-Transports in oligodendroglialen Zellen wurden Doppelfärbungen ausgewählter SNARE-Proteine mit PLP angefertigt (Abb. 4.6). Diese würden, im Fall einer Co-Lokalisation, Aufschluß darüber geben, ob ein bestimmtes SNARE am Transport des Myelinproteins beteiligt ist. Oli-neu Zellen wurden mit PLP transfiziert. Primäre Zellen exprimieren endogen ausreichend PLP, so dass eine Transfektion des Myelinproteins nicht nötig war. Aufgrund einer nur geringen Expressionsintensität wurden die SNARE-Proteine VAMP7 (VAMP7-GFP), Syntaxin 2 (Syntaxin 2-myc), Syntaxin 3 (Syntaxin 3-myc) und Syntaxin 4 (Syntaxin 4-myc) ebenfalls in Oli-neu Zellen ektopisch exprimiert (Kap. 3.4). In Abb. 4.6 A sind Doppelfärbungen zur lysosomalen Lokalisation von PLP zusammengefasst. So co-lokalisierte sowohl das Myelinprotein PLP mit dem späten endosomalen, lysosomalen Marker LAMP1 (rechts), als auch das R-SNARE VAMP7 (links). Zudem co-lokalisierte VAMP7 mit PLP (Mitte), was eine Beteiligung am PLP-Transport vermuten ließ. In Teilabschnitt B wird deutlich, dass eine Subpopulation des Myelinproteins PLP auch mit den Transferrin-Rezeptor-positiven *Recycling* Endosomen co-lokalisiert (rechts). Das SNARE VAMP3 zeigte eine Lokalisation im *Recycling* Endosom (links). Zusätzlich war eine Co-Lokalisation von VAMP3 mit PLP erkennbar (Mitte). Diese zeigte sich in Oli-neu Zellen hauptsächlich im Zellkörper, in primären Oligodendrozyten auch in den Fortsätzen. Unterschiede, zwischen der Zell-Linie und primären Oligodendrozyten könnten aufgrund unterschiedlicher Differenzierungsstadien entstanden sein.

Geht man von einem Transport des Myelinproteins PLP zur Myelinmembran aus, so müssen an der Zielmembran Q-SNAREs akkumuliert sein, die die Fusion der ankommenden Vesikel ermöglichen. Zur Analyse der potentiellen Plasmamembran-SNAREs und deren Beteiligung am PLP-Transport wurden Co-Färbungen der SNAREs Syntaxin 2, Syntaxin 3 und Syntaxin 4 (Abb. 4.6 C) angefertigt. Im Fall der Überexpression zeigten die SNAREs eine deutliche Akkumulation in den Fortsätzen der Oli-neu Zellen (Abb. 4.6 C, rot), an denen sie stark mit PLP (Abb. 4.6 C, grün) co-lokaliserten.

Die Ergebnisse zur Expression, Regulation und subzellulären Lokalisation der SNARE-Proteine wurden in Tabelle 4.1 zusammengefasst. Potentielle SNARE-Komplexe, die Co-Lokalisation mit PLP und mögliche Transportwege sind in Tabelle 4.2 erläutert.

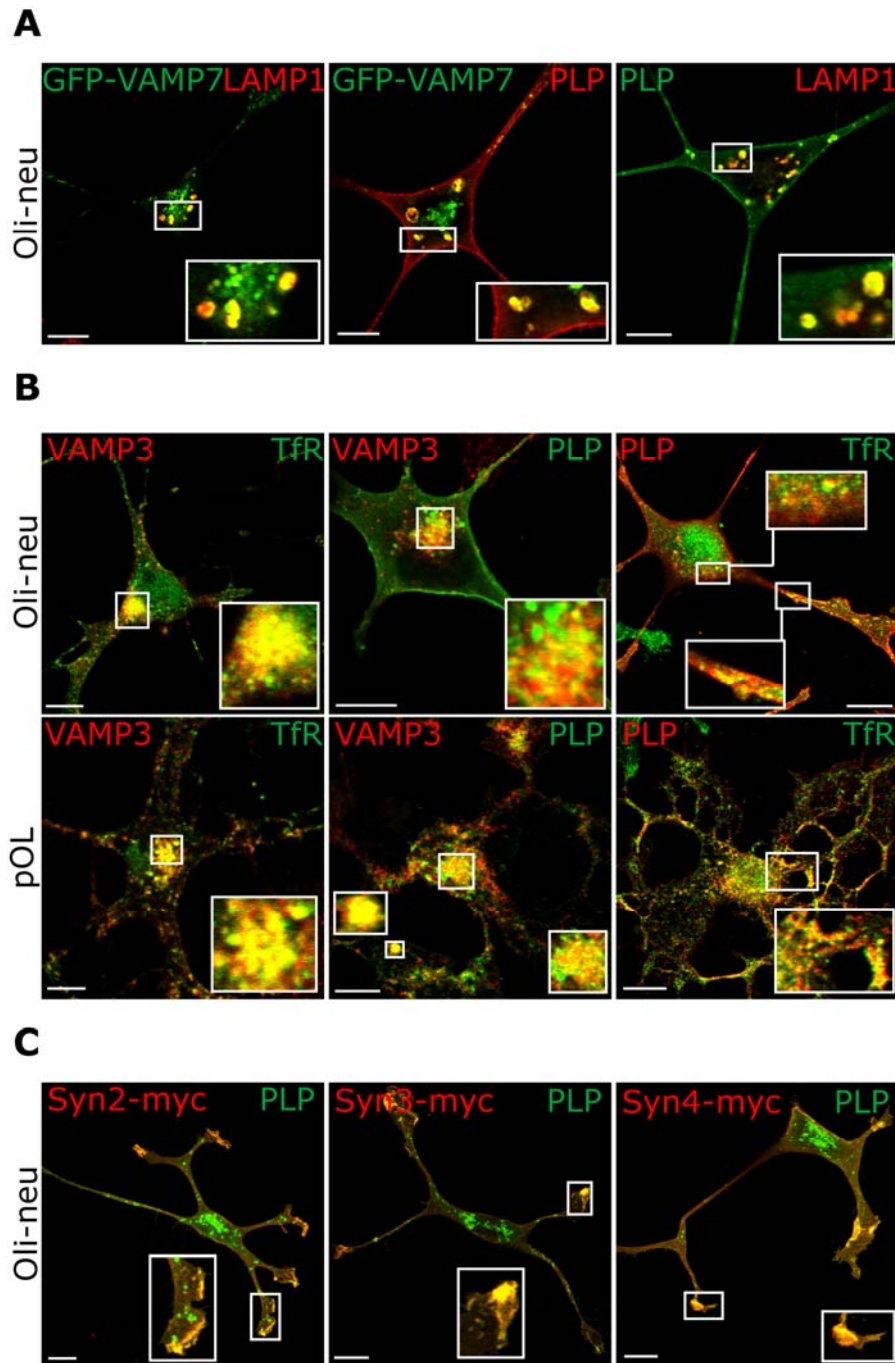


Abb. 4.6: Co-Lokalisierungen der SNARE-Proteine mit PLP

Konfokale Aufnahmen der Doppelfärbungen ausgewählter SNARE-Proteine mit dem Myelinprotein PLP. Die SNARE-Proteine VAMP7, Syntaxin 2, Syntaxin 3 und Syntaxin 4 wurden mittels Transfektion der GFP- bzw. myc-Expressionsvektoren in Oli-neu Zellen überexprimiert. PLP wurde in Oli-neu Zellen ebenfalls ektopisch exprimiert, da endogenes PLP in oligodendroglialen Vorläuferzellen nur schwach exprimiert wird. **(A)** Die Abbildung zeigt die Co-Lokalisierungen zwischen VAMP7 und den späten Endosomen, Lysosomen (Marker LAMP1), zwischen VAMP7 und dem Myelinprotein PLP sowie die Co-Lokalisation zwischen PLP und den späten Endosomen, Lysosomen. **(B)** Co-Lokalisierungen zwischen VAMP3 und dem *Recycling* Endosom (Marker Transferrin Rezeptor), VAMP3 und PLP, sowie PLP und dem *Recycling* Endosom. **(C)** Doppelfärbungen der Plasmamembran-SNAREs Syntaxin 2, Syntaxin 3 und Syntaxin 4 mit PLP in den Fortsätzen der Zellen. Messbalken: 5 μm . pOL; primäre Oligodendrozyten; Syn, Syntaxin.

SNARE	Oli-neu	pOL	Myelin	Lokalisation
Syntaxin 1	-	-	n.d.	-
Syntaxin 2	X	X →	X →	V, PM
Syntaxin 3	O/X	X ↑	X ↑	V, PM
Syntaxin 4	X	X ↑	X ↑	V, PM
Syntaxin 6	X	X →	X ↓	Golgi, RE
Syntaxin 7	X	X →	X ↓	RE, LE, Ly
Syntaxin 8	X	X →	X →	RE, LE, Ly
Syntaxin 13	X	X →	X ↓	Golgi, RE
Syntaxin 16	X	X →	X ↓	Golgi
vti1a	X	X →	n.d.	n.d.
vti1b	X	X →	n.d.	LE, Ly
SNAP23	X	X ↑	X →	V, PM
SNAP25	-	-	n.d.	-
SNAP29	X	X ↓	X ↑	Zyto, PM
VAMP1	-	-	n.d.	-
VAMP2	X/O	X →	X ↓	V
VAMP3	X	X ↑	X ↓	RE
VAMP4	X	X →	X ↓	Golgi
VAMP7	X	X →	X ↑	LE, Ly
VAMP8	-	-	n.d.	-

Tab. 4.1: Expressionsprofil der SNARE-Proteine.

pOL, primäre Oligodendrozyten; X, Expression; X/O, schwache Expression; n.d., nicht determiniert; V, vesikulär; PM, Plasmamembran; RE, *Recycling* Endosom; LE, spätes Endosom; Ly, Lysosom; Zyto, zytoplasmatisch.

SNARE	Co-Lok. PLP	Komplex	Möglicher Transportweg
Syntaxin 1	-	-	-
Syntaxin 2	X	n.d.	Golgi, Endosom → PM
Syntaxin 3	X	n.d.	Golgi, Endosom → PM
Syntaxin 4	X	SNAP23, VAMP3	Endosom → PM
Syntaxin 6	-	vti1a, SNAP29, VAMP4	Golgi → Endosom, PM
Syntaxin 7	X	n.d.	Endosom ↔ Endosom
Syntaxin 8	X	SNAP23, VAMP4	Endosom ↔ Endosom
Syntaxin 13	-	SNAP23, VAMP4	Golgi ↔ Endosom
Syntaxin 16	-	n.d.	Golgi ↔ Endosom, PM
vti1a	n.d.	n.d.	n.d.
vti1b	n.d.	n.d.	Endosom ↔ Endosom
SNAP23	-	n.d.	Golgi, Endosom → PM
SNAP25	-	-	-
SNAP29	-	n.d.	Golgi → Endosom, PM
VAMP1	-	-	-
VAMP2	-	n.d.	n.d.
VAMP3	X	Syn4, Syn8, SNAP23	Endosom → PM
VAMP4	-	Syn6, SNAP29	Golgi ↔ Endosom, PM
VAMP7	X	n.d.	n.d.
VAMP8	-	-	-

Tab. 4.2: SNARE-Komplexe und Zuordnung der SNAREs zu oligodendroglialen Transportrouten

Lok., Lokalisation; X, bestehende Co-Lokalisation; n.d., nicht determiniert; PM, Plasmamembran.

4.7 Auswirkungen von dbcAMP auf den PLP-Transport in der Zell-Linie Oli-neu

Aufgrund der besseren Manipulierbarkeit der Zellen wurden funktionelle Studien, bei denen die Zellen mit siRNA, Expressionsvektoren oder Toxinen transfiziert werden mussten, in der Zell-Linie Oli-neu durchgeführt. Oli-neu Zellen zeigten ein identisches Expressionsmuster der SNARE-Proteine (Abb. 4.1 A), und auch die subzelluläre Lokalisation der SNAREs war mit primären Oligodendrozyten identisch (Abb. 4.3). Somit sind Oli-neu Zellen für die Analyse des vesikulären Transports geeignet.

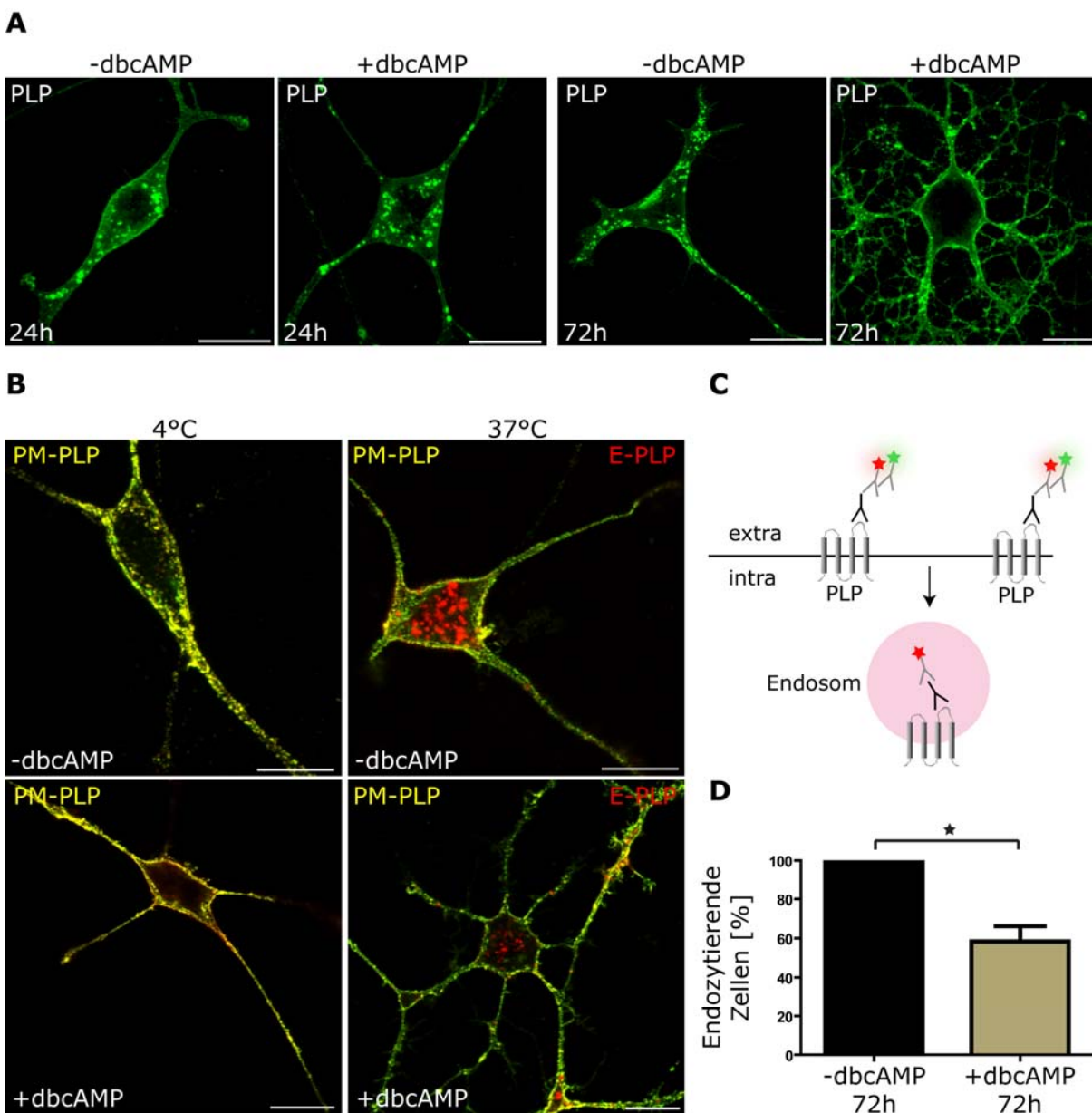


Abb. 4.7: Die Wirkung von dbcAMP auf den PLP-Transport in Oli-neu Zellen

(A) Oli-neu Zellen wurden mit PLP transfiziert, 24h bzw. 72h mit dbcAMP behandelt und anschließend mit Antikörpern gegen PLP (aa3) gefärbt. Nach 72h dbcAMP-Behandlung zeigen die Zellen eine differenziertere Morphologie. Zudem ist, das zuvor endosomal lokalisierte PLP an der Plasmamembran. Messbalken: 10 μm . **(B)** Oli-neu Zellen wurden mit PLP transfiziert und für 72 h mit dbcAMP behandelt. Es folgte eine Lebendinkubation der Zellen mit Antikörpern gegen ein extrazelluläres Epitop von PLP (O10-Antikörper) und einem Cy3-gekoppelten Sekundärantikörper. Anschließend wurden die Zellen für 1 h bei 37°C inkubiert um die Endozytose zu ermöglichen (E-PLP, endozytiertes PLP). Nicht endozytiertes PLP wurde mit einem Cy2-gekoppelten Sekundärantikörper gegen gefärbt und erscheint in der Überlagerung der Aufnahmen gelb (PM-PLP, Plasmamembran-PLP). Messbalken: 10 μm . **(C)** Schematische Darstellung des Endozytose-Versuchs. **(D)** Auszählung endozytischer Zellen. Es wurden jeweils 100 Zellen gezählt ($n=3$, SEM, gepaarter t-Test).

Ein wesentlicher Unterschied der Zell-Linie Oli-neu zu primären Oligodendrozyten liegt in der Fähigkeit zu differenzieren. Wie bereits in Kapitel 4.1 erwähnt, differenzieren primäre Oligodendrozyten spontan, ohne neuronale Signale, und bilden MLMs. Oli-neu Zellen sind oligodendrogliale Vorläuferzellen und differenzieren nicht spontan. Durch die Zugabe von dbcAMP kann jedoch eine Differenzierung herbeigeführt werden. Die Auswirkungen der dbcAMP-Zugabe auf den PLP-Transport sind in Abb. 4.7 dargestellt.

Oli-neu Zellen wurden mit PLP transfiziert und für 24 h (Abb. 4.7 A links) bzw. 72 h (Abb. 4.7 A rechts) mit dbcAMP behandelt. Ohne dbcAMP oder nach nur 24 h dbcAMP-Gabe war keine Veränderung in der Morphologie oder der Lokalisation von PLP festzustellen. Nach 72 h waren die Zellen deutlich differenzierter und entwickelten mehr Fortsätze. Außerdem war die subzelluläre Lokalisation von PLP verändert. Das zuvor endosomal lokalisierte PLP-Protein war nun fast vollständig an der Plasmamembran lokalisiert.

Um die Auswirkung der dbcAMP-Behandlung auf die Endozytose von PLP zu untersuchen wurden Oli-neu Zellen mit PLP transfiziert und für 72 h mit dbcAMP behandelt. Anschließend wurden die Zellen lebend mit einem Antikörper gegen ein extrazelluläres Epitop von PLP inkubiert (O10). Dieser wurde mit einem Cy3-gekoppelten Sekundärantikörper visualisiert. Es folgte eine einstündige Inkubation der Zellen bei 37°C um die Endozytose des Antikörper-gekoppelten PLP zu ermöglichen (E-PLP, endozytiertes PLP, rot). Ein Kontrollansatz blieb in dieser Zeit bei 4°C. Anschließend wurde nicht endozytiertes PLP mit einem Cy2-gekoppelten Sekundärantikörper gegen gefärbt (PM-PLP, Plasmamembran-PLP, gelb). Diese Subpopulation des PLP erscheint in der Überlagerung der Aufnahmen gelb (Abb. 4.7 B). Ein Schema des Endozytose-Versuchs ist in Abb. 4.7 C dargestellt. In dbcAMP-behandelten Zellen waren deutlich weniger rote Endosomen erkennbar. Eine Auszählung von 100 Zellen ergab eine signifikante Reduktion der Endozytose um 41,6% (+/- 7,87) (Abb. 4.7 D).

Die Ergebnisse zeigen, dass ohne dbcAMP in Oli-neu Zellen ein Gleichgewicht aus exozytotischen und endozytotischen PLP-Transportprozessen herrscht. Der Hauptanteil des Proteins befindet sich in intrazellulären Kompartimenten. Durch die Zugabe von dbcAMP kommt es zu einer deutlichen Translokation von PLP an die Plasmamembran

(Exozytose) und zu einer Hemmung der PLP-Endozytose. Der Hauptanteil des Proteins befindet sich an der Zelloberfläche. Basierend auf diesen Beobachtungen wurden im Folgenden induzierbare Translokationsversuche zum PLP-Transport von intrazellulären Kompartimenten zur Plasmamembran in Abwesenheit verschiedener SNARE-Proteine durchgeführt.

4.8 Die funktionelle Inaktivierung von VAMP3 vermindert den zur Plasmamembran gerichteten PLP-Transport

Eine Subpopulation von PLP kolokalisierte mit dem SNARE-Protein VAMP3 (Abb. 4.6 B). Zur Analyse der VAMP3-Beteiligung am Transport des Myelinproteins wurde zum einen eine Spaltung des SNAREs durch chlostridiales Tetanustoxin (TeNT; Abb. 4.8 A-C), zum anderen ein *Knockdown* mittels siRNA durchgeführt (Abb. 4.8 D-G).

Tetanustoxin spaltet spezifisch die SNARE-Proteine VAMP1, VAMP2 und VAMP3 (Kap. 2.5.7). In neurowissenschaftlichen Experimenten kann gezielt nur die leichte Kette des Toxins (Protease) in Zellen transfiziert werden, um die pathogene Wirkung auf den Menschen zu verhindern (die schwere Kette dient der Anheftung an Neurone). Es existieren sowohl proteolytische Tetanustoxinvektoren (TeNT wt), als auch mutante Vektoren, die keine proteolytische Wirkung zeigen, da spezifisch eine Aminosäure der Toxinsequenz ausgetauscht wurde (TeNT mut; Austausch von Glutaminsäure zu Glutamin, TeNT E234Q) (McMahon et al., 1993). Oli-neu Zellen wurden mit den Tetanustoxin-Expressionsvektoren (TeNT wt und TeNT mut) transfiziert, für 3 Tage mit dbcAMP behandelt und mittels Westernblot analysiert (Abb. 4.8 A). Im Fall des proteolytischen Toxins (Abb. 4.8 A, TeNT wt) war die Expression von VAMP2 und VAMP3 stark vermindert. VAMP7 hingegen wurde nicht gespalten. Tubulin diente als Ladekontrolle. Im Folgenden wurde die Auswirkung der proteolytischen Spaltung von VAMP2 und VAMP3 auf den Transport von PLP zur Zelloberfläche untersucht. Dazu wurden Tetanustoxin-transfizierte Oli-neu Zellen 3 Tage mit dbcAMP behandelt und eine immunzytochemische Analyse mit Antikörpern gegen VAMP3 (Abb. 4.8 B, grün), Gesamt-PLP (Abb. 4.8 B, rot, aa3-Antikörper, erkennt intrazelluläres Epitop) und Plasmamembran-PLP (Abb. 4.8 B, weiß, O10-Antikörper, erkennt extrazelluläres PLP-Epitop) durchgeführt. Die Färbung des Zelloberflächen-PLP (O10-Antikörper) wurde dabei an lebenden Zellen, auf Eis, vor der Inkubation der weiteren Antikörper durchgeführt. Die VAMP3-Färbung diente zur Identifikation transfizierter Zellen, die somit kein, oder nur wenig VAMP3-Protein exprimierten. Die Fluoreszenzfärbungen zeigten, dass in Abwesenheit von VAMP3 deutlich weniger PLP an die Plasmamembran transportiert wurde (Abb. 4.8 B). Die Quantifizierung der Menge an oberflächen-transportiertem PLP

erfolgte mit Hilfe der Software Image Pro Plus (Kap. 3.10.7). Dabei wurde die Intensität der Fluoreszenzfärbung von Oberflächen-PLP (O10-Antikörper) und Gesamt-PLP (aa3-Antikörper) ermittelt und zueinander in Relation gesetzt. Es wurden, in drei unabhängigen Versuchen, jeweils 15 Zellen quantifiziert (Abb. 4.8 C). Im Fall des gespaltenen VAMP3-Proteins war 40,7% (+/- 1,764) weniger PLP zur Plasmamembran transportiert worden. Die Versuche bezüglich der PLP-Translokation nach Transfektion der Tetanustoxine wurden u.a. von Madeleine Schönherr durchgeführt und werden im Genaueren in ihrer Diplomarbeit (Funktionelle Rolle des SNARE-Proteins VAMP3 bei der Myelinisierung, M. Schönherr, 2008) beschrieben.

Da durch chlostridiales Tetanustoxin sowohl VAMP2 als auch VAMP3 gespalten wurden, konnte der beobachtete Effekt durch beide R-SNAREs entstanden sein. Zur genaueren Analyse wurde ein *Knockdown* des VAMP3-Proteins mittels siRNA durchgeführt. Dazu wurden Oli-neu Zellen mit Kontroll- bzw. VAMP3-siRNA transfiziert und für 3 Tage mit dbcAMP behandelt. Die Westernblotanalyse von Zell-Lysaten zeigte einen starken *Knockdown* des VAMP3-Proteins (>80%). Das VAMP2-Protein wurde in der Expression nicht beeinflusst (Abb. 4.8 E). Im PLP-Translokationsversuch (Abb. 4.8 D) wurde die Zell-Linie Oli-neu PLP-eGFP verwendet. Diese trägt ein stabil inseriertes PLP-eGFP-Fusionsprotein und lässt sich, wie auch Oli-neu Zellen, durch die Zugabe von dbcAMP differenzieren. Zur Analyse der PLP-Oberflächen-Translokation wurden die Zellen mit VAMP3- oder Kontroll-siRNA transfiziert, für 0 bzw. 72 h mit dbcAMP behandelt und anschließend mit Antikörpern gegen VAMP3 (zur Identifikation transfizierter Zellen, nicht gezeigt) und Plasmamembran-PLP (O10-Antikörper, Abb. 4.8 D, rot) gefärbt. Die Intensität der Plasmamembran-PLP-Färbung (rot) wurde zur Intensität der Gesamt-PLP-Färbung (grün) normalisiert, so dass ein Wert für die Menge an oberflächen-transportiertem PLP entstand. Nach 0 h war kein signifikanter Unterschied im Oberflächen-PLP-Transport zwischen Kontroll- und VAMP3-siRNA erkennbar. Nach 72 h dbcAMP-Behandlung hingegen zeigte sich eine Reduktion des Plasmamembran-PLPs um 56,7% (+/- 5,354%) (Abb. 4.8 F).

Desweiteren wurden die siRNA-Ergebnisse durch einen Zell-ELISA bestätigt. Dazu wurden Oli-neu PLP-eGFP Zellen mit VAMP3- oder Kontroll-siRNA transfiziert, 3 Tage mit dbcAMP behandelt und die Menge an Oberflächen-PLP (O10-Antikörper) ermittelt. Es zeigte sich erneut eine Reduktion der Menge an Plasmamembran-PLP in Abwesenheit von VAMP3. 53,3% (+/- 13,06%) des Myelinproteins konnten an die Plasmamembran transportiert werden.

In allen Experimenten zum VAMP3-abhängigen PLP-Transport zeigte sich kein vollständiges Fehlen von PLP an der Plasmamembran. Die Menge an Oberflächen-PLP war jeweils um ca. 50% reduziert.

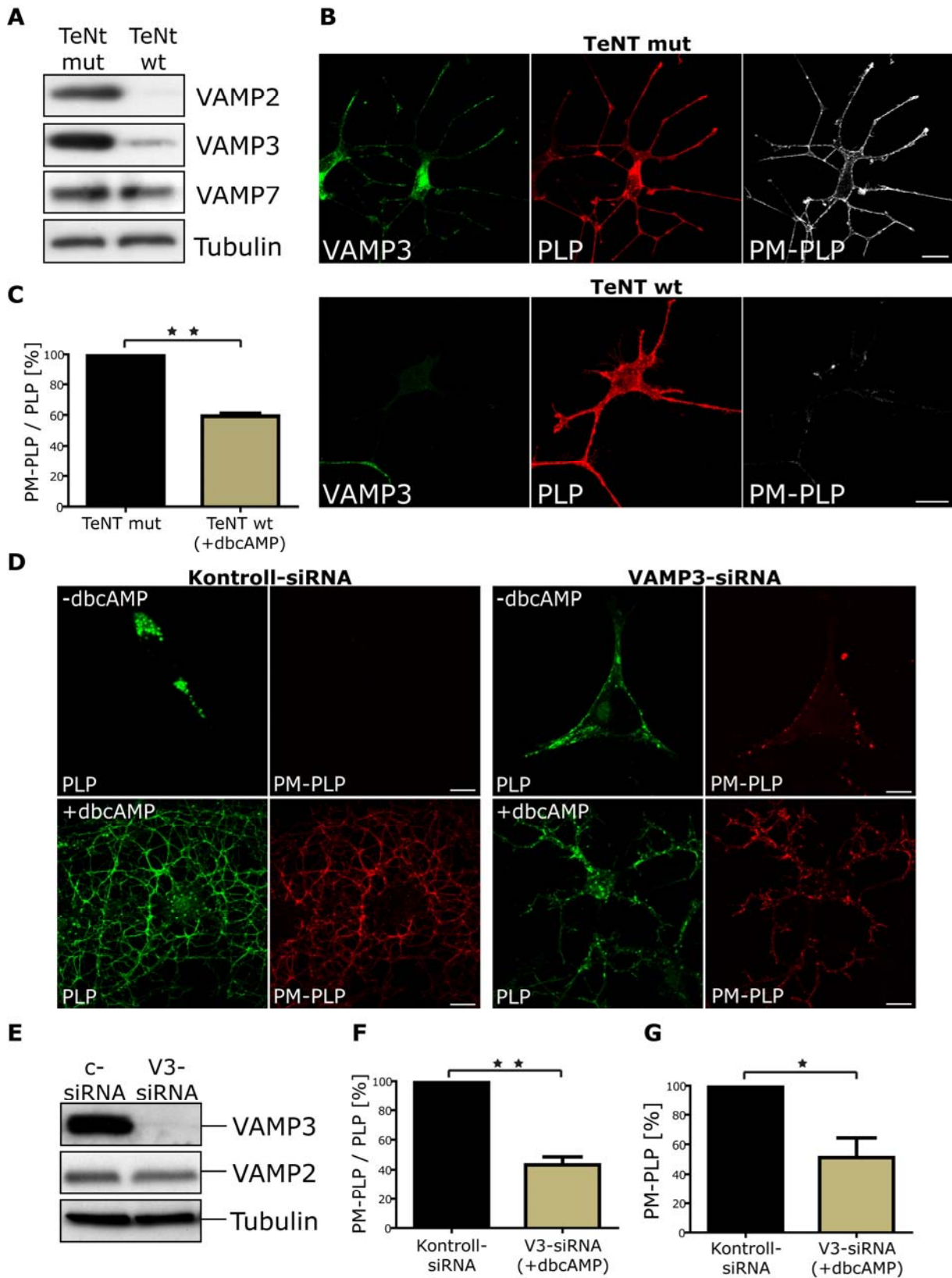


Abb. 4.8: Auswirkung des VAMP3-silencing auf den PLP-Transport in Oli-neu Zellen

(A) Oli-neu Zellen wurden mit proteolytischem Tetanustoxin (TeNT wt) oder der nicht-proteolytischen Form (TeNT mut, TeNT E234Q) transfiziert und die Effizienz der Spaltung der R-SNAREs mittels Westernblot überprüft. Tubulin dient als Ladekontrolle. (B) PLP-Translokationsversuch nach Tetanustoxinspaltung der SNAREs VAMP2 und VAMP3. Oli-neu Zellen wurden mit den Tetanustoxin-Expressionsvektoren transfiziert, 3 Tage mit dbcAMP behandelt und anschließend mit Antikörpern gegen VAMP3 (grün), Gesamt-PLP (rot) und Plasmamembran-PLP (weiß) gefärbt. Mit proteolytischem Tetanustoxin transfizierte Zellen zeigen eine nur sehr schwache VAMP3-Färbung und nur wenig PLP an der Plasmamembran. Messbalken: 10 µm. (C) Quantitative Analyse der Färbungen. Die Intensität der Plasmamembran-PLP-Färbung wurde zur Intensität des Gesamt-PLPs in Relation gesetzt (n=3, Anzahl der Zellen: jeweils 15, SEM, gepaarter t-Test). (D) Oli-neu PLP-eGFP Zellen wurden mit VAMP3- oder Kontroll-siRNA transfiziert, 0 bzw. 72h mit dbcAMP behandelt um eine Translokation des Myelinproteins zur Plasmamembran zu induzieren und anschließend gegen Plasmamembran-PLP (rot) und VAMP3 (nicht gezeigt) gefärbt. Messbalken: 10 µm. (E) Oli-neu Zellen wurden mit VAMP3 (V3)- oder Kontroll (K)-siRNA transfiziert, für 3 Tage mit dbcAMP behandelt und die Effizienz des *Knockdowns* mittels Westernblot analysiert. Tubulin dient als Ladekontrolle. (F) Quantitative Analyse der PLP-Translokations-Färbungen nach siRNA-Behandlung. Die Intensität der Plasmamembran-PLP Färbung wurde zur Intensität des Gesamt-PLPs normalisiert (Software Image Pro Plus). n=3, Anzahl der Zellen: jeweils 20, SEM, gepaarter t-Test. (G) Auswertung der Zell-ELISAs in Oli-neu PLP-eGFP Zellen. Die Menge an Plasmamembran-PLP wurde verglichen zwischen VAMP3- oder Kontroll-siRNA transfizierten Zellen (n=6, SEM, gepaarter t-Test).

4.9 Die funktionelle Inaktivierung von VAMP7 führt zu einem reduzierten PLP-Transport an die Plasmamembran

Die Kolokalisation von VAMP7 mit PLP in den späten Endosomen, Lysosomen (Abb. 4.6 A) lässt eine Beteiligung des SNARE-Proteins am Transport des Myelinproteins vermuten. Zur Analyse wurden Oli-neu Zellen mit den Expressionsvektoren GFP-VAMP7 oder der N-terminalen Longin-Domäne von VAMP7 (GFP-Nter-VAMP7), die dominant-negative Wirkung besitzt (Martinez-Arca et al., 2000b), und PLP transfiziert. Die Zellen wurden für 3 Tage kultiviert und je nach Versuchsansatz mit dbcAMP behandelt. Anschließend wurde Oberflächen-PLP (O10-Antikörper, bindet an ein extrazelluläres Epitop, Abb. 4.9 A, weiß) und Gesamt-PLP (aa3-Antikörper, bindet an ein intrazelluläres Epitop, Abb. 4.9 A, rot) gefärbt. In unbehandelten Oli-neu Zellen war ein deutlicher Unterschied erkennbar. Im Fall der GFP-VAMP7-Transfektion zeigte sich eine starke Plasmamembran-PLP-Färbung (Abb. 4.9 A weiß), d.h. PLP konnte ungehindert von den späten Endosomen, Lysosomen zur Plasmamembran transportiert werden. Im Fall des dominant-negativen Konstrukts (GFP-Nter-VAMP7) war nur sehr wenig PLP an der Plasmamembran detektierbar. Nach dreitägiger Behandlung der Zellen mit dbcAMP war der Effekt jedoch nicht mehr erkennbar, d.h. in beiden Fällen war hier ein Transport des PLP-Proteins an die Zelloberfläche möglich. Die Quantifizierung der Färbungen erfolgte, wie in Kap. 3.10.7 beschrieben, und das Verhältnis zwischen Oberflächen- und Gesamt-PLP wurde ermittelt.

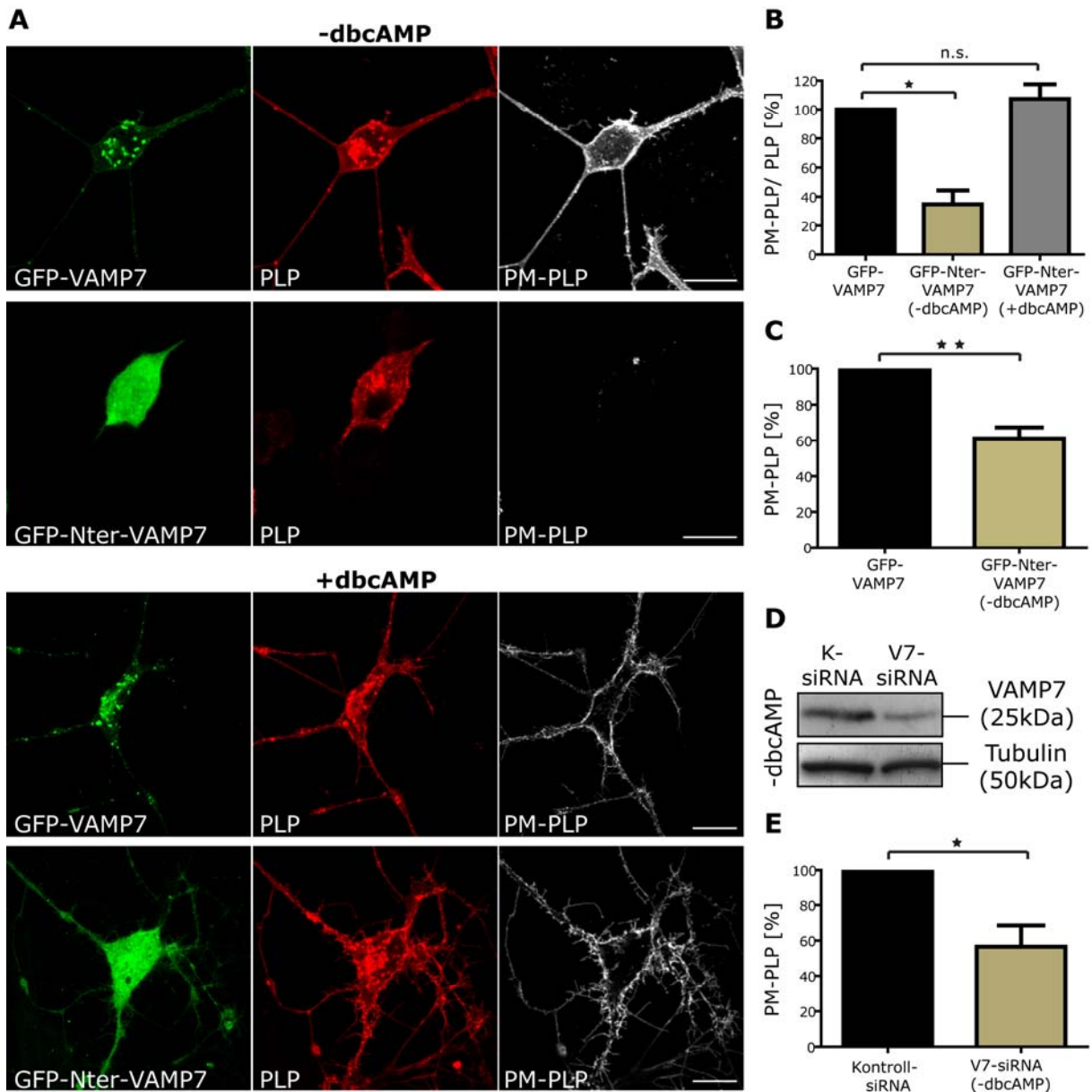


Abb. 4.9: Auswirkung des VAMP7-Knockdown auf den PLP-Transport in Oli-neu Zellen

(A) Oli-neu Zellen wurden mit den Expressionsvektoren PLP und GFP-VAMP7 bzw. der dominant-negativen Form GFP-Nter-VAMP7 transfiziert und nach 3 Tagen mit Antikörpern gegen Gesamt-PLP (rot) oder Plasmamembran-PLP (PM-PLP, weiß) gefärbt. Im Fall der GFP-Nter-VAMP7-transfizierten Zellen ohne dbcAMP-Behandlung ist deutlich weniger PLP an der Plasmamembran. DbcAMP-Behandlung hebt diesen Effekt vollständig auf. Messbalken: 10 μ m. (B) Quantifizierung der Zellfärbungen. Es wurden 3x jeweils 15 Zellen analysiert. Die Intensität der Färbung des PM-PLP wurde zur Intensität des Gesamt-PLP normalisiert (n=3, SEM, gepaarter t-Test). (C) Auswertung 5 unabhängiger Zell-ELISAs. Oli-neu Zellen wurden mit den Expressionsvektoren PLP und GFP-VAMP7 bzw. GFP-Nter-VAMP7 transfiziert. Nach einem Tag ohne dbcAMP-Behandlung wurde die Menge an PM-PLP ermittelt (n=5, SEM, gepaarter t-Test). (D) Analyse des VAMP7-Knockdowns durch siRNA-Behandlung. Oli-neu Zellen wurden mit Kontroll- oder VAMP7-siRNA transfiziert und mittels Westernblot analysiert. (E) Auswertung der Zell-ELISAs. Oli-neu PLP-eGFP Zellen wurden mittels Nukleofektion mit Kontroll- bzw. VAMP7-siRNA transfiziert. Am Folgetag (ohne dbcAMP-Behandlung) wurde die Menge an PM-PLP bestimmt (n=4, SEM, gepaarter t-Test).

Nach der Analyse von 3x je 15 Zellen ergab sich im Fall der GFP-Nter-VAMP7-transfizierten, unbehandelten Zellen eine signifikante Reduktion des PLP-Transports um 65% (+/- 9,46%). Zellen, die drei Tage mit dbcAMP behandelt wurden, zeigten keinen signifikanten Unterschied zur Kontroll-Transfektion mit GFP-VAMP7 (Abb. 4.9 B). Eine Absicherung der Ergebnisse erfolgte mittels eines Zell-ELISAs. Dazu wurden Oli-neu Zellen mit PLP- und den GFP-VAMP7-Expressionsvektoren transfiziert und am Folgetag, ohne dbcAMP-Behandlung, die Menge an Oberflächen-PLP ermittelt. Die Auswertung 5 unabhängiger Versuche ist in Abb. 4.9 C dargestellt. Im Fall der Überexpression des dominant-negativen Expressionsvektors war eine signifikante Reduktion der Menge an Plasmamembran-PLP um 38,8% (+/- 6,15%) erkennbar.

In einer Reihe von Experimenten wurde der Transport von PLP nach siRNA-vermitteltem *Knockdown* von VAMP7 untersucht. Dazu wurden zunächst Oli-neu Zellen mit einer spezifischen VAMP7-siRNA (V7) oder einer nicht-bindenden Kontroll-siRNA (K) transfiziert, für einen Tag ohne dbcAMP kultiviert, und die Effizienz des *Knockdowns* mittels Westernblot überprüft. Es war eine deutliche Reduktion der VAMP7-Expression erkennbar (Abb. 4.9 D). Tubulin diente in diesem Fall als Ladekontrolle. Der Transport von PLP nach siRNA-*Knockdown* von VAMP7 wurde mit Hilfe eines Zell-ELISAs analysiert. Auch hier war im Fall des VAMP7-*Knockdowns* die Menge an Plasmamembran-PLP signifikant reduziert. Es waren nur noch 56,5% (+/- 12,01%) PLP an der Plasmamembran zu detektieren (Abb. 4.9 E).

4.10 Doppel-*Knockdown* der SNARE-Proteine VAMP3 und VAMP7

Aufgrund der Ergebnisse der, in den Abschnitten 4.8 und 4.9, beschriebenen PLP-Translokationsstudien kann von einer Beteiligung der R-SNAREs VAMP3 und VAMP7 am Oberflächen-Transport des Myelinproteins PLP ausgegangen werden. In beiden Fällen ist jedoch lediglich eine Reduktion des PLP-Transports um ca. 50% zu beobachten. Bei einer funktionellen Inaktivierung beider möglichen Vermittler des PLP Transports würde somit eine weitere starke Reduzierung der Lokalisation von PLP an der Plasmamembran erwartet.

Um dies zu untersuchen wurden VAMP3 und VAMP7 simultan in Oli-neu PLP-eGFP Zellen mit Hilfe von siRNAs ausgeschaltet und der Transport von PLP an die Plasmamembran im Zell-ELISA gemessen. Da der Effekt des VAMP7-*Knockdowns* bereits nach 24 Stunden eintrat, der Effekt des VAMP3-*Silencings* jedoch erst nach 72h dbcAMP-Behandlung, wurden die Zellen in diesem Versuchsansatz für 48 Stunden mit dbcAMP behandelt. Anschließend wurde die Menge an Oberflächen-transportiertem PLP ermittelt. In drei

Versuchen zeigte sich eine signifikante Reduktion des Plasmamembran-PLPs um 41% ($\pm 8,09\%$) (Abb. 4.10 A). Da im Fall einer funktionellen Inaktivierung beider R-SNAREs ein stärkerer Effekt erwartet werden konnte, wurden die siRNAs auf ihre *Knockdown*-Effizienz im Fall einer Doppelnukleofektion untersucht. Vor allem im Fall der VAMP3-siRNA zeigte sich, dass der *Knockdown* weniger effizient, als im Fall der Einzeltransfektion war (Abb. 4.10 B). Es konnte somit davon ausgegangen werden, dass noch VAMP3- und VAMP7-Protein in der Zelle vorhanden war, das den Transport von PLP, zumindest teilweise, vermitteln konnte.

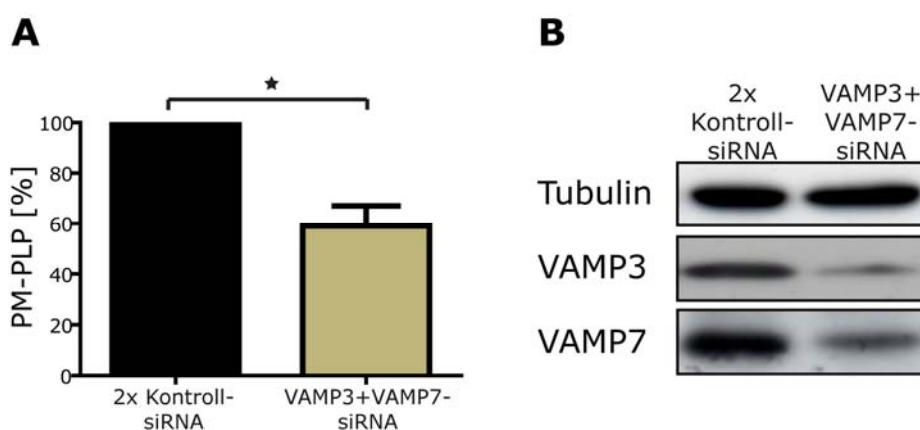


Abb. 4.10: Doppel-Knockdown der SNARE-Proteine VAMP3 und VAMP7.

(A) Oli-neu Zellen wurden simultan mit VAMP3- und VAMP7- bzw. der doppelten Menge an Kontroll-siRNA transfiziert, 2 Tage mit dbcAMP behandelt und anschließend, mittels eines Zell-ELISAs, die Menge an PLP an der Plasmamembran ermittelt ($n=3$, SEM, gepaarter t-Test). (B) Ermittlung der *Knockdown*-Effizienz im Fall der Doppelnukleofektion zweier siRNAs. Oli-neu PLP-eGFP-Zellen wurden mit siRNAs gegen VAMP3 und VAMP7 transfiziert und die Effizienz des *Knockdowns* im Westernblot überprüft.

4.11 Myelinisierung in *mocha*-Mäusen

Die bisher gezeigten Ergebnisse zum Oberflächen-Transport von PLP wurden in der Zell-Linie Oli-neu beobachtet. Um die Rolle von VAMP7 bei der Myelinisierung *in vivo* zu untersuchen wurden AP-3 δ -defiziente Mäuse (*mocha*-Mäuse) herangezogen. *Mocha*-Mäuse sind natürliche Mausmutanten, denen das Adapter-Protein-3 δ fehlt. Adapterproteine (AP) spielen eine große Rolle beim Transport zwischen intrazellulären Kompartimenten. Sie selektieren den Inhalt für abknospende Vesikel (Robinson, 2004). Das Adapterprotein-3 existiert in zwei unterschiedlichen Formen (ubiquitär und neuronal). Beide Varianten bestehen aus vier Untereinheiten wobei die erste, große Untereinheit δ in beiden Formen des AP-3 vorkommt (Danglot and Galli, 2007). *Mocha*-Mäusen fehlen daher beiden Formen des Adapterprotein-3. AP-3 kontrolliert den Transport vom Golgi-Apparat zu späten Endosomen, Lysosomen (Bonifacino and Traub,

2003). Dies zeigt sich an AP-3-defizienten Zellen, die lysosomale Markerproteine wie LAMP1 fehlsortieren (Peden et al., 2004). Auch das spät endosomal, lysosomale SNARE-Protein VAMP7 wird in frühe Endosomen fehlsortiert (Martinez-Arca et al., 2003b). VAMP7 trägt in der N-terminalen Longin-Domäne eine AP-3-Bindesequenz, die für die spät endosomale, lysosomale Lokalisation des SNAREs verantwortlich ist (Proux-Gillardeaux et al., 2007). *Mocha*-Mäuse zeigen folgende Defekte: verminderte Sekretion lysosomaler Enzyme im Urin, schlechte Blutgerinnung, Pigmentierungsdefekte, abnormale Lysosomen, Melanosomen und Thrombozyten-Granula (Feng et al., 1999; Kantheti et al., 1998). Außerdem weisen die Tiere neurologische Defekte wie Hyperaktivität, Epilepsie, Degeneration des Innenohres, Taubheit und Defekte in der Funktion des Hippocampus auf (Miller et al., 1999).

Da gezeigt werden konnte, dass VAMP7 in Oli-neu Zellen den Transport von PLP von den späten Endosomen, Lysosomen zur Plasmamembran vermittelt (Abb. 4.9), war von Interesse, ob in *mocha*-Mäusen, in denen VAMP7 fehlsortiert wird, PLP zur Myelinmembran transportiert werden kann. Dazu wurden *mocha*-Mäuse (Tab. 4.3, MO) und ihre wildtypischen, gleichgeschlechtlichen Wurfgeschwister (Tab. 4.3, WT) untersucht. Das Nassgewicht der Gehirne wurde ermittelt (Tab. 4.3, links). Das Gehirn der *mocha*-Maus wog durchschnittlich 25,2% weniger als ein wildtypisches Gehirn. Nach der quantitativen Isolierung des Myelins zeigte sich eine Reduktion von durchschnittlich 34,5% in der Gesamtmyelinmenge der *mocha*-Gehirne (Tab. 4.3, rechts). Die Reduktion des Gehirngewichtes resultierte somit aus der verminderten Gesamtmyelinmenge in *mocha*-Tieren (Hypomyelinisierung).

Tiere	Gewicht			Myelin		
	WT	MO		WT	MO	
P30, männl.	0,46 g	0,34 g	73%	406 µg	318 µg	78%
P30, weibl.	0,46 g	0,32 g	69%	508 µg	241 µg	47%
P45, weibl.	0,47 g	0,37 g	78%	480 µg	368 µg	77%
1 Jahr, männl.	0,48 g	0,38 g	79%	733 µg	440 µg	60%
			74,8%			65,5%

Tab. 4.3: Übersicht der untersuchten *mocha*-Mäuse (Gehirn-Nassgewicht, isolierte Myelinmenge)

Es wurden vier *mocha*-Mäuse (MO) und deren wildtypische, gleichgeschlechtliche Wurfgeschwister (WT) untersucht. Gezeigt sind das Nassgewicht der jeweiligen Gehirne und die Menge an isoliertem Myelin nach der durchgeführten Myelinpräparation.

Unter der Annahme, dass VAMP7 in PLP-Vesikeln verankert ist, die zur Myelinmembran transportiert werden, sollte es im Verlauf der Myelinisierung zu einer Akkumulation von VAMP7 im Myelin kommen. Dies konnte im Myelin von Mäusen unterschiedlichen Alters bereits gezeigt werden (Abb. 4.2). In *mocha*-Mäusen sollte dieser Transportweg,

aufgrund der Fehlsortierung von VAMP7 in frühe Endosomen, gestört sein. Um dies zu überprüfen, wurde die VAMP7-Expression im Myelin (5µg/Spur) der *mocha*-Mäuse mittels Westernblot untersucht (Abb. 4.11 A_{II}, A_{III}). Tatsächlich war im Myelin der mutanten Mäuse die Menge an VAMP7 um 40,9% (+/- 8,960%; t-Test: 0,0448) reduziert. Der VAMP7-vermittelte vesikuläre Transport zur Myelinmembran in *mocha*-Mäusen ist gestört.

Basierend auf den bisherigen Ergebnissen sollte geprüft werden, ob aufgrund des gestörten vesikulären Transports bestimmte Myelinproteine im Myelin fehlen. Dazu wurde eine genauere Analyse der Gehirn-Homogenate (Abb. 4.11 B) und des isolierten Myelins (Abb. 4.11 A, C) durchgeführt. Zunächst wurden die Proteine des Myelins (10µg/Spur) in einem Silbergel visualisiert (Abb. 4.11, A_I). Es waren lediglich leichte Schwankungen der Proteinmengen im Myelin erkennbar. Einige Proteine wurden stärker im Myelin wildtypischer Tiere, andere im Myelin mutanter Tiere exprimiert (Abb. 4.11 A_I, Pfeile).

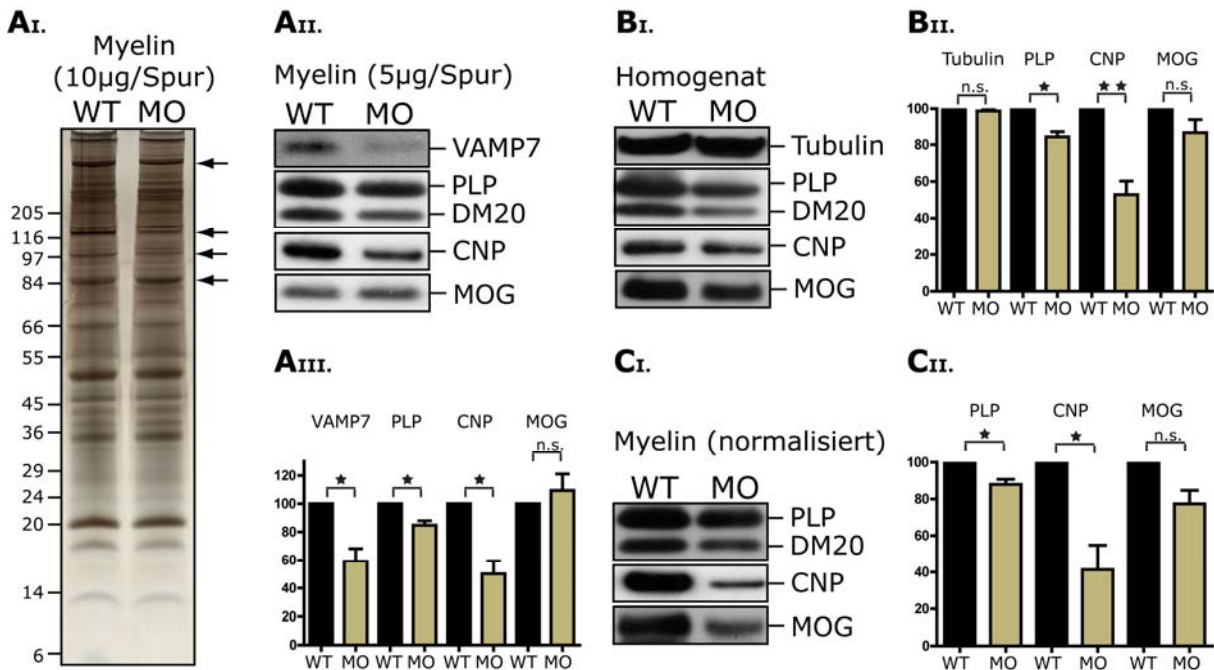


Abb. 4.11: Myelinisierung in *mocha*-Mäusen

Gehirne von *mocha*-Mäusen (MO) oder deren gleichgeschlechtlichen, wildtypischen Wurfgeschwistern (WT) wurden homogenisiert, das Myelin quantitativ isoliert und mittels Westernblot analysiert. Zudem erfolgte eine quantitative Auswertung der Westernblot. n=4, SEM, gepaarter t-Test. (A) Gleiche Mengen Myelin pro Spur wurden analysiert. (A_I) Silberfärbung des Myelins (10µg/Spur). (A_{II}) Westernblotanalyse (5µg/Spur) und quantitative Auswertung (A_{III}). (B) Analyse des Gehirn-Homogenats. (B_I) Westernblotanalyse (5µg/Spur) und quantitative Auswertung (B_{II}). (C) Die aufgetragene Menge an Myelin wurde zur Konzentration des Homogenats normalisiert, da bei einer Reduktion der Myelinisierung dies, nach Normalisierung, nicht erfasst werden kann. (C_I) Westernblotanalyse und quantitative Auswertung (C_{II}).

Eine Analyse gleicher Mengen Myelin (5µg/Spur) im Westernblot (Abb. 4.11, A_{II}) zeigte eine signifikante Reduktion der Myelinproteine PLP und CNP in den Mausmutanten. Die Expression von PLP war um 10,7% (+/- 3,072%), die Expression von CNP um 29,32% (+/- 9,190%) verringert (Abb. 4.11 A_{III}). MOG zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen wildtypischen und mutanten Mäusen. Anschließend wurden gleiche Mengen der Gehirn-Homogenate mittels Westernblot analysiert (Abb. 4.11 B_I). Tubulin diente dabei als Ladekontrolle (Abb. 4.11 B_I, B_{II}). Die Quantifizierung ergab eine signifikante Reduktion für die Myelinproteine PLP und CNP in den mutanten Tieren. Dabei war die Menge an PLP um 15,8% (+/- 2,807%), die Menge an CNP um 26,1% (+/- 7,457%) reduziert. MOG zeigte keine signifikante Veränderung.

Da bei einer generellen Reduktion der Myelinisierung dies, nach Normalisierung des Myelins, nicht erfasst werden kann, wurden zuletzt die Myelinproben zur Konzentration des Homogenats normalisiert (Abb. 4.11 C). Die Quantifizierung ergab erneut eine Reduktion der Menge an PLP (-12,08%; +/- 2,755; t-Test: 0,0220) und CNP (-57,37%; +/- 12,91; t-Test: 0,0212) im Myelin der *mocha*-Mäuse (Abb. 4.11 C_{II}).

Die Ergebnisse der Studie zeigen, dass das R-SNARE VAMP7 sowohl am Transport von PLP als auch am Transport von CNP zur Myelinmembran beteiligt ist. Das Myelinprotein MOG hingegen wird VAMP7-unabhängig zum Myelin transportiert.

5 Diskussion

5.1 Vesikulärer Transport von Myelinkomponenten

Der Prozess der Myelinisierung verlangt einen kontrollierten, gerichteten Transport der Myelinkomponenten von ihrem Ort der Synthese zur Myelinmembran (Kramer et al., 2001; Pfeiffer et al., 1993). Hinzu kommt, dass Myelin aus verschiedenen Subdomänen besteht deren Bestandteile wahrscheinlich vorsortiert, und auf unterschiedlichen Transportrouten zum Myelin transportiert werden müssen (Winterstein et al., 2008). Dabei findet in den meisten Fällen ein vesikulärer Transport der Myelinkomponenten statt, dessen letzter Schritt, also die Fusion des Vesikels, durch SNARE-Proteine vermittelt wird (Hong, 2005; Jahn and Scheller, 2006). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Expression, die Regulation und die subzelluläre Lokalisation oligodendroglialer *post-Golgi*-SNAREs untersucht. Die Auswertung der Daten erlaubte eine Zuordnung der einzelnen SNARE-Proteine zu unterschiedlichen, vesikulären Transportrouten und ließ Rückschlüsse auf die in Oligodendrozyten existierenden Transportwege die zur Bildung und Aufrechterhaltung der Myelinmembran benötigt werden zu (Feldmann et al., 2009). Funktionelle Studien zeigten eine Beteiligung von VAMP3 und VAMP7 am Transport des Hauptmyelinproteins PLP und gaben Aufschluss über dessen Transportwege zur Myelinmembran.

5.2 Die Expression und Regulation der SNARE-Proteine

5.2.1 Die Expression und Regulation der SNAREs in primären Oligodendrozyten und Gehirnlysaten

Oligodendrozyten exprimierten die *post-Golgi*-SNAREs Syntaxin 2, 3, 4, 6, 7, 8, 13, 16, SNAP23, 29, vti1a, vti1b, VAMP2, 3, 4 und 7 sowohl in murinen, primären Oligodendrozyten als auch in der oligodendroglialen Vorläufer-Zell-Linie Oli-neu. Dabei stieg, im Verlauf der *in vitro*-Differenzierung, die Expression der SNARE-Proteine Syntaxin 3, Syntaxin 4, SNAP23 und VAMP3 an, die Expression von SNAP29 hingegen verminderte sich. Bei den SNARE-Proteinen Syntaxin 3, Syntaxin 4 und SNAP23 handelt es sich um typische SNARE-Proteine der Plasmamembran, d.h. die verstärkte Expression in reifen Oligodendrozyten lässt sich wahrscheinlich auf eine vergrößerte Fläche der

Plasmamembran in differenzierten Zellen zurückführen. VAMP3 hingegen ist ein endosomales SNARE. Frühere Studien zum Transport des Hauptmyelinproteins PLP zeigen, dass durch ein neuronales Signal die Endozytose in Oligodendrozyten reduziert und ein Transport von endosomalen Vesikeln zur Plasmamembran induziert wird (Simons and Trajkovic, 2006; Trajkovic et al., 2006). Somit ist die Akkumulation endosomaler SNAREs nicht unerwartet. SNAP29 könnte einen natürlichen Inhibitor der Myelinisierung darstellen. Studien in Neuronen zeigen, dass SNAP29 mit α -SNAP um die Bindung an *trans*-SNARE-Komplexe konkurriert und so das *Recycling* der Komplexe verhindert (Su et al., 2001). Möglicherweise inhibiert SNAP29 spezifische Transportwege in Oligodendrozyten bis die Differenzierung gestartet und die Expression von SNAP29 vermindert wird. Neuste Studien zeigen eine GTP-abhängige Interaktion des SNAREs SNAP29 mit Rab3A. Dabei soll Rab3A die SNAP29-vermittelte PLP-Vesikelfusion mit der Myelinmembran kontrollieren (Schardt et al., 2009). Frühere Studien zur Expression verschiedener SNARE-Proteine in Oligodendrozyten zeigen zum Teil kontroverse Ergebnisse. Zwar wird die Expression der SNARE-Proteine Syntaxin 2, Syntaxin 3, Syntaxin 4, SNAP29, VAMP2 und VAMP7 bestätigt, jedoch soll sich die Expression von Syntaxin 2 im Verlauf der Differenzierung vermindern und die Expression von VAMP2 ansteigen (Kramer et al., 2001; Madison et al., 1999). Mögliche Gründe für diese Ergebnisse könnten die Herkunft der untersuchten Oligodendrozyten (Maus bzw. Ratte) oder die Untersuchungen von mRNA bzw. Proteinen sein. Untersuchungen von Gehirnlisaten zeigten eine verstärkte Expression des R-SNAREs VAMP2. Dies lässt sich möglicherweise durch dessen Expression in Synapsen erklären, welche vor allem postnatal gebildet werden.

5.2.2 Die Expression der SNAREs im Myelin

Vor der Fusion eines Vesikels mit seiner Zielmembran bilden die SNARE-Proteine einen *trans*-SNARE-Komplex aus vier SNARE-Motiven. Nach der Fusion befinden sich alle SNAREs, also auch das zuvor vesikuläre R-SNARE, in der Zielmembran (*cis*-Konfiguration) (Jahn and Scheller, 2006). Je nach Geschwindigkeit und Effizienz des *Recyclings* kann es zu Akkumulationen der SNAREs in der Zielmembran kommen. Beim Prozess der Myelinisierung stellt das Myelin die Zielmembran dar. Vermutlich findet in der stärksten Phase der Myelinisierung ein vermehrter Transport von Vesikeln zur Myelinmembran statt, um ausreichend Myelin Komponenten für die Synthese der großen Flächen Myelin bereitzustellen (Pfeiffer et al., 1993). Die an der Vesikelfusion beteiligten SNAREs akkumulieren dabei in der Myelinmembran. Im Myelin 15 Tage alter Tiere (P15) reicherten sich auffälligerweise endosomale SNAREs und SNAREs des Golgi-Apparates an

(VAMP2, VAMP3, VAMP4, Syntaxin 6, 7, 8, 13 und 16). Beide sekretorischen Wege scheinen daher am Transport zur Myelinmembran in dieser frühen Phase der Myelinisierung beteiligt zu sein.

Andererseits ist anzunehmen, dass es mit zunehmendem Myelinisierungsgrad des Gehirns auch zu einer zunehmenden Akkumulation der Plasmamembran-SNAREs im Myelin kommt, denn je mehr Myelin besteht, desto mehr Q-SNAREs werden benötigt, um ankommenden Vesikel die Fusion zu ermöglichen. Dies konnte im adulten Myelin beobachtet werden. Syntaxin 2, 3 und 4 zeigten eine verstärkte Expression in der adulten Myelinfraktion. Das R-SNARE VAMP7 akkumulierte ebenfalls im adulten Myelin. Möglicherweise ist VAMP7 an Vesikeln lokalisiert, die den Transport zu einer Subdomäne des Myelins gewährleisten, in dem die Effizienz des *Recyclings* sehr schwach ist (z.B. das kompakte Myelin). Andererseits könnte die Anreicherung von VAMP7 im Myelin adulter Mäuse durch die vermehrte Fusion von spät endosomalen, lysosomalen Vesikeln zu erklären sein (Trajkovic et al., 2006), d.h. es könnte auch, bei einer normalen Effizienz des *Recyclings*, zu einem zu starken Transport von VAMP7-Vesikeln, und somit zu einer Akkumulation von VAMP7 im Myelin kommen.

5.3 Die subzelluläre Lokalisation der SNARE-Proteine

Um SNARE-Proteine vesikulären Transportrouten in der Zelle zuordnen zu können, muss deren subzelluläre Lokalisation an Donor- bzw. Akzeptormembranen ermittelt werden. Die „*steady-state*“-Lokalisation gibt dabei Hinweise, an welchen Transportwegen die einzelnen SNAREs beteiligt sein könnten. Die tatsächliche Funktion der SNARE-Proteine kann jedoch nur durch funktionelle Transportstudien ermittelt werden (Jahn and Scheller, 2006; Lafont et al., 1999; Weimbs et al., 2003). Die subzelluläre Lokalisation der SNARE-Proteine stimmte mit der in anderen, gut untersuchten, Zelltypen überein (Tab. 2.1) (Hong, 2005; Jahn and Sudhof, 1999). Manche SNARE-Proteine, wie Syntaxin 6 und Syntaxin 13, kolokalisierten mit zwei der verwendeten Kompartimentmarker (Abb. 5.1). Dies kann zum einen bedeuten, dass die SNAREs die Transportwege zwischen diesen beiden Kompartimenten kontrollieren und nur ein langsames *Recycling* der SNAREs stattfindet. Zum anderen ist es jedoch möglich, dass ein SNARE mit unterschiedlichen Komplex-Partnern in mehrere Transportrouten involviert ist, und daher unterschiedliche „*steady-state*“-Lokalisationen aufweist. Die Q-SNAREs Syntaxin 2, 3, 4 waren an der Plasmamembran lokalisiert (Abb. 5.1) und zeigten deutliche Akkumulationen in den oligodendroglialen Fortsätzen. Dieser Effekt zeigte sich verstärkt auch im Fall der Überexpression der Syntaxin 2-, 3- und 4-Konstrukte. Solche Akkumulationen der Plasmamembran-SNAREs wurden auch in Epithelzellen beobachtet. Die Arbeitsgruppe um

Thomas Weimbs konnte zeigen, dass in MDCK-Zellen (*Madin-Darby canine kidney cells*) Syntaxin 3 an der apikalen und Syntaxin 4 an der basolateralen Membran der polaren Zellen lokalisiert ist (Li et al., 2002; Low et al., 1996). Vor der Ausbildung der Zellpolarität finden sich die SNAREs in sogenannten *Clustern*, d.h. die Plasmamembran ist bereits in spezifische Domänen unterteilt, die später zur Ausbildung der Polarität dienen (Low et al., 2006). Eine solche vorherige Domänenbildung wäre auch in Oligodendrozyten möglich. Da Oligodendrozyten *in vitro*, aufgrund der Abwesenheit von Neuronen, keine richtige Myelinmembran produzieren, könnte es jedoch bereits zur Bildung von Membranmikrodomänen kommen, die den späteren Subdomänen des Myelins entsprechen (Winterstein et al., 2008). Zudem ist bekannt, dass Akkumulationen spezifischer SNAREs, z.B. in „*Lipid Rafts*“, einer effizienteren Fusion der ankommenden Vesikel dienen (Chamberlain et al., 2001; Lang et al., 2001), d.h. die *Cluster* der Plasmamembran-SNAREs könnten Stellen erhöhter Vesikelfusion z.B. zur Bildung neuer Fortsätze darstellen.

5.4 Die SNARE-Komplexe

Neben der Lokalisation der SNAREs ist auch die Komplexbildung der SNAREs für ihre funktionelle Einbindung in Transportwege von Bedeutung. So paaren jeweils die SNAREs einer Subfamilie (Q_a , Q_b , Q_c und R) und bilden einen fusionsfähigen SNARE-Komplex. Die möglichen Paarungen sind jedoch von vielen Faktoren abhängig. So spielt die spezifische Lokalisation in Donor- oder Akzeptormembran eine Rolle. Auch zelltyp-spezifische, regulatorische Proteine entscheiden über die Bildung eines SNARE-Komplexes. Die existierenden SNARE-Komplexe müssen daher für jeden Zelltyp gesondert ermittelt und ihre Rolle bei der Membranfusion muss durch funktionelle Studien überprüft werden.

Ein oligodendroglialer, potentiell fusionsfähiger SNARE-Komplex bestand aus den Proteinen Syntaxin 4 (Q_a), SNAP23 (Q_{bc}) und VAMP3 (R) (Abb. 5.1). Betrachtet man die Lokalisation der SNAREs, so vermittelt dieser Komplex eine Transportroute vom *Recycling* Endosom zur Plasmamembran. Desweiteren wurden Syntaxin 4, SNAP23 sowie VAMP3 im Verlauf der Differenzierung von primären Oligodendrozyten hochreguliert und Syntaxin 4 akkumulierte in adultem Myelin. Dies spricht für eine Rolle des Transportweges bei der Myelinisierung. Ein Komplex aus diesen SNAREs wurde auch in Epithelzellen beobachtet. Dort transportiert VAMP3 AP-1B-*Cargo* (z.B. Transferrin-Rezeptor) vom *Recycling* Endosom zur basolateralen Plasmamembran (Fields et al., 2007). Zudem zeigt VAMP3 eine Beteiligung am Transport des Tumor-Nekrose-Faktors α ($TNF\alpha$) vom *Recycling* Endosom zur Plasmamembran (Murray et al., 2005a), an der Sekretion von Granula in Thrombozyten (Polgar et al., 2002) und am Transport des

Glukose-Transporters (GLUT4) zur Plasmamembran als Antwort auf Insulinstimulation von Muskel- oder Fettzellen (Bryant et al., 2002). Eine Beteiligung an einem exozytotischen Vorgang auch in Oligodendrozyten ist somit wahrscheinlich.

Ein weiterer oligodendroglialer SNARE-Komplex konnte zwischen Syntaxin 6 (Q_c), vti1a (Q_b) und VAMP4 (R) beobachtet werden (Abb. 5.1). Zur Vollständigkeit des SNARE-Komplexes fehlt lediglich ein Q_a -Motiv, was in anderen Zelltypen oft durch Syntaxin 10, 13 oder 16 bereitgestellt wird (Brandhorst et al., 2006; Ganley et al., 2008; Mallard et al., 2002). Meist wird durch diese SNARE-Proteine der retrograde Transport zwischen dem *Recycling* Endosom und dem Golgi-Apparat kontrolliert. Eine solche Transportroute wäre auch in Oligodendrozyten denkbar, da vti1a am Golgi-Apparat lokalisiert ist. Die Syntaxine 6, 13 und 16 akkumulierten am Golgi-Apparat oder sogar an beiden Kompartimenten (*Recycling* Endosom und Golgi-Apparat). Syntaxin 10 wird in Oligodendrozyten nicht exprimiert. VAMP4 ist ein typisches R-SNARE des Golgi-Apparates mit einem „TGN-targeting-motif“ am N-Terminus (Hong, 2005). Auch die oligodendrogliale, subzelluläre Lokalisation spricht somit für diese Transportroute.

Ein dritter SNARE-Komplex konnte in Oligodendrozyten aus den SNARE-Proteinen Syntaxin 13 (Q_a), SNAP23 (Q_{bc}) und VAMP4 gebildet werden (Abb. 5.1). Dieser Komplex wurde zuvor in anderen Zellen nicht beobachtet, wäre aber von der Konstellation der SNARE-Motive potentiell fusionsfähig. Aufgrund der subzellulären Lokalisation der oligodendroglialen SNAREs wäre eine Beteiligung des Komplexes am Transport zwischen dem Golgi-Apparat und dem *Recycling* Endosom möglich.

Weitere Co-Immunpräzipitationen zeigten nicht-fusionsfähige Interaktionen, wie z.B. VAMP4 (R) mit SNAP23 (Q_{bc}) oder 29 (Q_{bc}) und Syntaxin 6 (Q_c) oder Syntaxin 8 (Q_c). Die ermittelten Interaktionen können zum einen eine nicht ausreichende Spezifität der durchgeführten Co-Immunpräzipitationen bedeuten. Aufgrund der hohen Konservierung der SNARE-Motive könnte es zu unspezifischen Paarungen gekommen sein (Antonin et al., 2002; Bethani et al., 2007). Zum anderen können die ermittelten Interaktionen durchaus existieren und für die Zelle von Bedeutung sein. I-SNAREs (*inhibitory*) sollen durch die Bindung an andere SNAREs deren Verfügbarkeit für fusionsfähige Komplexe kontrollieren und so eine Beteiligung an der Regulation der SNARE-Komplex-Bildung haben (Varlamov et al., 2004). Letztendlich können nur funktionelle Studien z.B. durch funktionelle Inaktivierung der unterschiedlichen Komplex-Partner zeigen, ob ein SNARE-Komplex fusionsfähig ist.

5.5 Zuordnung der SNAREs zu unterschiedlichen Transportrouten

Zusammenfassend lassen sich die SNARE-Proteine wie folgt den unterschiedlichen subzellulären Transportrouten zuordnen (Abb. 5.1). Syntaxin 2, Syntaxin 3, Syntaxin 4 und SNAP29 sind potentielle Q-SNAREs der Plasmamembran, die die Fusion der Vesikel mit dieser ermöglichen. SNAP23 scheint sowohl an intrazellulären Transportwegen, als auch am Transport zur Plasmamembran beteiligt zu sein. Syntaxin 6 und Syntaxin 13 kolokalisiert mit Markern des Golgi-Apparates und des *Recycling* Endosoms und könnten somit in einen Transportweg zwischen diesen Kompartimenten involviert sein. Syntaxin 7, Syntaxin 8 und vti1b sind aufgrund ihrer Kolokalisation mit Markern der späten Endosomen, Lysosomen und des *Recycling* Endosoms potentielle t-SNAREs des endosomalen Transports. Syntaxin 6, VAMP4 und vti1a sind in der Transport zum oder vom Golgi-Apparat involviert, VAMP3 kontrolliert den Transport der Vesikel vom *Recycling* Endosom, VAMP7 vom späten Endosom, Lysosom. Die unterschiedliche Einfärbung der SNARE-Proteine zeigt erneut mögliche Interaktionen zwischen den SNARE-Proteinen (Abb. 5.1).

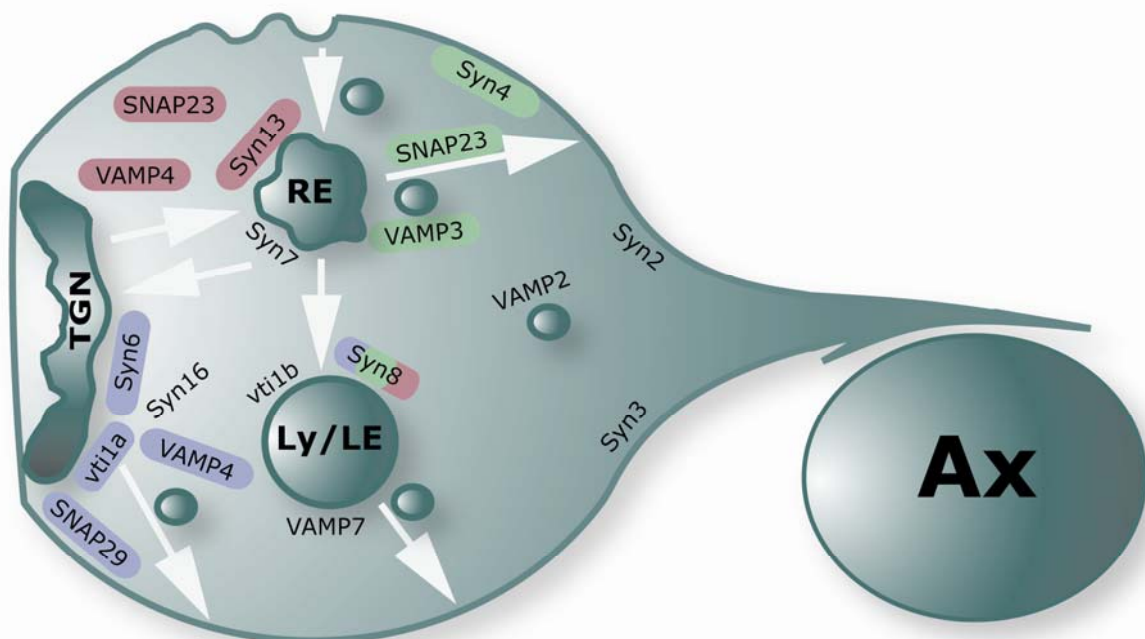


Abb. 5.1: Zuordnung der SNARE-Proteine zu verschiedenen Transportwegen

Die Zuordnung erfolgte anhand der subzellulären Lokalisationsstudien, der Co-Immunpräzipitationen und anhand der Tabelle zur Lokalisation der SNAREs in anderen Zelltypen (Tab. 2.1). SNARE-Interaktionen sind farbig hervorgehoben. Ax, Axon; LE, spätes Endosom; Ly, Lysosom; RE, *Recycling* Endosom; TGN, *trans*-Golgi-Netzwerk; Syn, Syntaxin.

5.6 VAMP3 und VAMP7 kolokalisieren mit PLP

Nachdem die SNARE-Proteine ihren oligodendroglialen Transportrouten zugeordnet werden konnten, sollten funktionelle Translokationsstudien mehr Informationen über den vesikulären Transport bei der Myelinsierung liefern. Da PLP mit 50% den größten Anteil am Gesamtmyelinprotein ausmacht, spielt es vermutlich eine entscheidende Rolle bei der Bildung von Myelin, und wurde daher ausgewählt um dessen SNARE-abhängigen, vesikulären Transport zu untersuchen. Um zu ermitteln, wie PLP zur Myelinmembran transportiert wird und welche SNARE-Proteine diesen Transport vermitteln, war zunächst eine mögliche Kolokalisation von PLP mit SNARE-Proteinen von Interesse. Immunzytochemische Analysen zeigten, dass in der „*steady-state*“-Situation der Hauptanteil von PLP im späten Endosom, Lysosom akkumulierte. Dies wurde bereits in zahlreichen, vorherigen Untersuchungen gezeigt (Kramer et al., 2001; Simons and Trajkovic, 2006; Trajkovic et al., 2006). Auch eine starke Kolokalisation von PLP mit dem spät endosomalen, lysosomalen R-SNARE VAMP7 wurde beobachtet (Martinez-Arca et al., 2003b; Proux-Gillardeaux et al., 2007). Dennoch waren auch nicht-kolokalisierende Bereiche erkennbar, die noch eine weitere Lokalisation von PLP erwarten ließen. Eine kleinere Subpopulation des Myelinproteins kolokalisierte mit dem SNARE des *Recycling* Endosoms VAMP3. Diese Lokalisation des Proteins war zuvor nicht bekannt. Da es nicht zu größeren Akkumulationen des Proteins im *Recycling* Endosom kommt, wird PLP wohl nicht dort gelagert, sondern nur zügig hindurchtransportiert. VAMP3 und VAMP7 stellen somit potentielle SNARE-Proteine dar, die am Transport von PLP beteiligt sind.

Interessanterweise akkumulierte PLP mit den Syntaxinen 2, 3 und 4 in großen *Clustern* in den Fortsätzen der Zellen. Solche *Cluster* könnten bevorzugte Andockstellen für sekretorische Vesikel darstellen. Man geht davon aus, dass mit steigender Q-SNARE-Anzahl eine effizientere Vesikelfusion stattfindet (Jahn and Scheller, 2006; Lang et al., 2001; Predescu et al., 2005). Die Kolokalisation der Syntaxine mit PLP spricht für eine aktive Fusion der PLP-Vesikel an diesen Stellen mit der Plasmamembran. Co-Immunpräzipitationen der R-SNAREs VAMP3 bzw. VAMP7 zeigten zudem bevorzugte Interaktionen mit den Q-SNAREs Syntaxinen 4 bzw. 3 (Diplomarbeit, Madeleine Schönherr, 2008). Diese SNARE-Komplexe wurden auch für andere Zelltypen beschrieben. So bildet VAMP7 in nicht-neuronalen Zellen bevorzugt Komplexe mit Syntaxin 3 und SNAP23, in Neuronen hingegen mit Syntaxin 1 und SNAP25 (Martinez-Arca et al., 2000a). VAMP3 bildet auch in Epithelzellen einen SNARE-Komplex mit Syntaxin 3 um den basolateralen Transport der Zellen zu vermitteln (Fields et al., 2007). Auch für den Transport des Tumor-Nekrose-Faktors α (TNF α) vom *Recycling* Endosom zur Plasmamembran zu spezifischen Stellen der Phagozytose bildet VAMP3 einen Komplex mit Syntaxin 4 (Murray et al., 2005a). Funktionelle Studien, in denen die

Plasmamembran-Syntaxine funktionell inhibiert wurden, und somit eigentlich keine Fusion der Vesikel mit der Plasmamembran mehr möglich war, zeigten jedoch keine Reduktion des PLP-Transports zur Plasmamembran. Die ankommenden PLP-Vesikel konnten ungehindert mit der Plasmamembran fusionieren. Die SNAREs Syntaxin 2, 3 und 4 scheinen daher aufgrund ihrer hohen Konservierung redundant zu wirken (Diplomarbeit, Jesa Amphornrat, 2008).

5.7 Funktionelle Studien zum SNARE-abhängigen PLP-Transport

5.7.1 Die PLP-Translokationsstudie

Um die genaue Transportroute von PLP zur Myelinmembran zu ermitteln, benötigt man eine Translokationsstudie, bei der der Transport von den intrazellulären Kompartimenten zur Zelloberfläche quantifiziert werden kann. Da, aufgrund der besseren Manipulierbarkeit, die Versuche *in vitro*, d.h. in Abwesenheit von Neuronen oder anderen Zelltypen, durchgeführt werden mussten, war zunächst nicht der Transport zum Myelin, sondern zur Plasmamembran von Interesse. Da die Myelinmembran eine besondere Form der Plasmamembran darstellt, ist später *in vivo* eine ähnliche Transportroute zu erwarten. Die Translokationsstudien wurden somit in Oli-neu Zellen durchgeführt. Dabei wurden bereits bekannte Transportrouten von PLP und dessen Stimulation mittels dbcAMP als Grundlage herangezogen. PLP wird dabei zunächst zur Plasmamembran transportiert. Anschließend erfolgt eine Endozytose, nach der das Protein im späten Endosom, Lysosom akkumuliert (Simons and Trotter, 2007; Trajkovic et al., 2006; Winterstein et al., 2008). Durch ein neuronales Signal kommt es zu einer Inhibition der PLP-Endozytose und zu einer verstärkten Exozytose, wodurch PLP vom späten Endosom, Lysosom zur Plasmamembran transportiert wird. Bei dem neuronalen Signal handelt es sich um einen löslichen Faktor, d.h. es ist kein Zellkontakt zwischen den Oligodendrozyten und den Neuronen notwendig. Zudem ist dieser Effekt Proteinkinase A-abhängig, da durch die Zugabe von RpcAMP, einem Inhibitor der PKA, keine Freisetzung von PLP stattfindet. Stimuliert man die Zellen jedoch mit dbcAMP, so findet sich mehr PLP an der Plasmamembran und weniger im späten Endosom, Lysosom (Trajkovic et al., 2006), d.h. die Zugabe von dbcAMP stimuliert die Freisetzung von PLP und hemmt dessen Endozytose. Die daraus resultierende Menge an Plasmamembran-PLP kann quantifiziert werden.

5.7.2 VAMP3 vermittelt den PLP-Transport vom *Recycling* Endosom zur Plasmamembran

Um die Rolle von VAMP3 beim Transport von PLP zum Myelin und die genaue Transportroute zu ermitteln, wurde der Zelloberflächentransport von PLP in der Zell-Linie Oli-neu nach funktioneller Inaktivierung des SNAREs gemessen. Sowohl die Spaltung von VAMP3 mittels Tetanustoxin als auch das *Silencing* mittels siRNA führten zu einer reduzierten PLP-Menge an der Plasmamembran in Oli-neu Zellen. Dieser Effekt trat jedoch erst nach drei Tagen dbcAMP-Behandlung auf. Der Translokationsversuch zeigte somit eine VAMP3-abhängige Exozytose von PLP vom *Recycling* Endosom an die Zelloberfläche (Abb. 5.2). Die Beobachtung, dass dieser Effekt erst nach drei Tagen dbcAMP-Behandlung auftritt kann wie folgt erklärt werden: Durch die Zugabe von dbcAMP kommt es zu einer verstärkten Exozytose des endozytierten spät endosomalen, lysosomalen PLP zur Plasmamembran. Zunächst kann dieser Prozess ungehindert ablaufen, da ausreichend PLP im späten Endosom, Lysosom gespeichert ist. Nach 3 Tagen ist jedoch möglicherweise der Speicher aufgebraucht, so dass kein PLP mehr an die Plasmamembran transportiert werden kann. Im Normalfall wird VAMP3-abhängig neu synthetisiertes PLP vom *Recycling* Endosom zur Plasmamembran transportiert, was dann endozytiert, in den späten Endosomen, Lysosomen gespeichert, und somit nachgeliefert werden kann. Im Fall des VAMP3-*Silencing* wird jedoch kein neu synthetisiertes PLP nachgeliefert und der komplette Transportweg kommt zum Stillstand (Abb. 5.2).

5.7.3 VAMP7 vermittelt den PLP-Transport von den späten Endosomen, Lysosomen zur Plasmamembran

Die funktionelle Inaktivierung des R-SNAREs VAMP7, unabhängig davon ob dies mittels eines dominant-negativen Konstrukts oder mittels siRNA geschah, führt ebenfalls zu einer reduzierten Menge an Oberflächen-PLP. Dies war jedoch nur ohne dbcAMP-Behandlung der Fall. Nach 72 Stunden dbcAMP-Zugabe war kein Effekt mehr erkennbar. Es konnte wieder ausreichend PLP an die Plasmamembran transportiert werden. Dieser Effekt erklärt sich wie folgt: PLP wird vom späten Endosom, Lysosom VAMP7-abhängig zur Plasmamembran der Oligodendrozyten transportiert. Kommt es zu einer funktionellen Inaktivierung des VAMP7-Proteins, so kann der Transport vom späten Endosom, Lysosom zur Plasmamembran nicht mehr gewährleistet werden. Es kommt sofort zu einer Reduktion der PLP-Menge an der Plasmamembran. Nach drei Tagen dbcAMP-Behandlung, in denen dauerhaft die Endozytose von PLP inhibiert ist, kann jedoch VAMP3-abhängig

ausreichend neu synthetisiertes PLP zur Plasmamembran transportiert werden. Der Effekt wird aufgehoben (Abb. 5.2).

5.8 Die Transportrouten von PLP

Vergleicht man die beschriebenen SNARE-abhängigen Transportrouten mit denen in Epithelzellen, so fällt auf, dass in diesen Zellen die gleichen R-SNAREs spezifische exozytotische Transportwege kontrollieren. VAMP7 vermittelt in Epithelzellen den apikalen Transport (Pocard et al., 2007). Dabei dient Syntaxin 3 als empfangendes Q-SNARE. VAMP3 ist für den Transport vom *Recycling* Endosom zur basolateralen Membran verantwortlich. Dazu bildet es an der basolateralen Membran einen Komplex mit Syntaxin 4. (Fields et al., 2007; Maier et al., 2008). Die apikale Membran in Epithelzellen ist reich an Cholesterol und Glykosphingolipiden (GSL) und somit möglicherweise mit der Myelinmembran vergleichbar (Maier et al., 2008). Die basolaterale Membran der Epithelzellen würde der oligodendroglialen Plasmamembran um den Zellkörper entsprechen.

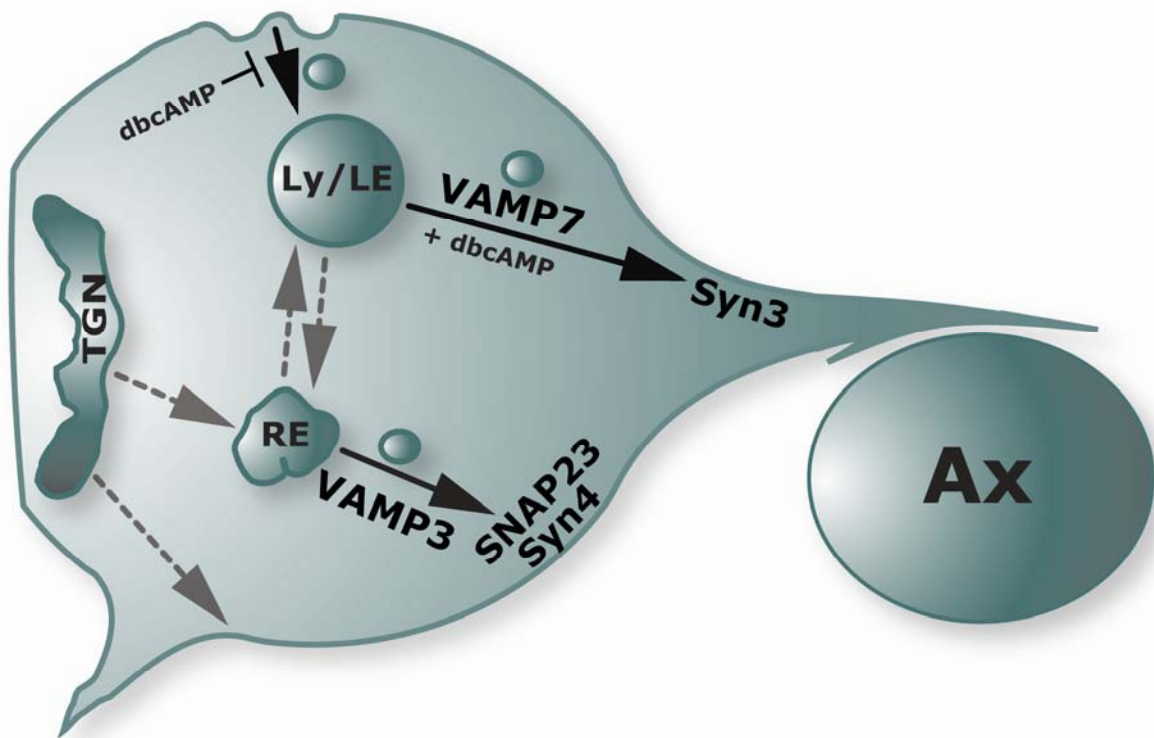


Abb. 5.2: Transportrouten des SNARE-abhängigen PLP-Transports

Nach der Synthese im Golgi-Apparat findet ein Transport von PLP zum *Recycling* Endosom statt. Von dort wird PLP VAMP3-abhängig zur Plasmamembran des Zellkörpers transportiert, wobei Syntaxin 4 als empfangendes Q-SNARE dient. Nach der Endozytose wird das Protein im späten Endosom, Lysosom gespeichert (Trajkovic et al., 2006; Winterstein et al., 2008). Von dort erfolgt, auf ein neuronales Signal hin (Simons and Trajkovic, 2006; Simons and Trotter, 2007; Trajkovic et al., 2006), die VAMP7-abhängige Exozytose zur Myelinmembran.

Betrachtet man unter diesen Gesichtspunkten erneut die ermittelten Transportrouten von PLP, so bedeutet dies, dass in der *in vivo*-Situation, in der der Oligodendrozyt eine echte Myelinmembran besitzt, neu synthetisiertes PLP Syntaxin 4- und VAMP3-abhängig vom Golgi-Apparat, über das *Recycling* Endosom zur Plasmamembran des Zellkörpers (basolateral) transportiert wird. Dort erfolgt die Endozytose in die späten Endosomen, Lysosomen. Anschließend wird PLP Syntaxin 3- und VAMP7-abhängig zur Myelinmembran (apikal) transportiert. Eine Übersicht dieses Modells ist in Abb. 5.2 dargestellt.

Doch was sind die Vorteile der beiden Routen für die Zelle und warum transportiert der Oligodendrozyt PLP nicht direkt zur Myelinmembran? Zum einen ermöglicht der Transport von neu synthetisiertem Protein an die Plasmamembran des Zellkörpers eine Vorsortierung. So konnte gezeigt werden, dass die Myelinproteine MAG, MOG und PLP an die Plasmamembran transportiert und von dort unterschiedlich endozytiert werden. MAG ist ein Myelinprotein des inneren Mesaxons und wird ins späte Endosom, Lysosom endozytiert, MOG ist am äußeren Mesaxons lokalisiert und endozytiert ins *Recycling* Endosom. PLP ist ein Protein des kompakten Myelins und endozytiert ins späte Endosom, Lysosom. Der Oligodendrozyt scheint also die Komponenten der späteren Myelinsubdomänen bereits vorzusortieren (Winterstein et al., 2008). Desweiteren ist auch die Lagerung von PLP im späten Endosom, Lysosom sinnvoll. Hat der Oligodendrozyt ausreichend PLP gespeichert, so kann er, auf ein neuronales Signal hin, schnell mit der Myelinisierung beginnen. Vermutlich ist es nur so möglich, solch große Flächen Membran innerhalb kürzester Zeit zu synthetisieren.

Eine gleichzeitige Inaktivierung von VAMP3 und VAMP7 führt nicht zum vollständigen Stillstand des PLP-Transports. Ein Grund könnte die unvollständige Inaktivierung und daher die Restaktivität der R-SNAREs sein. Andererseits ist es möglich, dass andere Transportrouten genutzt werden. Dazu käme möglicherweise ein VAMP4-vermittelter, direkter Transport vom Golgi-Apparat zur Plasmamembran in Frage.

5.9 PLP-Transport in AP-3 δ -defizienten Mäusen

Alle durchgeführten Translokationsstudien wurden *in vitro* durchgeführt. Bisher ist jedoch noch nicht ausreichend geklärt, ob die Transportwege in Oli-neu Zellen oder primären Oligodendrozyten denen im Gehirn, in Anwesenheit von weiteren Zelltypen, entsprechen. Zwar sprechen viele Faktoren für eine Vergleichbarkeit der Mechanismen (identische SNARE-Verteilung in Oli-neu Zellen und primären Oligodendrozyten, Bildung von „*myelin-like-membranes*“ primärer Oligodendrozyten, Vorsortierung der Myelinkomponenten in Membranmikrodomänen) (Winterstein et al., 2008)), trotzdem sind *in vivo*-Analysen unerlässlich.

Zur *in vivo*-Untersuchung des VAMP7-abhängigen Transportweges von den späten Endosomen, Lysosomen zur Plasmamembran (Abb. 5.2) wurden *mocha*-Mäuse genutzt. Dies sind natürliche Mausmutanten die eine AP-3 δ -Defizienz aufweisen, welche zu einer Fehlsortierung von VAMP7 führt. Im Normalfall akkumuliert VAMP7 im Verlauf der Myelinisierung im Myelin. In *mocha*-Mäusen war dies nicht der Fall, d.h. der VAMP7-vermittelte Transport zur Myelinmembran war inhibiert. Aufgrund dessen kam es zu einem wahrscheinlich zu einem geringeren Gehirngewicht und zu einer verminderten Menge an Myelin in mutanten Tieren (Hypomyelinisierung). Zum anderen zeigte sich in der Analyse des normalisierten Myelins, dass die Myelinproteine PLP und CNP, aufgrund des gestörten VAMP7-vermittelten Transports, nicht zur Myelinmembran transportiert werden konnten. Das Myelinprotein MOG hingegen, zeigte keine signifikanten Unterschiede im normalisierten Myelin der mutanten Tiere. Das Myelinprotein wurde somit unabhängig von VAMP7 zur Myelinmembran transportiert.

Die in *mocha*-Mäusen beobachteten neurologischen Defekte könnten somit einerseits durch die Hypomyelinisierung des Gehirns entstehen. Andererseits könnte auch das Fehlen von PLP und CNP im Myelin für die neurologischen Störungen der *mocha*-Mäuse verantwortlich sein. So sollen die Myelinproteine PLP und CNP der Stabilität und Aufrechterhaltung des Myelins und der paranodalen-axoglialen Strukturen dienen (Griffiths et al., 1998a; Rasband et al., 2005). Nicht auszuschließen ist jedoch, dass auch die Fehlsortierung von VAMP7 in Neuronen eine Rolle spielt. So führt dies zu Veränderungen in der Freisetzung synaptischer Vesikel (Danglot and Galli, 2007; Scheuber et al., 2006).

Anzumerken bleibt, dass die *Knockout*-Tiere der Myelinproteine PLP und CNP einen sehr ähnlichen Phänotyp zeigen. Der *Knockout* führt in beiden Fällen zu keinen Veränderungen in der Ultrastruktur des Myelins und auch nicht zu einer Hypomyelinisierung, sondern lediglich zu morphologischen Veränderungen am Axon und zu einer späten Degeneration der Axone (Garbern, 2005; Lappe-Siefke et al., 2003; Rosenbluth et al., 2006). Warum *mocha*-Mäuse, in denen PLP und CNP nicht korrekt zum Myelin transportiert werden, im Gegensatz zum PLP- oder CNP-*Knockout* eine Hypomyelinisierung zeigen, bleibt fraglich. Vermutlich sind durch den *Knockout* von AP-3 noch weitere oligodendrogliale Transportmechanismen gestört. Da ein nicht-funktioneller Transport von PLP und CNP zum Myelin jedoch einem *Knockout* des Proteins ähnelt, wäre eine Beobachtung der *mocha*-Tiere bis ins höhere Alter von Interesse, um evtl. ähnliche Degenerationen der Axone und „axonal swellings“ zu erkennen.

6 Ausblick

Durch die Zuordnung der SNARE-Proteine zu ihren oligodendroglialen Transportrouten ist die Grundlage für funktionelle Studien geschaffen worden. Die durchgeführten Translokationsstudien haben gezeigt, dass VAMP3 und VAMP7 am Transport von PLP zur Plasmamembran beteiligt sind. Natürlich lassen sich die Versuche zum Transport von intrazellulären Kompartimenten an die Plasmamembran auch mit anderen Myelinproteinen durchführen. So wurde bereits der Transport von MOG, ein Myelinprotein des äußeren Mesaxons, welches nach seinem Transport an die Plasmamembran in das *Recycling* Endosom endozytiert wird, untersucht (Winterstein et al., 2008). Trotz der transienten Lokalisation im *Recycling* Endosom wird MOG unabhängig von VAMP3 zur Plasmamembran transportiert. Eine funktionelle Inaktivierung von VAMP3 hat keine Auswirkung auf den MOG-Transport (Diplomarbeit, M. Schönherr, 2008). So könnten auch andere Myelinproteine untersucht werden. Die Ergebnisse dieser Studien würden weitere Informationen über den vesikulären Transport in Oligodendrozyten liefern. Zudem gäben die beschriebenen Versuche Aufschluß darüber, welche Myelinkomponenten evtl. gemeinsam oder auf unterschiedlichen Transportwegen zum Myelin transportiert werden, und ob tatsächlich eine Vorsortierung der Proteine entsprechend der späteren Subdomänen des Myelins stattfindet.

Zuletzt sollten die ermittelten Transportrouten *in vivo* bestätigt werden. So wären oligodendrogliale SNARE-*Knockout*-Tiere ein gutes Werkzeug zur Untersuchung der Auswirkung von Blockaden in spezifischen Transportwegen. VAMP3-defiziente Mäuse zeigen keine Unterschiede in Prozessen wie der Phagozytose oder dem *Recycling* des Transferrin-Rezeptors, jedoch ist eine verstärkte Expression von VAMP2 beobachtet worden (Yang et al., 2001). Die Tiere wurden jedoch noch nicht auf mögliche Myelindefekte untersucht. Auch Tiere, wie die beschriebenen *mocha*-Mäuse, in denen bestimmte SNAREs nicht ihre normale Funktion übernehmen können, sind gute Werkzeuge zur Analyse des SNARE-abhängigen Transports. So zeigen die Analysen der *mocha*-Mäuse deutliche Hinweise für eine Hypomyelinisierung und eine Fehlsortierung der Myelinproteine PLP und CNP. Genauere Untersuchungen zur Myelindicke im Vergleich zum Axondurchmesser (*g-ratio*), zum Kompaktierungsgrad des Myelins und zu dessen Ultrastruktur müssen folgen.

7 Referenzen

- Ainger, K., Avossa, D., Diana, A. S., Barry, C., Barbarese, E. and Carson, J. H.** (1997). Transport and localization elements in myelin basic protein mRNA. *J Cell Biol* **138**, 1077-87.
- Ainger, K., Avossa, D., Morgan, F., Hill, S. J., Barry, C., Barbarese, E. and Carson, J. H.** (1993). Transport and localization of exogenous myelin basic protein mRNA microinjected into oligodendrocytes. *J Cell Biol* **123**, 431-41.
- Amphornrat, J.** (2008). Funktionelle Rolle von Syntaxin 4 beim Transport von PLP an die Plasmamembran in myelinisierenden Oligodendrozyten (Diplomarbeit).
- Anitei, M. and Pfeiffer, S. E.** (2006). Myelin biogenesis: sorting out protein trafficking. *Curr Biol* **16**, R418-21.
- Antonin, W., Fasshauer, D., Becker, S., Jahn, R. and Schneider, T. R.** (2002). Crystal structure of the endosomal SNARE complex reveals common structural principles of all SNAREs. *Nat Struct Biol* **9**, 107-11.
- Arantes, R. M. and Andrews, N. W.** (2006). A role for synaptotagmin VII-regulated exocytosis of lysosomes in neurite outgrowth from primary sympathetic neurons. *J Neurosci* **26**, 4630-7.
- Arroyo, E. J. and Scherer, S. S.** (2000). On the molecular architecture of myelinated fibers. *Histochem Cell Biol* **113**, 1-18.
- Band, A. M. and Kuismanen, E.** (2005). Localization of plasma membrane t-SNAREs syntaxin 2 and 3 in intracellular compartments. *BMC Cell Biol* **6**, 26.
- Baron, W., Colognato, H. and ffrench-Constant, C.** (2005). Integrin-growth factor interactions as regulators of oligodendroglial development and function. *Glia* **49**, 467-79.
- Barres, B. A.** (2008). The mystery and magic of glia: a perspective on their roles in health and disease. *Neuron* **60**, 430-40.
- Barres, B. A., Hart, I. K., Coles, H. S., Burne, J. F., Voyvodic, J. T., Richardson, W. D. and Raff, M. C.** (1992). Cell death and control of cell survival in the oligodendrocyte lineage. *Cell* **70**, 31-46.
- Baumann, N. and Pham-Dinh, D.** (2001). Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiol Rev* **81**, 871-927.
- Bergles, D. E., Roberts, J. D., Somogyi, P. and Jahr, C. E.** (2000). Glutamatergic synapses on oligodendrocyte precursor cells in the hippocampus. *Nature* **405**, 187-91.

Bethani, I., Lang, T., Geumann, U., Sieber, J. J., Jahn, R. and Rizzoli, S. O. (2007). The specificity of SNARE pairing in biological membranes is mediated by both proof-reading and spatial segregation. *Embo J* **26**, 3981-92.

Betz, A., Okamoto, M., Benseler, F. and Brose, N. (1997). Direct interaction of the rat unc-13 homologue Munc13-1 with the N terminus of syntaxin. *J Biol Chem* **272**, 2520-6.

Bilan, F., Nacfer, M., Fresquet, F., Norez, C., Melin, P., Martin-Berge, A., Costa de Beauregard, M. A., Becq, F., Kitzis, A. and Thoreau, V. (2008). Endosomal SNARE proteins regulate CFTR activity and trafficking in epithelial cells. *Exp Cell Res* **314**, 2199-211.

Birling, M. C., Roussel, G., Nussbaum, F. and Nussbaum, J. L. (1993). Biochemical and immunohistochemical studies with specific polyclonal antibodies directed against bovine myelin/oligodendrocyte glycoprotein. *Neurochem Res* **18**, 937-45.

Block, M. R., Glick, B. S., Wilcox, C. A., Wieland, F. T. and Rothman, J. E. (1988). Purification of an N-ethylmaleimide-sensitive protein catalyzing vesicular transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 7852-6.

Boggs, J. M. (2006). Myelin basic protein: a multifunctional protein. *Cell Mol Life Sci* **63**, 1945-61.

Bonifacino, J. S. and Traub, L. M. (2003). Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annu Rev Biochem* **72**, 395-447.

Borisovska, M., Zhao, Y., Tsytsyura, Y., Glyvuk, N., Takamori, S., Matti, U., Rettig, J., Sudhof, T. and Bruns, D. (2005). v-SNAREs control exocytosis of vesicles from priming to fusion. *Embo J* **24**, 2114-26.

Brandhorst, D., Zwilling, D., Rizzoli, S. O., Lippert, U., Lang, T. and Jahn, R. (2006). Homotypic fusion of early endosomes: SNAREs do not determine fusion specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 2701-6.

Braun, P. E., De Angelis, D., Shtybel, W. W. and Bernier, L. (1991). Isoprenoid modification permits 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase to bind to membranes. *J Neurosci Res* **30**, 540-4.

Bronstein, J. M., Micevych, P. E. and Chen, K. (1997). Oligodendrocyte-specific protein (OSP) is a major component of CNS myelin. *J Neurosci Res* **50**, 713-20.

Brose, N. (2008). For better or for worse: complexins regulate SNARE function and vesicle fusion. *Traffic* **9**, 1403-13.

Brunger, A. T., Jin, R. and Breidenbach, M. A. (2008). Highly specific interactions between botulinum neurotoxins and synaptic vesicle proteins. *Cell Mol Life Sci* **65**, 2296-306.

- Brunner, C., Lassmann, H., Waehnel, T. V., Matthieu, J. M. and Linington, C.** (1989). Differential ultrastructural localization of myelin basic protein, myelin/oligodendroglial glycoprotein, and 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase in the CNS of adult rats. *J Neurochem* **52**, 296-304.
- Bryant, N. J., Govers, R. and James, D. E.** (2002). Regulated transport of the glucose transporter GLUT4. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 267-77.
- Bullock, T. H., Moore, J. K. and Fields, R. D.** (1984). Evolution of myelin sheaths: both lamprey and hagfish lack myelin. *Neurosci Lett* **48**, 145-8.
- Burkhardt, P., Hattendorf, D. A., Weis, W. I. and Fasshauer, D.** (2008). Munc18a controls SNARE assembly through its interaction with the syntaxin N-peptide. *Embo J* **27**, 923-33.
- Cai, H., Reinisch, K. and Ferro-Novick, S.** (2007). Coats, tethers, Rabs, and SNAREs work together to mediate the intracellular destination of a transport vesicle. *Dev Cell* **12**, 671-82.
- Carson, J. H., Cui, H., Krueger, W., Schlepchenko, B., Brumwell, C. and Barbarese, E.** (2001). RNA trafficking in oligodendrocytes. *Results Probl Cell Differ* **34**, 69-81.
- Chamberlain, L. H., Burgoyne, R. D. and Gould, G. W.** (2001). SNARE proteins are highly enriched in lipid rafts in PC12 cells: implications for the spatial control of exocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 5619-24.
- Chan, J. R., Watkins, T. A., Cosgaya, J. M., Zhang, C., Chen, L., Reichardt, L. F., Shooter, E. M. and Barres, B. A.** (2004). NGF controls axonal receptivity to myelination by Schwann cells or oligodendrocytes. *Neuron* **43**, 183-91.
- Charles, P., Hernandez, M. P., Stankoff, B., Aigrot, M. S., Colin, C., Rougon, G., Zalc, B. and Lubetzki, C.** (2000). Negative regulation of central nervous system myelination by polysialylated-neural cell adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 7585-90.
- Cheviet, S., Bezzi, P., Ivarsson, R., Renstrom, E., Viertl, D., Kasas, S., Catsicas, S. and Regazzi, R.** (2006). Tomosyn-1 is involved in a post-docking event required for pancreatic beta-cell exocytosis. *J Cell Sci* **119**, 2912-20.
- Chua, C. E. and Tang, B. L.** (2008). Syntaxin 16 is enriched in neuronal dendrites and may have a role in neurite outgrowth. *Mol Membr Biol* **25**, 35-45.
- Colman, D. R., Kreibich, G., Frey, A. B. and Sabatini, D. D.** (1982). Synthesis and incorporation of myelin polypeptides into CNS myelin. *J Cell Biol* **95**, 598-608.
- Colognato, H. and ffrench-Constant, C.** (2004). Mechanisms of glial development. *Curr Opin Neurobiol* **14**, 37-44.

Coman, I., Barbin, G., Charles, P., Zalc, B. and Lubetzki, C. (2005). Axonal signals in central nervous system myelination, demyelination and remyelination. *J Neurol Sci* **233**, 67-71.

Curtis, L. B., Doneske, B., Liu, X., Thaller, C., McNew, J. A. and Janz, R. (2008). Syntaxin 3b is a t-SNARE specific for ribbon synapses of the retina. *J Comp Neurol* **510**, 550-9.

Danglot, L. and Galli, T. (2007). What is the function of neuronal AP-3? *Biol Cell* **99**, 349-61.

Davletov, B., Bajohrs, M. and Binz, T. (2005). Beyond BOTOX: advantages and limitations of individual botulinum neurotoxins. *Trends Neurosci* **28**, 446-52.

de Vries, H. and Hoekstra, D. (2000). On the biogenesis of the myelin sheath: cognate polarized trafficking pathways in oligodendrocytes. *Glycoconj J* **17**, 181-90.

Delarasse, C., Daubas, P., Mars, L. T., Vizler, C., Litzemberger, T., Iglesias, A., Bauer, J., Della Gaspera, B., Schubart, A., Decker, L. et al. (2003). Myelin/oligodendrocyte glycoprotein-deficient (MOG-deficient) mice reveal lack of immune tolerance to MOG in wild-type mice. *J Clin Invest* **112**, 544-53.

Demerens, C., Stankoff, B., Logak, M., Anglade, P., Allinquant, B., Couraud, F., Zalc, B. and Lubetzki, C. (1996). Induction of myelination in the central nervous system by electrical activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 9887-92.

Dermietzel, R., Farooq, M., Kessler, J. A., Althaus, H., Hertzberg, E. L. and Spray, D. C. (1997). Oligodendrocytes express gap junction proteins connexin32 and connexin45. *Glia* **20**, 101-14.

Dulubova, I., Sugita, S., Hill, S., Hosaka, M., Fernandez, I., Sudhof, T. C. and Rizo, J. (1999). A conformational switch in syntaxin during exocytosis: role of munc18. *Embo J* **18**, 4372-82.

Duman, J. G. and Forte, J. G. (2003). What is the role of SNARE proteins in membrane fusion? *Am J Physiol Cell Physiol* **285**, C237-49.

Duncan, I. D. (2005). The PLP mutants from mouse to man. *J Neurol Sci* **228**, 204-5.

Dyer, C. A., Hickey, W. F. and Geisert, E. E., Jr. (1991). Myelin/oligodendrocyte-specific protein: a novel surface membrane protein that associates with microtubules. *J Neurosci Res* **28**, 607-13.

Farrar, J. J., Yen, L. M., Cook, T., Fairweather, N., Binh, N., Parry, J. and Parry, C. M. (2000). Tetanus. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **69**, 292-301.

Fasshauer, D. (2003). Structural insights into the SNARE mechanism. *Biochim Biophys Acta* **1641**, 87-97.

Fasshauer, D., Antonin, W., Margittai, M., Pabst, S. and Jahn, R. (1999). Mixed and non-cognate SNARE complexes. Characterization of assembly and biophysical properties. *J Biol Chem* **274**, 15440-6.

Fasshauer, D., Sutton, R. B., Brunger, A. T. and Jahn, R. (1998). Conserved structural features of the synaptic fusion complex: SNARE proteins reclassified as Q- and R-SNAREs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 15781-6.

Feldmann, A., Winterstein, C., White, R., Trotter, J. and Kramer-Albers, E. M. (2009). Comprehensive analysis of expression, subcellular localization, and cognate pairing of SNARE proteins in oligodendrocytes. *J Neurosci Res*.

Feng, L., Seymour, A. B., Jiang, S., To, A., Peden, A. A., Novak, E. K., Zhen, L., Rusiniak, M. E., Eicher, E. M., Robinson, M. S. et al. (1999). The beta3A subunit gene (Ap3b1) of the AP-3 adaptor complex is altered in the mouse hypopigmentation mutant pearl, a model for Hermansky-Pudlak syndrome and night blindness. *Hum Mol Genet* **8**, 323-30.

Fields, I. C., Shteyn, E., Pypaert, M., Proux-Gillardeaux, V., Kang, R. S., Galli, T. and Folsch, H. (2007). v-SNARE cellubrevin is required for basolateral sorting of AP-1B-dependent cargo in polarized epithelial cells. *J Cell Biol* **177**, 477-88.

Fields, R. D. (2008). Oligodendrocytes changing the rules: action potentials in glia and oligodendrocytes controlling action potentials. *Neuroscientist* **14**, 540-3.

Fitzner, D., Schneider, A., Kippert, A., Mobius, W., Willig, K. I., Hell, S. W., Bunt, G., Gaus, K. and Simons, M. (2006). Myelin basic protein-dependent plasma membrane reorganization in the formation of myelin. *Embo J.* **25**(21): 5037-48.

Flaumenhaft, R., Rozenvayn, N., Feng, D. and Dvorak, A. M. (2007). SNAP-23 and syntaxin-2 localize to the extracellular surface of the platelet plasma membrane. *Blood* **110**, 1492-501.

Fukasawa, M., Varlamov, O., Eng, W. S., Sollner, T. H. and Rothman, J. E. (2004). Localization and activity of the SNARE Ykt6 determined by its regulatory domain and palmitoylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 4815-20.

Gagescu, R. (2000). SNARE hypothesis 2000. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**, 5.

Galli, T., Zahraoui, A., Vaidyanathan, V. V., Raposo, G., Tian, J. M., Karin, M., Niemann, H. and Louvard, D. (1998). A novel tetanus neurotoxin-insensitive vesicle-associated membrane protein in SNARE complexes of the apical plasma membrane of epithelial cells. *Mol Biol Cell* **9**, 1437-48.

Ganley, I. G., Espinosa, E. and Pfeffer, S. R. (2008). A syntaxin 10-SNARE complex distinguishes two distinct transport routes from endosomes to the trans-Golgi in human cells. *J Cell Biol* **180**, 159-72.

Garbern, J. Y. (2005). Pelizaeus-Merzbacher disease: pathogenic mechanisms and insights into the roles of proteolipid protein 1 in the nervous system. *J Neurol Sci* **228**, 201-3.

Garbern, J. Y. (2007). Pelizaeus-Merzbacher disease: Genetic and cellular pathogenesis. *Cell Mol Life Sci* **64**, 50-65.

Garbern, J. Y., Yool, D. A., Moore, G. J., Wilds, I. B., Faulk, M. W., Klugmann, M., Nave, K. A., Siermans, E. A., van der Knaap, M. S., Bird, T. D. et al. (2002). Patients lacking the major CNS myelin protein, proteolipid protein 1, develop length-dependent axonal degeneration in the absence of demyelination and inflammation. *Brain* **125**, 551-61.

Goonetilleke, A. and Harris, J. B. (2004). Clostridial neurotoxins. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **75 Suppl 3**, iii35-9.

Gravel, M., Robert, F., Kottis, V., Gallouzi, I. E., Pelletier, J. and Braun, P. E. (2008). 2',3'-Cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase: A novel RNA-binding protein that inhibits protein synthesis. *J Neurosci Res*.

Griffiths, I., Klugmann, M., Anderson, T., Thomson, C., Vouyiouklis, D. and Nave, K. A. (1998a). Current concepts of PLP and its role in the nervous system. *Microsc Res Tech* **41**, 344-58.

Griffiths, I., Klugmann, M., Anderson, T., Yool, D., Thomson, C., Schwab, M. H., Schneider, A., Zimmermann, F., McCulloch, M., Nadon, N. et al. (1998b). Axonal swellings and degeneration in mice lacking the major proteolipid of myelin. *Science* **280**, 1610-3.

Hammer, J. A., 3rd and Wu, X. S. (2002). Rabs grab motors: defining the connections between Rab GTPases and motor proteins. *Curr Opin Cell Biol* **14**, 69-75.

Hatsuzawa, K., Lang, T., Fasshauer, D., Bruns, D. and Jahn, R. (2003). The R-SNARE motif of tomosyn forms SNARE core complexes with syntaxin 1 and SNAP-25 and down-regulates exocytosis. *J Biol Chem* **278**, 31159-66.

He, Y. and Linder, M. E. (2008). Differential palmitoylation of the endosomal SNAREs syntaxin 7 and syntaxin 8. *J Lipid Res*.

Hohenstein, A. C. and Roche, P. A. (2001). SNAP-29 is a promiscuous syntaxin-binding SNARE. *Biochem Biophys Res Commun* **285**, 167-71.

Hong, W. (2005). SNAREs and traffic. *Biochim Biophys Acta* **1744**, 493-517.

Hu, C., Hardee, D. and Minnear, F. (2007a). Membrane fusion by VAMP3 and plasma membrane t-SNAREs. *Exp Cell Res* **313**, 3198-209.

Hu, S. H., Latham, C. F., Gee, C. L., James, D. E. and Martin, J. L. (2007b). Structure of the Munc18c/Syntaxin4 N-peptide complex defines universal features of the N-peptide binding mode of Sec1/Munc18 proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 8773-8.

Ishibashi, T., Dakin, K. A., Stevens, B., Lee, P. R., Kozlov, S. V., Stewart, C. L. and Fields, R. D. (2006). Astrocytes promote myelination in response to electrical impulses. *Neuron* **49**, 823-32.

Jahn, R. and Scheller, R. H. (2006). SNAREs - engines for membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 631-43.

Jahn, R. and Sudhof, T. C. (1999). Membrane fusion and exocytosis. *Annu Rev Biochem* **68**, 863-911.

Jung, M., Kramer, E., Grzenkowski, M., Tang, K., Blakemore, W., Aguzzi, A., Khazaie, K., Chlichlia, K., von Blankenfeld, G., Kettenmann, H. et al. (1995). Lines of murine oligodendroglial precursor cells immortalized by an activated neu tyrosine kinase show distinct degrees of interaction with axons in vitro and in vivo. *Eur J Neurosci* **7**, 1245-65.

Kabayama, H., Tokushige, N., Takeuchi, M. and Mikoshiba, K. (2008). Syntaxin 6 regulates nerve growth factor-dependent neurite outgrowth. *Neurosci Lett* **436**, 340-4.

Kantheti, P., Qiao, X., Diaz, M. E., Peden, A. A., Meyer, G. E., Carskadon, S. L., Kapfhamer, D., Sufalko, D., Robinson, M. S., Noebels, J. L. et al. (1998). Mutation in AP-3 delta in the mocha mouse links endosomal transport to storage deficiency in platelets, melanosomes, and synaptic vesicles. *Neuron* **21**, 111-22.

Kaplan, M. R., Cho, M. H., Ullian, E. M., Isom, L. L., Levinson, S. R. and Barres, B. A. (2001). Differential control of clustering of the sodium channels Na(v)1.2 and Na(v)1.6 at developing CNS nodes of Ranvier. *Neuron* **30**, 105-19.

Karadottir, R., Hamilton, N. B., Bakiri, Y. and Attwell, D. (2008). Spiking and nonspiking classes of oligodendrocyte precursor glia in CNS white matter. *Nat Neurosci* **11**, 450-6.

Kawanishi, M., Tamori, Y., Okazawa, H., Araki, S., Shinoda, H. and Kasuga, M. (2000). Role of SNAP23 in insulin-induced translocation of GLUT4 in 3T3-L1 adipocytes. Mediation of complex formation between syntaxin4 and VAMP2. *J Biol Chem* **275**, 8240-7.

Klugmann, M., Schwab, M. H., Puhlhofer, A., Schneider, A., Zimmermann, F., Griffiths, I. R. and Nave, K. A. (1997). Assembly of CNS myelin in the absence of proteolipid protein. *Neuron* **18**, 59-70.

Knapp, P. E., Skoff, R. P. and Redstone, D. W. (1986). Oligodendroglial cell death in jimpy mice: an explanation for the myelin deficit. *J Neurosci* **6**, 2813-22.

Kramer-Albers, E. M., Gehrig-Burger, K., Thiele, C., Trotter, J. and Nave, K. A. (2006). Perturbed interactions of mutant proteolipid protein/DM20 with cholesterol and lipid rafts in oligodendroglia: implications for dysmyelination in spastic paraplegia. *J Neurosci* **26**, 11743-52.

Kramer, E. M., Schardt, A. and Nave, K. A. (2001). Membrane traffic in myelinating oligodendrocytes. *Microsc Res Tech* **52**, 656-71.

Kumaran, D., Rawat, R., Ahmed, S. A. and Swaminathan, S. (2008). Substrate binding mode and its implication on drug design for botulinum neurotoxin A. *PLoS Pathog* **4**, e1000165.

Lafont, F., Verkade, P., Galli, T., Wimmer, C., Louvard, D. and Simons, K. (1999). Raft association of SNAP receptors acting in apical trafficking in Madin-Darby canine kidney cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 3734-8.

Lang, T., Bruns, D., Wenzel, D., Riedel, D., Holroyd, P., Thiele, C. and Jahn, R. (2001). SNAREs are concentrated in cholesterol-dependent clusters that define docking and fusion sites for exocytosis. *Embo J* **20**, 2202-13.

Lappe-Siefke, C., Goebbels, S., Gravel, M., Nicksch, E., Lee, J., Braun, P. E., Griffiths, I. R. and Nave, K. A. (2003). Disruption of Cnp1 uncouples oligodendroglial functions in axonal support and myelination. *Nat Genet* **33**, 366-74.

Latham, C. F., Lopez, J. A., Hu, S. H., Gee, C. L., Westbury, E., Blair, D. H., Armishaw, C. J., Alewood, P. F., Bryant, N. J., James, D. E. et al. (2006). Molecular dissection of the Munc18c/syntaxin4 interaction: implications for regulation of membrane trafficking. *Traffic* **7**, 1408-19.

Lee, J., Gravel, M., Zhang, R., Thibault, P. and Braun, P. E. (2005). Process outgrowth in oligodendrocytes is mediated by CNP, a novel microtubule assembly myelin protein. *J Cell Biol* **170**, 661-73.

Li, C., Tropak, M. B., Gerlai, R., Clapoff, S., Abramow-Newerly, W., Trapp, B., Peterson, A. and Roder, J. (1994). Myelination in the absence of myelin-associated glycoprotein. *Nature* **369**, 747-50.

Li, X., Low, S. H., Miura, M. and Weimbs, T. (2002). SNARE expression and localization in renal epithelial cells suggest mechanism for variability of trafficking phenotypes. *Am J Physiol Renal Physiol* **283**, F1111-22.

Low, S. H., Chapin, S. J., Weimbs, T., Komuves, L. G., Bennett, M. K. and Mostov, K. E. (1996). Differential localization of syntaxin isoforms in polarized Madin-Darby canine kidney cells. *Mol Biol Cell* **7**, 2007-18.

Low, S. H., Chapin, S. J., Wimmer, C., Whiteheart, S. W., Komuves, L. G., Mostov, K. E. and Weimbs, T. (1998). The SNARE machinery is involved in apical plasma membrane trafficking in MDCK cells. *J Cell Biol* **141**, 1503-13.

- Low, S. H., Miura, M., Roche, P. A., Valdez, A. C., Mostov, K. E. and Weimbs, T.** (2000). Intracellular redirection of plasma membrane trafficking after loss of epithelial cell polarity. *Mol Biol Cell* **11**, 3045-60.
- Low, S. H., Vasanji, A., Nanduri, J., He, M., Sharma, N., Koo, M., Drazba, J. and Weimbs, T.** (2006). Syntaxins 3 and 4 are concentrated in separate clusters on the plasma membrane before the establishment of cell polarity. *Mol Biol Cell* **17**, 977-89.
- Madison, D. L., Krueger, W. H., Cheng, D., Trapp, B. D. and Pfeiffer, S. E.** (1999). SNARE complex proteins, including the cognate pair VAMP-2 and syntaxin-4, are expressed in cultured oligodendrocytes. *J Neurochem* **72**, 988-98.
- Maier, O., Hoekstra, D. and Baron, W.** (2008). Polarity Development in Oligodendrocytes: Sorting and Trafficking of Myelin Components. *J Mol Neurosci*.
- Mallard, F., Tang, B. L., Galli, T., Tenza, D., Saint-Pol, A., Yue, X., Antony, C., Hong, W., Goud, B. and Johannes, L.** (2002). Early/recycling endosomes-to-TGN transport involves two SNARE complexes and a Rab6 isoform. *J Cell Biol* **156**, 653-64.
- Malsam, J., Kreye, S. and Sollner, T. H.** (2008). Membrane fusion: SNAREs and regulation. *Cell Mol Life Sci* **65**, 2814-32.
- Marqueze, B., Berton, F. and Seagar, M.** (2000). Synaptotagmins in membrane traffic: which vesicles do the tagmins tag? *Biochimie* **82**, 409-20.
- Marta, C. B., Montano, M. B., Taylor, C. M., Taylor, A. L., Bansal, R. and Pfeiffer, S. E.** (2005). Signaling cascades activated upon antibody cross-linking of myelin oligodendrocyte glycoprotein: potential implications for multiple sclerosis. *J Biol Chem* **280**, 8985-93.
- Marta, C. B., Taylor, C. M., Coetzee, T., Kim, T., Winkler, S., Bansal, R. and Pfeiffer, S. E.** (2003). Antibody cross-linking of myelin oligodendrocyte glycoprotein leads to its rapid repartitioning into detergent-insoluble fractions, and altered protein phosphorylation and cell morphology. *J Neurosci* **23**, 5461-71.
- Martinez-Arca, S., Alberts, P. and Galli, T.** (2000a). Clostridial neurotoxin-insensitive vesicular SNAREs in exocytosis and endocytosis. *Biol Cell* **92**, 449-53.
- Martinez-Arca, S., Alberts, P., Zahraoui, A., Louvard, D. and Galli, T.** (2000b). Role of tetanus neurotoxin insensitive vesicle-associated membrane protein (TI-VAMP) in vesicular transport mediating neurite outgrowth. *J Cell Biol* **149**, 889-900.
- Martinez-Arca, S., Proux-Gillardeaux, V., Alberts, P., Louvard, D. and Galli, T.** (2003a). Ectopic expression of syntaxin 1 in the ER redirects TI-VAMP- and cellubrevin-containing vesicles. *J Cell Sci* **116**, 2805-16.

Martinez-Arca, S., Rudge, R., Vacca, M., Raposo, G., Camonis, J., Proux-Gillardeaux, V., Daviet, L., Formstecher, E., Hamburger, A., Filippini, F. et al. (2003b). A dual mechanism controlling the localization and function of exocytic v-SNAREs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 9011-6.

Mascia, L. and Langosch, D. (2007). Evidence that late-endosomal SNARE multimerization complex is promoted by transmembrane segments. *Biochim Biophys Acta* **1768**, 457-66.

Matanis, T., Akhmanova, A., Wulf, P., Del Nery, E., Weide, T., Stepanova, T., Galjart, N., Grosveld, F., Goud, B., De Zeeuw, C. I. et al. (2002). Bicaudal-D regulates COPI-independent Golgi-ER transport by recruiting the dynein-dynactin motor complex. *Nat Cell Biol* **4**, 986-92.

McMahon, H. T. and Mills, I. G. (2004). COP and clathrin-coated vesicle budding: different pathways, common approaches. *Curr Opin Cell Biol* **16**, 379-91.

McMahon, H. T., Ushkaryov, Y. A., Edelman, L., Link, E., Binz, T., Niemann, H., Jahn, R. and Sudhof, T. C. (1993). Cellubrevin is a ubiquitous tetanus-toxin substrate homologous to a putative synaptic vesicle fusion protein. *Nature* **364**, 346-9.

McNew, J. A., Parlati, F., Fukuda, R., Johnston, R. J., Paz, K., Paumet, F., Sollner, T. H. and Rothman, J. E. (2000). Compartmental specificity of cellular membrane fusion encoded in SNARE proteins. *Nature* **407**, 153-9.

McTigue, D. M. and Tripathi, R. B. (2008). The life, death, and replacement of oligodendrocytes in the adult CNS. *J Neurochem* **107**, 1-19.

Mehta, N. R., Lopez, P. H., Vyas, A. A. and Schnaar, R. L. (2007). Gangliosides and Nogo receptors independently mediate myelin-associated glycoprotein inhibition of neurite outgrowth in different nerve cells. *J Biol Chem* **282**, 27875-86.

Michailov, G. V., Sereda, M. W., Brinkmann, B. G., Fischer, T. M., Haug, B., Birchmeier, C., Role, L., Lai, C., Schwab, M. H. and Nave, K. A. (2004). Axonal neuregulin-1 regulates myelin sheath thickness. *Science* **304**, 700-3.

Mikol, D. D., Gulcher, J. R. and Stefansson, K. (1990). The oligodendrocyte-myelin glycoprotein belongs to a distinct family of proteins and contains the HNK-1 carbohydrate. *J Cell Biol* **110**, 471-9.

Miller, C. L., Burmeister, M. and Stevens, K. E. (1999). Hippocampal auditory gating in the hyperactive mocha mouse. *Neurosci Lett* **276**, 57-60.

Miller, R. H. (2002). Regulation of oligodendrocyte development in the vertebrate CNS. *Prog Neurobiol* **67**, 451-67.

Moller, J. R. (1996). Rapid conversion of myelin-associated glycoprotein to a soluble derivative in primates. *Brain Res* **741**, 27-31.

- Montag, D., Giese, K. P., Bartsch, U., Martini, R., Lang, Y., Bluthmann, H., Karthigasan, J., Kirschner, D. A., Wintergerst, E. S., Nave, K. A. et al.** (1994). Mice deficient for the myelin-associated glycoprotein show subtle abnormalities in myelin. *Neuron* **13**, 229-46.
- Murray, R. Z., Kay, J. G., Sangermani, D. G. and Stow, J. L.** (2005a). A role for the phagosome in cytokine secretion. *Science* **310**, 1492-5.
- Murray, R. Z., Wylie, F. G., Khromykh, T., Hume, D. A. and Stow, J. L.** (2005b). Syntaxin 6 and Vti1b form a novel SNARE complex, which is up-regulated in activated macrophages to facilitate exocytosis of tumor necrosis Factor-alpha. *J Biol Chem* **280**, 10478-83.
- Nave, K. A. and Trapp, B. D.** (2008). Axon-glial signaling and the glial support of axon function. *Annu Rev Neurosci* **31**, 535-61.
- Nicolay, D. J., Doucette, J. R. and Nazarali, A. J.** (2007). Transcriptional control of oligodendrogenesis. *Glia* **55**, 1287-99.
- Norton, W. T. and Poduslo, S. E.** (1973). Myelination in rat brain: method of myelin isolation. *J Neurochem* **21**, 749-57.
- Parlati, F., McNew, J. A., Fukuda, R., Miller, R., Sollner, T. H. and Rothman, J. E.** (2000). Topological restriction of SNARE-dependent membrane fusion. *Nature* **407**, 194-8.
- Paukert, M. and Bergles, D. E.** (2006). Synaptic communication between neurons and NG2+ cells. *Curr Opin Neurobiol* **16**, 515-21.
- Paumet, F., Rahimian, V. and Rothman, J. E.** (2004). The specificity of SNARE-dependent fusion is encoded in the SNARE motif. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 3376-80.
- Peden, A. A., Oorschot, V., Hesser, B. A., Austin, C. D., Scheller, R. H. and Klumperman, J.** (2004). Localization of the AP-3 adaptor complex defines a novel endosomal exit site for lysosomal membrane proteins. *J Cell Biol* **164**, 1065-76.
- Peters, A., Palay, S., Webster, H.** (1976). The fine structure of the nervous system: The neurons and supporting cells.
- Pfeiffer, S. E., Warrington, A. E. and Bansal, R.** (1993). The oligodendrocyte and its many cellular processes. *Trends Cell Biol* **3**, 191-7.
- Pham-Dinh, D., Mattei, M. G., Nussbaum, J. L., Roussel, G., Pontarotti, P., Roeckel, N., Mather, I. H., Artzt, K., Lindahl, K. F. and Dautigny, A.** (1993). Myelin/oligodendrocyte glycoprotein is a member of a subset of the immunoglobulin superfamily encoded within the major histocompatibility complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 7990-4.

- Pobbati, A. V., Razeto, A., Boddener, M., Becker, S. and Fasshauer, D.** (2004). Structural basis for the inhibitory role of tomosyn in exocytosis. *J Biol Chem* **279**, 47192-200.
- Pocard, T., Le Bivic, A., Galli, T. and Zurzolo, C.** (2007). Distinct v-SNAREs regulate direct and indirect apical delivery in polarized epithelial cells. *J Cell Sci* **120**, 3309-20.
- Polgar, J., Chung, S. H. and Reed, G. L.** (2002). Vesicle-associated membrane protein 3 (VAMP-3) and VAMP-8 are present in human platelets and are required for granule secretion. *Blood* **100**, 1081-3.
- Poliak, S. and Peles, E.** (2003). The local differentiation of myelinated axons at nodes of Ranvier. *Nat Rev Neurosci* **4**, 968-80.
- Predescu, S. A., Predescu, D. N., Shimizu, K., Klein, I. K. and Malik, A. B.** (2005). Cholesterol-dependent syntaxin-4 and SNAP-23 clustering regulates caveolar fusion with the endothelial plasma membrane. *J Biol Chem* **280**, 37130-8.
- Prekeris, R., Klumperman, J., Chen, Y. A. and Scheller, R. H.** (1998). Syntaxin 13 mediates cycling of plasma membrane proteins via tubulovesicular recycling endosomes. *J Cell Biol* **143**, 957-71.
- Prekeris, R., Yang, B., Oorschot, V., Klumperman, J. and Scheller, R. H.** (1999). Differential roles of syntaxin 7 and syntaxin 8 in endosomal trafficking. *Mol Biol Cell* **10**, 3891-908.
- Proux-Gillardeaux, V., Raposo, G., Irinopoulou, T. and Galli, T.** (2007). Expression of the Longin domain of TI-VAMP impairs lysosomal secretion and epithelial cell migration. *Biol Cell* **99**, 261-71.
- Pryor, P. R., Mullock, B. M., Bright, N. A., Lindsay, M. R., Gray, S. R., Richardson, S. C., Stewart, A., James, D. E., Piper, R. C. and Luzio, J. P.** (2004). Combinatorial SNARE complexes with VAMP7 or VAMP8 define different late endocytic fusion events. *EMBO Rep* **5**, 590-5.
- Quarles, R. H.** (1997). Glycoproteins of myelin sheaths. *J Mol Neurosci* **8**, 1-12.
- Rao, S. K., Huynh, C., Proux-Gillardeaux, V., Galli, T. and Andrews, N. W.** (2004). Identification of SNAREs involved in synaptotagmin VII-regulated lysosomal exocytosis. *J Biol Chem* **279**, 20471-9.
- Rasband, M. N., Peles, E., Trimmer, J. S., Levinson, S. R., Lux, S. E. and Shrager, P.** (1999). Dependence of nodal sodium channel clustering on paranodal axoglial contact in the developing CNS. *J Neurosci* **19**, 7516-28.
- Rasband, M. N., Tayler, J., Kaga, Y., Yang, Y., Lappe-Siefke, C., Nave, K. A. and Bansal, R.** (2005). CNP is required for maintenance of axon-glia interactions at nodes of Ranvier in the CNS. *Glia* **50**, 86-90.

- Reim, K., Wegmeyer, H., Brandstatter, J. H., Xue, M., Rosenmund, C., Dresbach, T., Hofmann, K. and Brose, N.** (2005). Structurally and functionally unique complexins at retinal ribbon synapses. *J Cell Biol* **169**, 669-80.
- Robinson, M. S.** (2004). Adaptable adaptors for coated vesicles. *Trends Cell Biol* **14**, 167-74.
- Rodkey, T. L., Liu, S., Barry, M. and McNew, J. A.** (2008). Munc18a Scaffolds SNARE Assembly to Promote Membrane Fusion. *Mol Biol Cell*.
- Rosenberg, S. S., Ng, B. K. and Chan, J. R.** (2006). The quest for remyelination: a new role for neurotrophins and their receptors. *Brain Pathol* **16**, 288-94.
- Rosenbluth, J., Nave, K. A., Mierzwa, A. and Schiff, R.** (2006). Subtle myelin defects in PLP-null mice. *Glia* **54**, 172-82.
- Roth, A. D., Ivanova, A. and Colman, D. R.** (2006). New observations on the compact myelin proteome. *Neuron Glia Biol* **2**, 15-21.
- Sakisaka, T., Yamamoto, Y., Mochida, S., Nakamura, M., Nishikawa, K., Ishizaki, H., Okamoto-Tanaka, M., Miyoshi, J., Fujiyoshi, Y., Manabe, T. et al.** (2008). Dual inhibition of SNARE complex formation by tomosyn ensures controlled neurotransmitter release. *J Cell Biol* **183**, 323-37.
- Salzer, J. L.** (2003). Polarized domains of myelinated axons. *Neuron* **40**, 297-318.
- Sander, L. E., Frank, S. P., Bolat, S., Blank, U., Galli, T., Bigalke, H., Bischoff, S. C. and Lorentz, A.** (2008). Vesicle associated membrane protein (VAMP)-7 and VAMP-8, but not VAMP-2 or VAMP-3, are required for activation-induced degranulation of mature human mast cells. *Eur J Immunol* **38**, 855-63.
- Schafer, D. P. and Rasband, M. N.** (2006). Glial regulation of the axonal membrane at nodes of Ranvier. *Curr Opin Neurobiol* **16**, 508-14.
- Schardt, A., Brinkmann, B. G., Mitkovski, M., Sereda, M. W., Werner, H. B. and Nave, K. A.** (2009). The SNARE protein SNAP-29 interacts with the GTPase Rab3A: Implications for membrane trafficking in myelinating glia. *J Neurosci Res*.
- Scheuber, A., Rudge, R., Danglot, L., Raposo, G., Binz, T., Poncer, J. C. and Galli, T.** (2006). Loss of AP-3 function affects spontaneous and evoked release at hippocampal mossy fiber synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 16562-7.
- Schnaar, R. L. and Lopez, P. H.** (2009). Myelin-associated glycoprotein and its axonal receptors. *J Neurosci Res*.
- Schneider, A., Lander, H., Schulz, G., Wolburg, H., Nave, K. A., Schulz, J. B. and Simons, M.** (2005). Palmitoylation is a sorting determinant for transport to the myelin membrane. *J Cell Sci* **118**, 2415-23.

Schonherr, M. (2008). Funktionelle Rolle des SNARE-Proteins VAMP3 bei der Myelinisierung (Diplomarbeit).

Schultz, J., Doerks, T., Ponting, C. P., Copley, R. R. and Bork, P. (2000). More than 1,000 putative new human signalling proteins revealed by EST data mining. *Nat Genet* **25**, 201-4.

Sehgal, P. B., Mukhopadhyay, S., Xu, F., Patel, K. and Shah, M. (2007). Dysfunction of Golgi tethers, SNAREs, and SNAPs in monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **292**, L1526-42.

Sharma, N., Low, S. H., Misra, S., Pallavi, B. and Weimbs, T. (2006). Apical targeting of syntaxin 3 is essential for epithelial cell polarity. *J Cell Biol* **173**, 937-48.

Simons, M., Kramer, E. M., Macchi, P., Rathke-Hartlieb, S., Trotter, J., Nave, K. A. and Schulz, J. B. (2002). Overexpression of the myelin proteolipid protein leads to accumulation of cholesterol and proteolipid protein in endosomes/lysosomes: implications for Pelizaeus-Merzbacher disease. *J Cell Biol* **157**, 327-36.

Simons, M., Kramer, E. M., Thiele, C., Stoffel, W. and Trotter, J. (2000). Assembly of myelin by association of proteolipid protein with cholesterol- and galactosylceramide-rich membrane domains. *J Cell Biol* **151**, 143-54.

Simons, M. and Trajkovic, K. (2006). Neuron-glia communication in the control of oligodendrocyte function and myelin biogenesis. *J Cell Sci* **119**, 4381-9.

Simons, M. and Trotter, J. (2007). Wrapping it up: the cell biology of myelination. *Curr Opin Neurobiol* **17**, 533-40.

Simonsen, A., Bremnes, B., Ronning, E., Aasland, R. and Stenmark, H. (1998). Syntaxin-16, a putative Golgi t-SNARE. *Eur J Cell Biol* **75**, 223-31.

Sollner, T., Whiteheart, S. W., Brunner, M., Erdjument-Bromage, H., Geromanos, S., Tempst, P. and Rothman, J. E. (1993). SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* **362**, 318-24.

Sorensen, J. B., Nagy, G., Varoqueaux, F., Nehring, R. B., Brose, N., Wilson, M. C. and Neher, E. (2003). Differential control of the releasable vesicle pools by SNAP-25 splice variants and SNAP-23. *Cell* **114**, 75-86.

Southwood, C. M., Garbern, J., Jiang, W. and Gow, A. (2002). The unfolded protein response modulates disease severity in Pelizaeus-Merzbacher disease. *Neuron* **36**, 585-96.

Steggmaier, M., Klumperman, J., Foletti, D. L., Yoo, J. S. and Scheller, R. H. (1999). Vesicle-associated membrane protein 4 is implicated in trans-Golgi network vesicle trafficking. *Mol Biol Cell* **10**, 1957-72.

- Stegmaier, M., Yang, B., Yoo, J. S., Huang, B., Shen, M., Yu, S., Luo, Y. and Scheller, R. H.** (1998). Three novel proteins of the syntaxin/SNAP-25 family. *J Biol Chem* **273**, 34171-9.
- Stevens, B., Porta, S., Haak, L. L., Gallo, V. and Fields, R. D.** (2002). Adenosine: a neuron-glia transmitter promoting myelination in the CNS in response to action potentials. *Neuron* **36**, 855-68.
- Su, Q., Mochida, S., Tian, J. H., Mehta, R. and Sheng, Z. H.** (2001). SNAP-29: a general SNARE protein that inhibits SNARE disassembly and is implicated in synaptic transmission. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 14038-43.
- Sudhof, T. C. and Rothman, J. E.** (2009). Membrane fusion: grappling with SNARE and SM proteins. *Science* **323**, 474-7.
- Susuki, K. and Rasband, M. N.** (2008). Molecular mechanisms of node of Ranvier formation. *Curr Opin Cell Biol.*
- Sutton, R. B., Fasshauer, D., Jahn, R. and Brunger, A. T.** (1998). Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature* **395**, 347-53.
- Tang, J., Maximov, A., Shin, O. H., Dai, H., Rizo, J. and Sudhof, T. C.** (2006). A complexin/synaptotagmin 1 switch controls fast synaptic vesicle exocytosis. *Cell* **126**, 1175-87.
- Taveggia, C., Zanazzi, G., Petrylak, A., Yano, H., Rosenbluth, J., Einheber, S., Xu, X., Esper, R. M., Loeb, J. A., Shrager, P. et al.** (2005). Neuregulin-1 type III determines the ensheathment fate of axons. *Neuron* **47**, 681-94.
- Taylor, C. M., Marta, C. B., Claycomb, R. J., Han, D. K., Rasband, M. N., Coetzee, T. and Pfeiffer, S. E.** (2004). Proteomic mapping provides powerful insights into functional myelin biology. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 4643-8.
- Tian, W., Ma, C., Liu, Y. and Xu, T.** (2008). An efficient co-expression and purification system for the complex of Stx4 and C-terminal domain of Synip. *Biochem Biophys Res Commun* **371**, 366-70.
- Trajkovic, K., Dhaunchak, A. S., Goncalves, J. T., Wenzel, D., Schneider, A., Bunt, G., Nave, K. A. and Simons, M.** (2006). Neuron to glia signaling triggers myelin membrane exocytosis from endosomal storage sites. *J Cell Biol* **172**, 937-48.
- Tran, T. H., Zeng, Q. and Hong, W.** (2007). VAMP4 cycles from the cell surface to the trans-Golgi network via sorting and recycling endosomes. *J Cell Sci* **120**, 1028-41.
- Trapp, B. D., Andrews, S. B., Cootauco, C. and Quarles, R.** (1989). The myelin-associated glycoprotein is enriched in multivesicular bodies and periaxonal membranes of actively myelinating oligodendrocytes. *J Cell Biol* **109**, 2417-26.

Trapp, B. D., Bernier, L., Andrews, S. B. and Colman, D. R. (1988). Cellular and subcellular distribution of 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase and its mRNA in the rat central nervous system. *J Neurochem* **51**, 859-68.

Trotter, J. and Schachner, M. (1989). Cells positive for the O4 surface antigen isolated by cell sorting are able to differentiate into astrocytes or oligodendrocytes. *Brain Res Dev Brain Res* **46**, 115-22.

Ungar, D. and Hughson, F. M. (2003). SNARE protein structure and function. *Annu Rev Cell Dev Biol* **19**, 493-517.

Varlamov, O., Volchuk, A., Rahimian, V., Doege, C. A., Paumet, F., Eng, W. S., Arango, N., Parlati, F., Ravazzola, M., Orci, L. et al. (2004). i-SNAREs: inhibitory SNAREs that fine-tune the specificity of membrane fusion. *J Cell Biol* **164**, 79-88.

Veit, M., Sollner, T. H. and Rothman, J. E. (1996). Multiple palmitoylation of synaptotagmin and the t-SNARE SNAP-25. *FEBS Lett* **385**, 119-23.

Vogel, K., Cabaniols, J. P. and Roche, P. A. (2000). Targeting of SNAP-25 to membranes is mediated by its association with the target SNARE syntaxin. *J Biol Chem* **275**, 2959-65.

von Budingen, H. C., Tanuma, N., Villoslada, P., Ouallet, J. C., Hauser, S. L. and Genain, C. P. (2001). Immune responses against the myelin/oligodendrocyte glycoprotein in experimental autoimmune demyelination. *J Clin Immunol* **21**, 155-70.

Wang, C. C., Ng, C. P., Lu, L., Atlashkin, V., Zhang, W., Seet, L. F. and Hong, W. (2004). A role of VAMP8/endobrevin in regulated exocytosis of pancreatic acinar cells. *Dev Cell* **7**, 359-71.

Wang, C. W., Hamamoto, S., Orci, L. and Schekman, R. (2006). Exomer: A coat complex for transport of select membrane proteins from the trans-Golgi network to the plasma membrane in yeast. *J Cell Biol* **174**, 973-83.

Wang, S., Sdrulla, A. D., diSibio, G., Bush, G., Nofziger, D., Hicks, C., Weinmaster, G. and Barres, B. A. (1998). Notch receptor activation inhibits oligodendrocyte differentiation. *Neuron* **21**, 63-75.

Watkins, T. A., Emery, B., Mulinyawe, S. and Barres, B. A. (2008). Distinct stages of myelination regulated by gamma-secretase and astrocytes in a rapidly myelinating CNS coculture system. *Neuron* **60**, 555-69.

Weimbs, T., Low, S. H., Li, X. and Kreitzer, G. (2003). SNAREs and epithelial cells. *Methods* **30**, 191-7.

Werner, H., Jung, M., Klugmann, M., Sereda, M., Griffiths, I. R. and Nave, K. A. (1998). Mouse models of myelin diseases. *Brain Pathol* **8**, 771-93.

- Werner, H. B., Kuhlmann, K., Shen, S., Uecker, M., Schardt, A., Dimova, K., Orfaniotou, F., Dhaunchak, A., Brinkmann, B. G., Mobius, W. et al.** (2007). Proteolipid protein is required for transport of sirtuin 2 into CNS myelin. *J Neurosci* **27**, 7717-30.
- White, R., Gonsior, C., Kramer-Albers, E. M., Stohr, N., Huttelmaier, S. and Trotter, J.** (2008). Activation of oligodendroglial Fyn kinase enhances translation of mRNAs transported in hnRNP A2-dependent RNA granules. *J Cell Biol* **181**, 579-86.
- Winterstein, C., Trotter, J. and Kramer-Albers, E. M.** (2008). Distinct endocytic recycling of myelin proteins promotes oligodendroglial membrane remodeling. *J Cell Sci.* 15: **121**:834-42.
- Yamamoto, Y., Mizuno, R., Nishimura, T., Ogawa, Y., Yoshikawa, H., Fujimura, H., Adachi, E., Kishimoto, T., Yanagihara, T. and Sakoda, S.** (1994). Cloning and expression of myelin-associated oligodendrocytic basic protein. A novel basic protein constituting the central nervous system myelin. *J Biol Chem* **269**, 31725-30.
- Yamazaki, Y., Hozumi, Y., Kaneko, K., Sugihara, T., Fujii, S., Goto, K. and Kato, H.** (2007). Modulatory effects of oligodendrocytes on the conduction velocity of action potentials along axons in the alveus of the rat hippocampal CA1 region. *Neuron Glia Biol* **3**, 325-34.
- Yang, B., Gonzalez, L., Jr., Prekeris, R., Steegmaier, M., Advani, R. J. and Scheller, R. H.** (1999). SNARE interactions are not selective. Implications for membrane fusion specificity. *J Biol Chem* **274**, 5649-53.
- Yang, C., Mora, S., Ryder, J. W., Coker, K. J., Hansen, P., Allen, L. A. and Pessin, J. E.** (2001). VAMP3 null mice display normal constitutive, insulin- and exercise-regulated vesicle trafficking. *Mol Cell Biol* **21**, 1573-80.
- Yin, X., Baek, R. C., Kirschner, D. A., Peterson, A., Fujii, Y., Nave, K. A., Macklin, W. B. and Trapp, B. D.** (2006). Evolution of a neuroprotective function of central nervous system myelin. *J Cell Biol* **172**, 469-78.
- Yoon, T. Y., Lu, X., Diao, J., Lee, S. M., Ha, T. and Shin, Y. K.** (2008). Complexin and Ca²⁺ stimulate SNARE-mediated membrane fusion. *Nat Struct Mol Biol* **15**, 707-13.
- Zearfoss, N. R., Farley, B. M. and Ryder, S. P.** (2008). Post-transcriptional regulation of myelin formation. *Biochim Biophys Acta* **1779**, 486-94.
- Zerial, M. and McBride, H.** (2001). Rab proteins as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 107-17.

8 Anhang

8.1 Verzeichnisse

8.1.1 Abkürzungsverzeichnis

A	A Abb. ADP Amp^R AP APS ATP	Axon Abbildung Adenosindiphosphat Ampizilin-Resistenz Adapterprotein Ammoniumperoxiddisulfat Adenosintriphosphat
B	BSA bzw.	Rinderserumalbumin (bovine serum albumine) beziehungsweise
C	cDNA CNP Co-IP COP CSF	Komplementäre DNS (complementary DNA) 2',3'-Cyclic Nucleotide 3' Phosphodiesterase Co-Immünpräzipitation Coat protein complex cerebrospinal fluid
D	dbcAMP DMEM DMSO DNA DTT	2'-O-dibutryl-3',5'-cyclic adenosine-monophosphate Dulbecco's modified eagle medium Dimethylsulfoxid Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid) Dithiothreitol
E	E EAE ECL EDTA ELISA E-PLP ER evtl. extra	Embryonaltag Experimental autoimmune encephalomyelitis Enhanced chemiluminescence Ethylendiamintetraacetat Enzyme Linked Immunosorbent Assay Endozytiertes PLP Endoplasmatisches Retikulum eventuell extrazellulär
G	g g GABA GalCer GFP ggf. GM130 GSL	Gramm Erdbeschleunigung g=9,81 N γ-Aminobuttersäure (gamma amino butyric acid) Galaktosylceramid Green Fluorescent Protein gegebenenfalls Golgi Matrix Protein / 130 kDa) Glykosphingolipide

H	h H HBSS HDAC HEPES HRP HS	Stunde (hour) Schwer (heavy) HANKs buffered salt solution Histone deacetylase 4-(2- Hydroxyethyl)- piperazin-1-ethansulonsäure Meerrettichperoxidase (horse raddish peroxidase) Pferdeserum (horse serum)
I	IF IM intra IP	I mmunfluoreszenz I ntrazelluläre M embran i ntrazellulär I mmunpräzipitation
K	Kan^R Kap. kb kDa	K anamyzin- R esistenz K apitel K ilobasen K ilodalton
L	L LAMP1 LB LE/Ly LIF	Leicht (light) L ysosomen-assoziertes M embran p rotein 1 L ysogeny b roth Späte Endosomen (late endosomes) / Lysosomen (lysosomes) L eukemia i nhibitory f actor
M	M mA MAG MBP MCS MDCK MES min ml MLM mM MOG MS	m olar M illiampere M yelin- a ssociated G lycoprotein M yelin B asic P rotein M ultiple c loning s ite M adin- D arby c anine k idney c ells 2-(N-morpholino) ethane sulfonic acid M inute M illiliter M yelin- l ike- m embrane m illimolar M yelin O ligodendrocyte G lycoprotein M ultiple S klerose
N	n.s. NEM NHS NRG-1 NSF	n icht s ignifikant N-Ethylm aleimid N-Hydroxysuccinimid N euregulin- 1 (TypIII) N-ethylmaleimide-sensitive-factor
P	P PAGE PBS PCR PFA pH PKA PLP PM	P ostnatal P olyacrylamid- G elelektrophorese P hosphate- b uffered s aline Polymerase-Kettenreaktion (p olymerase c hain r eaction) P araformaldehyd P otentia H ydrogenii P roteinkinasen Typ A P roteolipid P rotein P lasmamembran

Anhang

P	PM-PLP PNS pOL PVDF	PLP an Plasmamembran (Detektion: O10-Antikörper) Peripheres Nervensystem Primäre Oligodendrozyten Polyvenylidendifluoridmembran
Q	Q QRT-PCR	Glutamin Quantitative Real-Time PCR
R	R RE RISC RNA RPMI RT	Arginin Recycling Endosom RNA-induced silencing complex Ribonukleinsäure (ribonucleic acid) Roswell-Park-Memorial-Institute Zellkulturmedium Raumtemperatur
S	SDS SEM siRNA SM-Proteine SNAP SNARE Syn	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecylsulfate) Standard error of the mean (Standardabweichung vom Mittelwert) Small interfering RNA Sec1-Munc-verwandte Proteine Soluble-NSF-attachment-protein SNAP-Receptor Syntaxin
T	Tab. TAE TBS TCA TEMED TfR TGN TI-VAMP TMB TNFα Tris	Tabelle Tris-Acetic acid-EDTA Tris-buffered saline Trichloressigsäure (trichloroacetic acid) N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin Transferrin-Rezeptor trans-Golgi-Netzwerk Tetanustoxin-insensitives VAMP Tetramethylbenzidin Tumor-Nekrose-Faktor-α Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	U u.a.	Unit unter anderem
V	v.a. VAMP	vor allem Vesicle-associated-membrane-protein
W	WB	Westernblot
Z	z.B. z.T. ZNS	zum Beispiel zum Teil Zentrales Nervensystem
μ	μg μl μM	Mikrogramm Mikroliter mikromolar

8.1.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 2.1: Schematische Darstellung von myelinisierenden Oligodendrozyten	5
Abb. 2.2: Schematische Darstellung ausgewählter Myelinproteine	8
Abb. 2.3: Schematische Darstellung des SNARE-Zyklus	15
Abb. 3.1: VAMP3-Expressionsvektor	27
Abb. 3.2: VAMP7-Expressionsvektoren	27
Abb. 3.3: Syntaxin2-, 3- und 4-Expressionsvektoren	28
Abb. 3.4: PLP-Expressionsvektor	28
Abb. 3.5: PLP-eGFP-Expressionsvektor	29
Abb. 3.6: TeNT-Expressionsvektor	29
Abb. 3.7: Schematische Darstellung der Antikörper-Endozytose	44
Abb. 3.8: Versuchsablauf des Zell-ELISAs	45
Abb. 4.1: Expression und Regulation der SNARE-Proteine in primären Oligodendrozyten	47
Abb. 4.2: Expression der SNARE-Proteine in Gehirnllysaten und Myelin verschiedenen Alters	50
Abb. 4.3: Subzelluläre Lokalisation der SNARE-Proteine	54
Abb. 4.4: Expression der SNARE-Proteine an der Plasmamembran	55
Abb. 4.5: Co-Immunpräzipitationen primärer Oligodendrozyten und Oli-neu Zellen	56
Abb. 4.6: Co-Lokalisationen der SNARE-Proteine mit PLP	60
Abb. 4.7: Die Wirkung von dbcAMP auf den PLP-Transport in Oli-neu Zellen	62
Abb. 4.8: Auswirkung des VAMP3- <i>silencing</i> auf den PLP-Transport in Oli-neu Zellen	66
Abb. 4.9: Auswirkung des VAMP7- <i>Knockdown</i> auf den PLP-Transport in Oli-neu Zellen	68
Abb. 4.10: Doppel- <i>Knockdown</i> der SNARE-Proteine VAMP3 und VAMP7.	70
Abb. 4.11: Myelinisierung in <i>mocha</i> -Mäusen	72
Abb. 5.1: Zuordnung der SNARE-Proteine zu verschiedenen Transportwegen	79
Abb. 5.2: Transportrouten des SNARE-abhängigen PLP-Transports	83

8.1.3 Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1: Übersichtstabelle zur Lokalisation und zu bestehenden SNARE-Komplexen der untersuchten SNARE-Proteine	16
Tab. 2.2: Clostridiale Neurotoxine und ihre Zielproteine.	20
Tab. 4.1: Expressionsprofil der SNARE-Proteine.	61
Tab. 4.2: SNARE-Komplexe und Zuordnung der SNAREs zu oligodendroglialen Transportrouten	61
Tab. 4.3: Übersicht der untersuchten <i>mocha</i> -Mäuse (Gehirn-Nassgewicht, isolierte Myelinmenge)	71

8.2 Publikationen

I. Comprehensive Analysis of Expression, Subcellular Localization and Cognate Pairing of SNARE Proteins in Oligodendrocytes

Anke Feldmann, Christine Winterstein, Robin White, Jacqueline Trotter, and Eva-Maria Krämer-Albers

Department of Biology, Molecular Cell Biology, University of Mainz, Germany

Journal of Neuroscience Research, 2009

II. The SNARE Proteins VAMP3 and VAMP7 Control Membrane Transport of the Major Myelin Protein PLP

Anke Feldmann¹, Madeleine Schönherr¹, Christine Winterstein¹, Robin White¹, Wiebke Möbius², Lydia Ganglot³, Thierry Galli³, Klaus-Armin Nave², Jacqueline Trotter¹, and Eva-Maria Krämer-Albers¹

¹Department of Biology, Molecular Cell Biology, University of Mainz, Germany

²Department of Neurogenetics, Max Planck Institute of Experimental Medicine, Göttingen, Germany

³INSERM Avenir Team, Institut Jacques Monod UMR7592, 2, place Jussieu, 75251 Paris Cedex 05, France

(Manuskript in Präparation)