

Zellulärer Transport von Myelinproteinen

Dissertation
zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

von
Christine Winterstein
geboren am 28.03.1978 in Frankfurt am Main

Mainz, Mai 2007

Tag der mündlichen Prüfung: 14.06.2007

Inhaltsverzeichnis

1	Abstract	1
2	Einleitung	2
2.1	Oligodendrozyten und das Myelin.....	2
2.2	Die Struktur der Myelinmembran.....	3
2.2.1	Myelin unterteilt sich in Subdomänen	3
2.2.2	Die Biochemische Zusammensetzung des Myelins im ZNS	4
2.2.2.1	Das Proteolipid Protein (PLP)	6
2.2.2.2	Das Myelin-assoziierte Glykoprotein (MAG).....	8
2.2.2.3	Das Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein (MOG)	8
2.2.3	Die Bildung von Myelin	9
2.2.3.1	Die axo-gliale Interaktion	10
2.2.3.2	Der intrazelluläre Transport von Myelinkomponenten	11
2.3	Vesikeltransport und Membranbiogenese.....	12
2.3.1	Vesikeltransport in polaren Zellen	12
2.3.2	Endozytose und Recycling	13
2.3.2.1	Clathrin-vermittelte Endozytose	14
2.3.2.2	Clathrin-unabhängige Endozytose	14
2.3.3	Endosomales Recycling und Zellmorphogenese	16
2.3.4	Sekretorische Lysosomen bzw. Lysosomen-verwandte Organellen (LROs) ____	16
2.3.5	Exosomen	17
2.4	Fragestellung der Arbeit.....	18
3	Material und Methoden.....	19
3.1	Materialien.....	19
3.2	Puffer und Nährmedien	21
3.3	Antikörper	24
3.3.1	Primärantikörper	24
3.3.2	Sekundärantikörper	25
3.4	Fluoreszierende Marker	26
3.5	Plasmide.....	26
3.6	Zellkultur	26

Inhaltsverzeichnis

3.6.1	Präparation primärer Oligodendrozyten und gemischter Gehirnkulturen _____	26
3.6.1.1	Gemischte Gehirnkulturen.....	27
3.6.1.2	Neuronenkill und Abklopfen der Makrophagen	27
3.6.1.3	Oligodendrozyten-Shake.....	27
3.6.2	Oli-neu Zellen: Kultivierung, Passagieren, Auftauen und Einfrieren _____	28
3.6.3	Transiente Transfektion von Oli-neu Zellen _____	29
3.6.3.1	Elektroporation	29
3.6.3.2	AMAXA Nukleofektion	29
3.6.3.3	Liposomen-basierte Transfektion (Fugene 6, Lipofectamine 2000)	29
3.7	Präparation von Myelin und Zellmembranen	30
3.7.1	Isolierung von Myelin aus dem ZNS _____	30
3.7.2	Fraktionierung von Myelin _____	31
3.7.3	Präparation eines kernfreien Überstandes (PNS) _____	31
3.7.3.1	Aufbrechen von Zellen mit Hilfe einer 22 x G Kanüle	31
3.7.3.2	Aufbrechen von Zellen mit Hilfe eines <i>Cellcrackers</i>	31
3.7.3.3	Aufbrechen von Zellen mit Hilfe einer N ₂ -Bombe	32
3.7.4	Membranpräparation _____	32
3.7.5	Präparation von Myelin-ähnlichen Membranen (MLMs) aus primären Oligodendrozyten _____	32
3.7.6	Fraktionierung von oligodendroglialen Zellmembranen _____	32
3.7.7	Präparation von Exosomen _____	33
3.8	Das Biotin-Avidin-System.....	33
3.8.1	Biotin-bindende Proteine: Avidin, Streptavidin und Neutravidin _____	34
3.8.2	Biotinylierung von Molekülen _____	34
3.8.2.1	Zelloberflächenbiotinylierung.....	35
3.9	Fluoreszenzmarkierungen von Proteinen und Organellen.....	35
3.9.1	Immunfluoreszenz _____	35
3.9.2	Markierung der Recycling-Endosomen mit fluoreszierendem Transferrin _____	36
3.9.3	Markierung der Lysosomen mit LysoTracker® _____	36
3.9.4	Detektion biotinylierter Proteine mit fluoreszierendem Streptavidin _____	36
3.10	Methoden zur Analyse des endosomalen Transports von Myelinproteinen	36
3.10.1	Antikörper-Endozytose _____	36

Inhaltsverzeichnis

3.10.2 Endozytose und Recycling von zelloberflächenbiotinylierten Proteinen	38
3.10.2.1 Pulse Chase-Markierung von Zelloberflächenproteinen mit Sulfo-NHS-SS-Biotin.....	38
3.10.2.2 Recycling-Analyse von biotinylierten Zelloberflächenproteinen	38
3.11 Mikroskopische Analysen.....	39
3.11.1 Elektronenmikroskopie	39
3.11.2 Immuno-Elektronenmikroskopie	39
3.11.3 Lebendzellmikroskopie.....	40
3.12 Bradford-Test	40
3.13 SDS-PAGE	40
3.13.1 Coomassie-Färbung	41
3.14 Western-Blot	42
3.14.1 Ponceau-S Färbung.....	42
3.14.2 Immundetektion.....	42
3.15 Klonierung.....	43
3.15.1 Transformation	43
3.15.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	43
3.15.3 Konzentrationsmessung von DNA-Lösungen	43
3.15.4 Restriktionsverdau	44
3.15.5 Aufreinigung von DNA	44
3.15.6 Ligation	44
3.15.7 Analyse von DNA	44
3.15.7.1 Agarose-Gelelektrophorese	44
3.15.8 Amplifizierung von DNA	45
3.15.8.1 Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	45
3.15.9 Sequenzierung	45
4 Ergebnisse	46
4.1 In vitro Modelle zur Analyse des oligodendroglialen Membrantransports.....	46
4.2 Subzelluläre Lokalisierung von PLP, MAG und MOG in primären Oligodendrozyten und Oli-neu Zellen.....	47
4.2.1 PLP, MAG und MOG assoziieren <i>in vitro</i> mit morphologisch unterschiedlichen Membrandomänen	47

Inhaltsverzeichnis

4.2.2 Biochemische Subfraktionierung von Myelin und oligodendroglialen Zellmembranen	49
4.2.3 Kolokalisierung von PLP und LAMP1	50
4.2.4 Immunzytochemische Lokalisierung von PLP und LAMP1 an der Spitze von wachsenden Membranfortsätzen	53
4.3 Exozytose von Myelinproteinen in Oligodendrozyten	55
4.3.1 Nachweis der Exozytose von PLP enthaltenden LE/Lys in Oli-neu Zellen	55
4.3.2 Ca^{2+} -abhängige Translokation von PLP, MAG und MOG an die Plasmamembran von pOI	57
4.3.3 Präparation von MLMs nach Ionomycin-Behandlung	64
4.3.4 Exosomen-Präparation aus dem Kulturüberstand von pOI	65
4.4 Analysen zum endosomalen Transport von PLP, MAG und MOG	67
4.4.1 Unter <i>Steady State</i> -Bedingungen ist ausschließlich PLP in endosomalen Kompartimenten angereichert	67
4.4.2 Endozytose von zelloberflächenbiotinylierten Myelinproteinen	68
4.4.3 Morphologischer Nachweis der Endozytose von Myelinproteinen mit Antikörpern	72
4.4.4 PLP, MAG und MOG endozytieren in unterschiedliche endosomale Zielkompartimente	76
4.4.5 Clathrin-vermittelte Endozytose von MAG und MOG	79
4.4.6 Clathrin-unabhängige Endozytose von PLP	81
4.5 Endosomales Recycling von PLP, MAG und MOG in primären Oligodendrozyten	83
5 Diskussion	87
5.1 <i>In vitro</i> Transportanalysen von Myelinkomponenten	87
5.2 Die intrazelluläre Lokalisierung von PLP in LE/Lys	89
5.2.1 Die Funktion von LE/Lys als Membranspeicher	89
5.2.2 Findet Ca^{2+} -abhängige Exozytose von PLP enthaltenden LE/Lys statt?	91
5.3 Myelinproteine werden endosomal sortiert	93
5.4 Die Rolle von endosomalem Recycling bei der Bildung der Myelindomänen	96
6 Zusammenfassung	100

Inhaltsverzeichnis

7	<i>Referenzen</i>	101
8	<i>Anhang</i>	111
8.1	Abkürzungsverzeichnis.....	111
8.2	Abbildungsverzeichnis	115
8.3	Tabellenverzeichnis	116

1 Abstract

Während der Myelinbildung im zentralen Nervensystem (ZNS) umwinden Oligodendrozyten mit Ausläufern ihrer Plasmamembran mehrfach das Axon. Myelin ermöglicht die saltatorische Erregungsweiterleitung entlang der Axone und ist zudem für die Aufrechterhaltung der axonalen Integrität erforderlich (Edgar and Garbern, 2004). Ein Oligodendrozyt myelinisiert bis zu 40 Axonsegmente gleichzeitig, wodurch er in seiner aktivsten Myelinisierungsphase 5 bis $50 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ Membranfläche pro Tag produziert (Pfeiffer et al., 1993). Die vollständig ausgebildete Myelinscheide besteht aus Subdomänen mit charakteristischen Protein- und Lipidzusammensetzungen. Die Entwicklung und der Erhalt der komplexen Myelinmembran erfordert die kontinuierliche Kommunikation zwischen Neuronen und Glia-Zellen, die Koordination der Protein- und Lipidsynthese sowie angepasste intrazelluläre Sortier- und Transportwege der Myelinkomponenten. Über die molekularen Mechanismen, die zur Ausbildung des Myelins und seiner Domänen führen, ist bisher nicht sehr viel bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Endo- und Exozytosemechanismen von Myelinproteinen analysiert. Dabei wurden drei Proteine untersucht, die in unterschiedlichen Subdomänen der Myelinmembran des ZNS lokalisiert sind. Das Hauptmyelinprotein Proteolipid Protein (PLP), das Myelin-assoziierte Glykoprotein (MAG) und das Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein (MOG). Die Exozytose des Hauptmyelinproteins PLP erfolgt möglicherweise durch sekretorische Lysosomen (Trajkovic et al., 2006) und ist Ca^{2+} -abhängig. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass PLP, MAG und MOG unterschiedlichen endosomalen Transportwegen und Sortierprozessen unterliegen. PLP wird über einen Clathrin-unabhängigen, MAG und MOG hingegen über einen Clathrin-abhängigen Mechanismus endozytiert. Zudem gelangen die Proteine zu unterschiedlichen endosomalen Zielkompartimenten und recyceln zu verschiedenen oligodendroglialen Membrandomänen. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die endosomale Sortierung und das Recycling der Myelinproteine, die für die Bildung der Subdomänen erforderliche Umgestaltung der oligodendroglialen Plasmamembran unterstützen.

2 Einleitung

2.1 Oligodendrozyten und das Myelin

Neurone kommunizieren über Depolarisation des "elektrischen Potentials" ihrer Axone. Diese Potentialänderungen erfolgen energieabhängig, über den Kanal-vermittelten Austausch von Na^+ -Ionen und werden in Form von Aktionspotentialen entlang des Axons bis zu den Synapsen weitergeleitet, wo sie auf benachbarte Neurone übertragen werden. Die Potentialweiterleitung an unmyelinisierten Axonen erfolgt sehr langsam, mit einer Geschwindigkeit proportional zum Axonradius. Die schnelle Kommunikation zwischen unmyelinisierten Neuronen würde daher sehr viel Energie und Platz beanspruchen.

Während der Evolution des komplexen Nervensystems der Vertebraten entstanden myelinisierende Zellen, die eine schnelle und effiziente Kommunikation zwischen Neuronen ermöglichen. Die myelinisierenden Zellen des ZNS sind die Oligodendrozyten, die des peripheren Nervensystems (PNS) die Schwann-Zellen. Sie generieren eine in regelmäßigen Abständen unterbrochene isolierende Hülle um das Axon, das Myelin. Dabei werden die myelinfreien Abschnitte als Ranviersche Schnürringe und die myelinisierten Abschnitte als Internodien bezeichnet (Abb. 2.1).

Myelin besitzt eine geringe Kapazität und einen hohen Widerstand und wirkt dementsprechend als isolierende Hülle, die den Ionenaustausch während der Reizweiterleitung verhindert. Der Ionenaustausch erfolgt hingegen an den Ranvierschen Schnürringen, an denen sich eine Ansammlung von spannungsgesteuerten Na^+ -Kanälen befindet. Der Nervenimpuls springt dabei mit einer Geschwindigkeit von bis zu 100 m/s von Schnürring zu Schnürring, ein Vorgang der als saltatorische Erregungsweiterleitung bezeichnet wird.

2.2 Die Struktur der Myelinmembran

2.2.1 Myelin unterteilt sich in Subdomänen

Während der Myelinisierung im zentralen Nervensystem umwickelt der Oligodendrozyt mit Ausläufern seiner Plasmamembran spiralförmig mehrere Axonsegmente. Ein Myelinsegment (Internodium) wird ultrastrukturell und funktionell in unterschiedliche Domänen, das kompakte und nicht-kompakte Myelin mit jeweils unterschiedlicher, charakteristischer biochemischer Zusammensetzung unterteilt (Trapp and Kidd, 2004). Durch Herausquetschen des Zytoplasmas während der Myelinisierung, der sog. Kompaktierung, entsteht das kompakte Myelin mit seiner charakteristischen elektronenmikroskopischen Ultrastruktur. Im Querschnitt stellt sich diese Struktur aus alternierenden hellen und dunklen Linien dar (Abb. 2.2). Die dunklen Regionen - die sogenannte *major dense line* - entsprechen den aufeinanderliegenden zytoplasmatischen Membranseiten, die hellen Regionen - oder *intraparallel line* - entsprechen den extrazellulären Membranoberflächen.

Kompaktes Myelin besitzt kein Zytoplasma und verhindert durch seine geringe Leitfähigkeit und seinen hohen Widerstand das Durchtreten von Ionen. In der innersten (periaxonalen) und äußersten (abaxonalen) Lamelle sowie in den direkt an den Ranvierschen Schnürringen angrenzenden Paranodien bleiben hingegen die nicht-kompaktierten, zytoplasmatischen Regionen erhalten (Abb. 2.1; Arroyo and Scherer, 2000; Dubois-Dalcq et al., 1986; Trapp and Kidd, 2004). Die abaxonale Lamelle stellt eine zytoplasmatische Verbindung zum Oligodendrozyten-Zellkörper und den Paranodien her. Sie enthält Mikrotubuli und andere Zytoskelettkomponenten sowie Mitochondrien, die für den Aufbau und den Erhalt der Internodien notwendig sind. Die periaxonale Membran sowie die Paranodien, stellen über eine Anreicherung von Zelladhäsionsproteinen (z.B. MAG und Neurofascin 155) den direkten Kontakt zum Axon her.

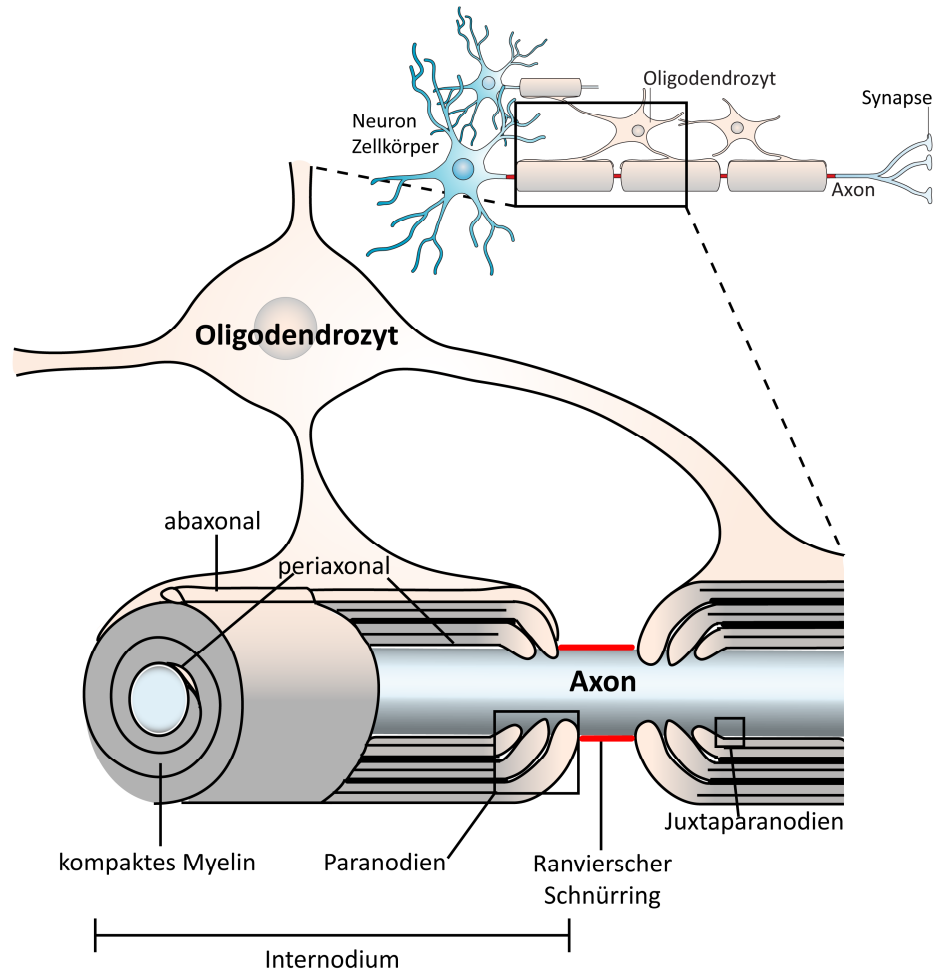


Abb. 2.1: Schematische Darstellung eines myelinisierenden Oligodendrozyten.

Während der Myelinisierung im zentralen Nervensystem umwickeln Oligodendrozyten mit Ausläufern ihrer Plasmamembran mehrere Axonsegmente und bilden eine elektrische Isolationshülle aus. Dabei findet an den myelinfreien Regionen, den Ranvierschen Schnürringen, der Ionenaustausch über spannungsgesteuerte Na^+ -Kanäle statt (rot). Ein Myelinsegment gliedert sich in kompaktes (grau) und nichtkompaktes (rosa) Myelin. Zu den nicht-kompakten, zytoplasmahaltigen Regionen zählen die Paranodien, die periaxonale Lamelle sowie die abaxonale Lamelle. Modifiziert nach (Poliak and Peles, 2003).

2.2.2 Die Biochemische Zusammensetzung des Myelins im ZNS

Myelin ist mit ca. 40 - 50 % im Trockengewicht, der Hauptbestandteil der weißen Substanz des ZNS. Im Vergleich zu gewöhnlichen Membranen, die zu ca. 35 - 40 % aus Lipiden bestehen, ist der Lipidanteil im kompakten Myelin mit ca. 75 % im Trockengewicht besonders hoch. Die daraus resultierende geringe Dichte des Myelins ermöglicht dessen einfache biochemische Trennung von anderen Membranen (Norton and Poduslo, 1973) und erleichterte dessen biochemische Charakterisierung.

Obwohl keine spezifischen Myelinlipide existieren, machen Cholesterin und Sphingolipide, im Besonderen Galaktosylceramide und deren sulfatierte Derivate (Sulfatide od.

2. Einleitung

Sulfogalaktosylceramide) den charakteristischen Hauptbestandteil der Myelinlipide aus (Morell and Quarles, 1999; Morell et al., 1994; Norton and Cammer 1984). Sie sind sowohl für die Strukturhaltung als auch für die Funktion der Myelinmembran von großer Bedeutung. Bei *knock-out* Mäusen, die weder Galactocerebroside noch Sulfatid synthetisieren können ist die Funktion der Myelinscheide gestört. Die Tiere leiden deutlich unter Neuropathien wie Tremor, Gleichgewichtsstörungen und Lähmung der hinteren Gliedmaßen im fortgeschrittenen Alter und die Mäuse sterben innerhalb der ersten Lebenswochen (Bosio et al., 1996; Coetzee et al., 1996). Generell resultieren Fehler im Lipidstoffwechsel oft in schweren neuropathologischen Störungen, wie z.B. bei der lysosomalen Speichererkrankung, der Metachromatischen Leukodystrophie. Ursache ist hier eine Mutation im Arylsulfatase A-Gen, welche zu einem Defekt im Sulfatid-Stoffwechsel und der damit verbundenen Anreicherung von Sulfatid in den Lysosomen führt. Störungen im Katabolismus der Sulfatide kommen hauptsächlich bei Zellen mit hohen metabolischen Umsatzraten, wie Oligodendrozyten oder Neuronen vor (Wendeler et al., 2000).

Myelin besitzt im Gegensatz zur Plasmamembran ein beschränktes Repertoire an charakteristischen Proteinen. Die Hauptmyelinproteine, das Proteolipid Protein (PLP) und das Myelin basische Protein (MBP) sind im kompakten Myelin lokalisiert und bilden zusammen 80 % des Gesamtproteins im Myelin (Arroyo and Scherer, 2000; Lees and Brostoff, 1984). MBP ist ein zytoplasmatisches, peripheres Membranprotein, das in mindestens vier Spleißvarianten vorkommt und ein Molekulargewicht von 14 - 21 kDa besitzt. Im ZNS ist MBP für die Strukturhaltung der *major dense line* erforderlich, indem es mit seinen positiven Ladungen an die negativ geladenen Lipide, v.a. die Phosphatidylserinreste bindet und die gegenüberliegenden Membranseiten zueinander führt (Abb. 2.2; Privat et al., 1979; Readhead et al., 1987).

Neben den Hauptmyelinproteinen PLP und MBP sind die nicht-kompaktierten Regionen mit spezifischen Proteinen wie OSP/Claudin 11, CNP, NF 155, MAG und MOG ausgestattet. OSP/Claudin 11 bildet physikalische Barrieren, sogenannte *Tight Junctions*, zwischen kompaktem und nicht-kompaktem Myelin (Gow et al., 1999; Morita et al., 1999). CNP (2',3'-cyklische Nukleotid 3'-Phosphodiesterase) ist über Isoprenylierung in der zytoplasmatischen Seite der Myelinmembran verankert und macht ca. 4 % der Gesamtmyelinproteine aus (Braun et al. 2004; Trapp et al., 1988). Zwar ist die Funktion von CNP relativ unklar, jedoch wird vor Beginn der Myelinisierung dessen Expression hochreguliert und bleibt lebenslang

2. Einleitung

aufrechterhalten, was auf eine wichtige Rolle für die Bildung und den Erhalt der Myelinmembran hindeutet (Scherer et al., 1994). Dazu konnte gezeigt werden, dass CNP eine wichtige Komponente der Zytoskelettmaschinerie darstellt, welche das Fortsatzwachstum in Oligodendrozyten ausrichtet (Lee et al., 2005). Zudem gibt es Hinweise, dass es die korrekte Lokalisierung von MBP in kompaktes Myelin unterstützt (Yin et al., 1997). Neurofascin 155 (NF155) ist u.a. für die Bildung der Paranodien verantwortlich, indem es über die Interaktion mit neuronalem F3/Contactin und Caspr, die glialen Schleifen mit der axonalen Membran verbindet (Sherman and Brophy, 2005; Tait et al., 2000).

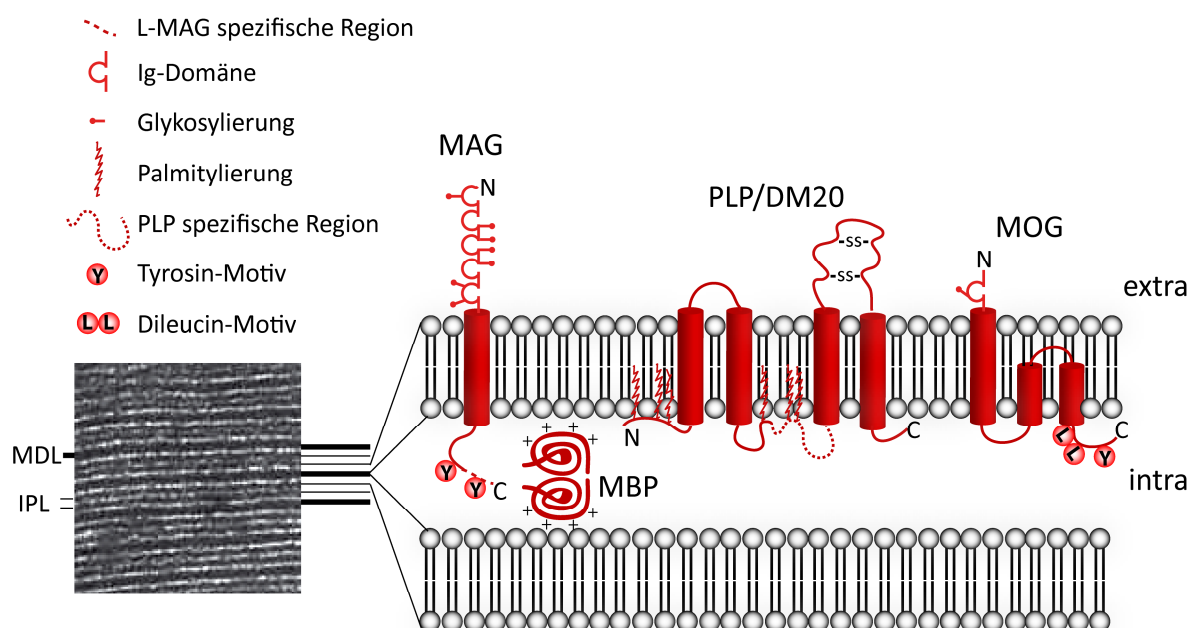


Abb. 2.2: Ultrastruktur des Myelins und schematische Darstellung ausgewählter Myelinproteine und ihrer Membrantopologie.

Links ist die charakteristische Ultrastruktur des kompakten Myelins dargestellt (aus Arroyo and Scherer, 2000). Durch Kompaktierung entsteht die *intraperiod line* (IPL), bestehend aus den aufeinanderliegenden extrazellulären Membranoberflächen und die *major dense line* (MDL), bestehend aus den zytoplasmatischen Membrannenseiten. Rechts sind ausgewählte Myelinproteine und ihre Topologie schematisch dargestellt.

2.2.2.1 Das Proteolipid Protein (PLP)

Das im kompakten Myelin lokalisierte PLP, stellt mit 50 % den Hauptanteil der Myelinproteine des ZNS. Durch alternatives Spleißen der mRNA des X-chromosomalen PLP1 Gens entsteht die um 35 Aminosäuren kürzere DM20 Isoform. Das Expressionslevel von DM20 im ZNS entspricht ca. 10 % dem von PLP (Garbern, 2005). PLP und DM20 sind hydrophobe Proteine mit vier Transmembrandomänen und einem Molekulargewicht von 26 kDa (PLP) bzw. 20 kDa (DM20). Desweiteren sind die Proteine über Palmitoylierung zusätzlich

2. Einleitung

in der Membran verankert. Über die genaue Funktion von PLP und DM20 ist relativ wenig bekannt; allerdings wurde gezeigt, dass es über die elektrostatischen Wechselwirkungen mit Myelinlipiden den 2,0 nm Abstand der *intraperiod line* im kompakten Myelin aufrechterhält (Griffiths et al., 1998a; Griffiths et al., 1998b).

Mutationen im PLP1 Gen lösen eine Reihe von X-chromosomal rezessiv vererbten Erkrankungen aus, wie z.B. die humane Pelizaeus Merzbacher Krankheit (PMD) und die Typ-2 Spastische Paraplegie, die phänotypisch und im klinischen Verlauf sehr heterogen sind (Duncan, 2005). Überraschenderweise führt das Fehlen von PLP/DM20 bei Mäusen und Menschen zu einem relativ milden Phänotyp. PLP *knock-out* Mäuse entwickeln sich bis zu einem Lebensalter von 15 Monaten normal und besitzen nur geringfügige Unterschiede in der Ultrastruktur der Myelinmembran. Die auffälligste Veränderung ist die spät auftretende, progressive Degeneration der Axone (Garbern et al., 2002; Griffiths et al., 1998b), die zu einer Schwächung der Extremitäten führt. PLP ist demnach weder für die Entwicklung noch für die Myelinisierung, jedoch für den Erhalt der axonalen Integrität zwingend notwendig. Die meisten PMD-Patienten besitzen Duplikationen des PLP1-Gens. Diese Beobachtung zusammen mit der Tatsache, dass die Duplikation des Gens bei transgenen Mäusen zu einer Überexpression von PLP und DM20 führt, weist stark daraufhin, dass ein zu hohes Expressionslevel die Ursache für den neurologischen Phänotyp sein könnte (Garbern, 2005). *In vitro* konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von PLP zu einer Anreicherung von PLP, Cholesterin und anderen Lipiden in lysosomalen Kompartimenten führt (Simons et al., 2002). Den am stärksten ausgeprägten neurologischen Phänotyp haben Patienten mit bestimmten *missense* Mutationen im PLP1-Gen. Eine C-terminale Verkürzung von PLP in *Jimpy* (JP) Mäusen (Macklin et al., 1987; Nave et al., 1987) und eine Punktmutation in *Jimpy*^{MSD} (MSD) Mäusen (Gencic and Hudson, 1990) verursacht die Fehlfaltung des Proteins und eine Akkumulation im rauen endoplasmatischen Retikulum (RER) (Gow et al., 1994; Gow et al., 1998). Die daraus resultierende Überladung des proteasomalen Systems mit mutiertem oder auch überexprimierten PLP führt zur Apoptose der Oligodendrozyten während der Myelinisierung (Kagawa et al., 1994; Readhead et al., 1994; Gow and Lazzarini, 1996; Southwood et al., 2002).

2.2.2.2 Das Myelin-assoziierte Glykoprotein (MAG)

MAG ist ein Typ 1 Transmembranprotein mit fünf Ig-Domänen. Es macht mit ca. 1 % einen relativ geringen Anteil der Myelinproteine aus. Durch alternatives Spleißen entstehen zwei Isoformen mit einem Molekulargewicht von 72 kDa (L-MAG) und 67 kDa (S-MAG), die sich in ihrer zytoplasmatischen Domäne unterscheiden. In den frühen Myelinisierungsstadien ist hauptsächlich L-MAG vorhanden, wohingegen beide Isoformen zu gleichen Teilen im reifen Myelin zu finden sind. Die Lokalisierung von MAG beschränkt sich im ZNS ausschließlich auf die periaxonale Membran (Sternberger et al., 1979; Trapp et al., 1989) und in geringen Mengen auf die Paranodien (Erb et al., 2006), was auf dessen Rolle bei der axo-glialen Interaktion hinweist.

Die Deletion von MAG in *knock-out* Mäusen führt zu einem relativ milden Phänotyp, jedoch zeigen sie dessen Notwendigkeit für den korrekten Ablauf der Myelinisierung sowie den Erhalt myelinisierter Axone (Quarles, 2007). MAG besitzt intra- und extrazelluläre Interaktionspartner, über die sowohl auf oligodendroglialer als auch auf neuronaler Seite Signaltransduktionskaskaden ausgelöst werden können. Auf oligodendroglialer Seite aktiviert L-MAG die Tyrosin-Kinase Fyn, die während der Entwicklung von Oligodendrozyten (Osterhout et al., 1999) und Myelinbildung eine wichtige Rolle spielt (Klein et al., 2002; Sperber et al., 2001; Umemori et al., 1994).

In vitro übernimmt MAG ambivalente Funktionen. Einerseits begünstigt es in der frühen Entwicklung das Axonwachstum junger Neurone (Dashiell et al., 2002; Johnson et al., 1989; Matsuda et al., 1996; Shimizu-Okabe et al., 2001; Turnley and Bartlett, 1998), zum Anderen inhibiert es das Wachstum und die Regeneration von Axonen aus dem adulten Nervensystem. Die Interaktionen von MAG, dem Oligodendrozyten Myelin Glykoprotein (Omgp) und Nogo mit dem neuronalen Nogo-66 Rezeptor (NgR) inhibieren die Regeneration von Neuronen *in vivo* und das Wachstum unreifer Neuriten *in vitro* (Domeniconi et al., 2002; Liu et al., 2002; Wang et al., 2002). Die Funktion in diesem Zusammenhang ist noch nicht eindeutig geklärt, jedoch könnte MAG die axonale Verzweigung verhindern, die das Umwinden der Axone während der Myelinisierung behindern würden.

2.2.2.3 Das Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein (MOG)

MOG ist ein 28 kDa großes glykosyliertes Typ 1 Transmembranprotein mit einer Ig-Domäne (Gardinier et al., 1992). Zusätzlich besitzt es eine hydrophobe Domäne, welche ausschließlich

die innere Lipidschicht durchspannt und von dem hydrophilen C-Terminus flankiert wird (Johns and Bernard, 1999). Zwar ist die Rolle von MOG als Autoantigen bei demyelinisierenden Erkrankungen, wie der Multiplen Sklerose gut untersucht (Lebar et al., 1979), allerdings ist dessen physiologische Funktion weitestgehend unklar. MOG *knock-out* Mäuse zeigen keinen Myelindefekt oder klinischen Phänotyp (Delarasse et al., 2003).

Obwohl MOG mit ca. 0,1 % nur einen sehr geringen Anteil der Myelinproteine ausmacht, ist es vorzugsweise an der abaxonalen Lamelle angereichert (Brunner et al., 1989). Dort ragt seine Ig-Domäne in die extrazelluläre Matrix oder zu benachbarten Axonen, wo sie mit potentiellen Liganden interagieren kann. Vermutlich vermittelt MOG als Zelloberflächenrezeptor Signale vom extrazellulären Milieu in das Innere des Oligodendrozyten oder der Myelinmembran (Marta et al., 2005; Marta et al., 2003). In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass MOG zusammen mit CNP in speziellen *Lipid Rafts* lokalisiert ist, die als Signalplattformen dienen (Kim and Pfeiffer, 1999).

2.2.3 Die Bildung von Myelin

Die Myelinisierung findet in den ersten Lebenswochen statt. Die Vorläuferzellen der Oligodendrozyten entstehen aus dem Neuroepithel der Subventrikularzone. Von dort aus wandern sie in die Regionen der späteren weißen Substanz, wo sie den Zellzyklus verlassen und schließlich zu myelinisierenden Oligodendrozyten differenzieren (Baumann and Pham-Dinh, 2001). Der Ablauf ihrer Differenzierung ist zeitlich und räumlich reguliert. Durch programmierten Zelltod werden überschüssige Oligodendrozyten entfernt, wodurch die Zahl der Oligodendrozyten der Anzahl und Länge der zu myelinisierenden Axone angepasst wird (Barres and Raff, 1999). Die zeitliche und räumliche Koordination der Myelinisierung wird durch bidirektionale Kommunikation zwischen Neuronen und Oligodendrozyten erlangt (Sherman and Brophy, 2005; Simons and Trajkovic, 2006).

Für die Entwicklung und das Überleben von Oligodendrozyten spielen viele intrinsische, sowie extrinsische Signalmoleküle eine entscheidende Rolle. Sowohl Astrozyten als auch Neurone setzen Wachstumsfaktoren frei, die die Entwicklung von Oligodendrozyten regulieren (Miller, 2002). Nach der Differenzierung der Oligodendrozyten Vorläuferzellen beginnt die Biogenese der Myelinmembran, die in vier Schritten erfolgt (Simons and Trajkovic, 2006):

1. Die Erkennung und Interaktion mit dem Ziel-Axon

2. Die Synthese und der Transport von Myelinkomponenten in Richtung Axon
3. Die Umwicklung des Axons
4. Die Kompaktierung der Myelinmembran

2.2.3.1 Die axo-gliale Interaktion

Die Myelinisierung erfolgt sehr spezifisch und ausschließlich an Axonen (nicht an Dendriten), die einen Durchmesser von $> 0,2 \mu\text{m}$ besitzen, wobei die Anzahl der Umwindungen proportional zum Axondurchmesser ist. Im PNS ist das axonale Zelloberflächenmolekül, NRG1 Typ III (ein Mitglied der Neuregulin-Familie) für die Wahl der zu myelinisierenden Neurone sowie die Dicke der Myelinschicht verantwortlich (Michailov et al., 2004). Dabei bestimmt die Anzahl an NRG1 Typ III Molekülen, ob ein Axon myelinisiert wird oder nicht, bzw. wie hoch das Ausmaß der Myelinisierung ausfällt. Im ZNS sind die Signalwege, die zur Myelinisierung spezifischer Axone führen noch ungeklärt. Wahrscheinlich spielt hier das Zusammenwirken mehrerer Zelladhäsionsmoleküle eine Rolle. So führt z.B. die Aktivierung des Notch Signalwegs über die Interaktion des von Oligodendrozyten exprimierten Notch 1 Rezeptors mit den axonalen Zelloberflächenproteinen Jagged 1 oder Contactin zur zeitlichen Regulierung der Myelinisierung (Genoud et al., 2002; Hu et al., 2003; Wang et al., 1998). Desweiteren konnte bei einem kürzlich beschriebenen Signalweg gezeigt werden, dass das oligodendrogliale Protein LINGO1 als negativer Regulator der oligodendroglialen Differenzierung und Myelinisierung agiert (Mi et al., 2005).

Nach der Kontaktaufnahme umwickelt der Oligodendrozyt mit Ausläufern seiner Plasmamembran mehrfach das Axon. Dabei ist die elektrische Aktivität der Neuronen für die ersten Phasen der Myelinisierung erforderlich (Demerens et al., 1996). Zum Einen führt sie zur Freisetzung myelinisierungsinduzierender Faktoren, wie z.B. von Neuronen abgegebenes Adenosin (Stevens et al., 2002) oder von Astrozyten freigesetzten *Leukemia Inhibitory Factor* (LIF) (Ishibashi et al., 2006). Zum Anderen führen die elektrischen Impulse zu einer Veränderung des Expressionsmusters axonaler Proteine (Coman et al., 2005). Dabei ist die Entfernung einiger Proteine, wie z.B. dem neuronalen Zelladhäsionsmolekül (NCAM) für den fortschreitenden Verlauf der Myelinisierung erforderlich (Charles et al., 2000). Die molekularen Mechanismen, über welche diese Faktoren die Bildung der Myelinmembran beeinflussen, sind unklar.

Eines der ersten Ereignisse, hervorgerufen durch die axo-gliale Interaktion, ist die

2. Einleitung

Umgestaltung der zunächst uniformen Axone zu hoch polarisierten Strukturen. Dabei sammeln sich die spannungsgesteuerten Na⁺-Kanäle an den Ranvierschen Schnürringen an wohingegen spannungsgesteuerte K⁺-Kanäle in der juxtaparnodalen Domäne des Axons aggregieren. Ein Proteinkomplex der paranodalen Verbindung trennt die Na⁺ und K⁺-Kanäle voneinander (Poliak and Peles, 2003; Salzer, 2003).

2.2.3.2 Der intrazelluläre Transport von Myelinkomponenten

Der Aufbau der komplexen Myelinmembran erfordert angepasste intrazelluläre Sortier- und Transportwege, über die die Myelinkomponenten von ihrem Syntheseort bis zu der wachsenden Myelinmembran transportiert werden (Krämer et al., 2001; Larocca and Rodriguez-Gabin, 2002). Dabei ist die exakte Bildung der Subdomänen für die Funktion der Myelinmembran ausschlaggebend. Über die molekularen Mechanismen, welche an der Regulation der Sortierung der Myelinkomponenten in die spezifischen Membrandomänen beteiligt sind, ist bisher relativ wenig bekannt.

Die Myelinkomponenten werden an verschiedenen subzellulären Orten synthetisiert und über unterschiedliche Mechanismen zur wachsenden Myelinmembran transportiert. Im Falle von MBP wird nicht das Protein selbst, sondern dessen mRNA im Perikaryon in speziellen Granula verpackt und zum Axon transportiert (Ainger et al., 1997; Barbarese et al., 1999; Farina and Singer, 2002). Am Zielort angekommen wird die mRNA aufgrund noch unbekannter Signale lokal translatiert und das Protein in die wachsende Myelinmembran integriert.

Integrale Membranproteine wie z.B. PLP, MAG und MOG werden hingegen am rauen endoplasmatischen Retikulum (rER) synthetisiert, im rER und Golgiapparat modifiziert und in Vesikeln zur Zielmembran transportiert. Da Oligodendrozyten während der Myelinisierung zu polarisierten Zellen reifen, liegt es nahe, dass die intrazellulären Transportwege denen der klassischen polaren Zellen ähneln (Mostov et al., 2003). Möglicherweise sortieren Oligodendrozyten analog zum Proteintransport in Epithelzellen (Kap.2.3.1), ihre Proteine zu den Subdomänen der Myelinmembran. Expressionsanalysen von PLP, MAG und MOG in polaren MDCK Zellen (*Mardin-Darby Canine Kidney*) zeigten, dass die Proteine tatsächlich Signalsequenzen für die Sortierung zur apikalen bzw. basolateralen Membrandomäne besitzen (Kroepfl and Gardinier, 2001a; Kroepfl and Gardinier, 2001b; Minuk and Braun, 1996). An der Sortierung von Myelinproteinen sind außerdem *Lipid Rafts* beteiligt. So

assoziiieren PLP sowie verschiedene andere Myelinproteine assoziieren im Golgi Apparat mit den Myelinlipiden (Galactocerebrosid und Sulfatid) und Cholesterin zu Membranmikrodomänen, die dann zum Myelin gelangen (Krämer et al., 1997; Krämer et al., 2001; Marta et al., 2003; Simons et al., 2002; Simons et al., 2000; Taylor et al., 2002).

Da PLP das häufigste Protein des kompakten Myelins darstellt, ist dessen Transport am besten untersucht. In Abwesenheit von Neuronen wird PLP in späten Endosomen/Lysosomen (LE/Lys) angereichert (Krämer et al., 2001; Trajkovic et al., 2006). Durch ein bisher unbekanntes, lösliches, neuronales Signal werden diese LE/Lys mobilisiert und fusionieren mit der Plasmamembran (Trajkovic et al., 2006). Über den Transport anderer Myelinproteine, wie auch MAG und MOG, ist hingegen bisher nicht viel bekannt.

2.3 Vesikeltransport und Membranbiogenese

2.3.1 Vesikeltransport in polaren Zellen

Zu den am genauesten charakterisierten polaren Zelltypen zählen Epithelzellen, die die inneren Organe und Körperhöhlen auskleiden. Die Plasmamembran der Epithelzellen ist in eine apikale und eine basolaterale Membrandomäne unterteilt, wobei die apikale Domäne zum Lumen der Organe weist und die basolaterale Domäne mit benachbarten Zellen und Geweben in Kontakt steht. Die beiden Membrandomänen sind über Proteinkomplexe, sogenannte *Tight junctions*, voneinander getrennt (Mellman and Warren, 2000; Mostov et al., 1992) und besitzen unterschiedliche Funktionen, was sich in ihrer jeweils charakteristischen Protein- und Lipidzusammensetzung widerspiegelt. Epithelzellen verwenden zwei grundlegende synthetische Transportwege, über die sie die jeweilige charakteristische biochemische Zusammensetzung der Membrandomänen gewährleisten. Einen direkten Weg (Weimbs et al., 1997) und einen indirekten Weg (Mostov et al., 2000). Beim direkten Weg werden apikale und basolaterale Proteine im *trans*-Golgi Netzwerk (TGN) in verschiedene Vesikel vorsortiert und direkt zur Zielmembran transportiert. Beim indirekten Weg werden alle Proteine vom TGN zur basolateralen Membran transportiert. Von dieser werden die für die apikale Membran bestimmten Bestandteile anschließend über Endozytose wieder entfernt und zur apikalen Domäne transzytiert. Auch basolateral bestimmte Proteine können endozytiert und recycelt werden. Ob die Proteine vom direkten oder indirekten Weg Gebrauch machen, variiert von Zelltyp zu Zelltyp und ist von ihrer

Struktur oder von spezifischen Aminosäuresequenzen (Sortiersignalen) abhängig. Zu den basolateral determinierenden Sequenzen zählen Tyrosin-basierte Sortiersignale wie z.B. YXXΦ (Φ kennzeichnet eine umfangreiche, hydrophobe Aminosäure), NPXY oder ein Dileucin-Motiv, die meist in der zytoplasmatischen Domäne lokalisiert sind (Matter and Mellman, 1994). Diese Sortiersignale begünstigen das Clustering der Proteine und die Bindung an spezifische Vesikel-assoziierte Adaptermoleküle (Folsch et al., 1999). Zu den apikalen Sortiersignalen zählen Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker (Simons and Ikonen, 1997) oder spezifische Eigenschaften der Transmembrandomänen (Barman and Nayak, 2000), die eine Organisation der entsprechenden Proteine mit Glykosphingolipiden und Cholesterin im TGN in so genannte *Lipid Rafts* begünstigen (Ikonen, 2001; Lisanti et al., 1990; van Meer, 1989) und den Transport zur apikalen Domäne ermöglichen. Zudem sind weitere transmembran und zytoplasmatisch lokalisierten Aminosäuren oder N- und O-verknüpfte Oligosaccharide für den apikalen Transport ausschlaggebend (Benting et al., 1999; Rodriguez-Boulán and Gonzalez, 1999).

2.3.2 Endozytose und Recycling

Endozytose spielt bei der Kontrolle der Lipid- und Proteinzusammensetzung der Plasmamembran und des Zellumfangs, der Regulation von Signalwegen sowie der Aufnahme von Nährstoffen und Pathogenen eine entscheidende Rolle (Dudu et al., 2004; Evans and Owen, 2002; Polo and Di Fiore, 2006). Endozytierte Moleküle werden entweder in den Lysosomen abgebaut oder recycelt (Maxfield and McGraw, 2004). Die Sortierung der aufgenommenen Komponenten kann entweder an der Plasmamembran, in den frühen Endosomen (*early endosomes/sorting endosomes* = EE/SE) oder in den späten Endosomen (*late endosomes* = LE) erfolgen.

An der Plasmamembran entscheidet sich zunächst, ob die Endozytose über Clathrin-abhängige, Clathrin-unabhängige Endozytose oder Phagozytose erfolgt (Abb. 2.3, siehe unten). Dies führt weiter zu der Ausbildung verschiedener Subpopulationen von frühen Endosomen, welche unterschiedliche Schicksale besitzen können.

In den frühen Endosomen findet die Sortierung in unterschiedlichen Subpopulationen oder in verschiedenen Membrandomänen innerhalb eines Endosoms statt (Gruenberg, 2001). Von dort werden Moleküle direkt oder indirekt über das Recycling Endosom (RE) (z.B. der Transferrin-Rezeptor) zur Plasmamembran zurück oder direkt zum TGN transportiert. Für

späte Endosomen vorgesehene Moleküle werden in speziellen Domänen der frühen Endosomen gesammelt, die zu multivesikulären späten Endosomen (MVBs) reifen (Perret et al., 2005).

Es existieren verschiedene Subpopulationen später Endosomen, die spezialisierte Membrandomänen mit tubulärer, zisternenartiger, multivesikulärer oder multilamellarer Morphologie und unterschiedlicher Protein- und Lipidzusammensetzung besitzen. Von den späten Endosomen schnüren sich Vesikel ab, in denen Moleküle zurück zum TGN transportiert werden. Anschließend können MVBs mit Lysosomen fusionieren oder transient über *kiss and run* miteinander interagieren, wodurch für den Abbau bestimmte Proteine das Lysosom erreichen. Alternativ dienen späte Endosomen und Lysosomen verwandte Organellen (LROs – *lysosome related organelles*) als reguliert oder konstitutiv sekretorische Kompartimente, die mit der Plasmamembran fusionieren und ihren Inhalt in den Extrazellulärraum freisetzen oder Membrankomponenten in die Plasmamembran einbauen (Arantes and Andrews, 2006; Reddy et al., 2001; Stinchcombe et al., 2004).

2.3.2.1 Clathrin-vermittelte Endozytose

Die Clathrin-vermittelte Endozytose erfolgt an spezialisierten Regionen der Plasmamembran, den sogenannten *Clathrin-coated pits* (CCPs)(Abb. 2.3: 1). Sie erfordert ein Netzwerk von Faktoren, die sequentiell rekrutiert und aktiviert werden. Adapterproteine initialisieren diesen Prozess über zwei Wege: Zum Einen wählen sie die zu transportierenden Moleküle an der Plasmamembran aus, zum Anderen rekrutieren sie die Clathrinhülle und andere für die Form und Funktion der Vesikel verantwortlichen Komponenten (Evans and Owen, 2002; Maldonado-Baez and Wendland, 2006). Anschließend schnürt sich das Vesikel von der Plasmamembran ab und fusioniert mit frühen Endosomen, in denen die zu transportierenden Moleküle weiter sortiert werden. Die Energie für die Abschnürung der Vesikel liefert die Aktivität der GTPase Dynamin. Die Clathrin-abhängige Endozytose ist sowohl für die Rezeptor-vermittelte Aufnahme wichtiger Transportproteine, wie LDL (*low density lipoprotein*) und Transferrin, als auch für die Aufnahme von Wachstumsfaktoren und Peptidhormonen verantwortlich.

2.3.2.2 Clathrin-unabhängige Endozytose

Bei *Lipid Rafts* handelt es sich um hoch organisierte Mikrodomänen einer Membran, die sich durch die Interaktion von Cholesterin und Sphingolipiden bilden und als Sortier- und

2. Einleitung

Signalplattformen dienen (Brown and London, 1998; Simons and Toomre, 2000). Die Rekrutierung bestimmter Moleküle in *Lipid Rafts* ermöglicht deren Endozytose über Clathrin-unabhängige Mechanismen, die sich weiter in einen Caveolae-abhängigen Weg und in Caveolae-unabhängige Wege unterteilen lassen (Kirkham and Parton, 2005; Pelkmans, 2005). Als Caveolae wird eine spezielle Form der *Lipid Raft* Mikrodomänen bezeichnet. Morphologisch betrachtet handelt es sich dabei um leichte Invaginationen der Plasmamembran, die durch das Strukturprotein Caveolin gebildet werden (Stan, 2005). Im Gegensatz zur dynamischen Assoziation von Clathrin mit der Plasmamembran, ist Caveolin über seine direkte Bindung an Cholesterin, stabil mit der Plasmamembran assoziiert und bildet uniforme Transportplattformen, die sich nach Erhalt eines Signals Dynamin-vermittelt von der Plasmamembran abschnüren (Abb. 2.3, 2a).

Mit einigen Ausnahmen sind die bisher beschriebenen Caveolae-unabhängigen Mechanismen, die sogenannten *Clathrin-independent Carriers* (CLICs, Abb. 2.3: 2c) und die Makropinozytose (MP, Abb. 2.3: 2d) von Dynamin unabhängig. Hier führt vermutlich die Eigenschaft der *Lipid Rafts* selbst zum Abschnüren der Vesikel.

Möglicherweise liegt allen *Lipid Raft*-abhängigen Endozytosewegen ein einziger Mechanismus zugrunde, der in den verschiedenen Wegen und Zelltypen durch eine Variation an Faktoren unterschiedlich reguliert wird (Kirkham and Parton, 2005).

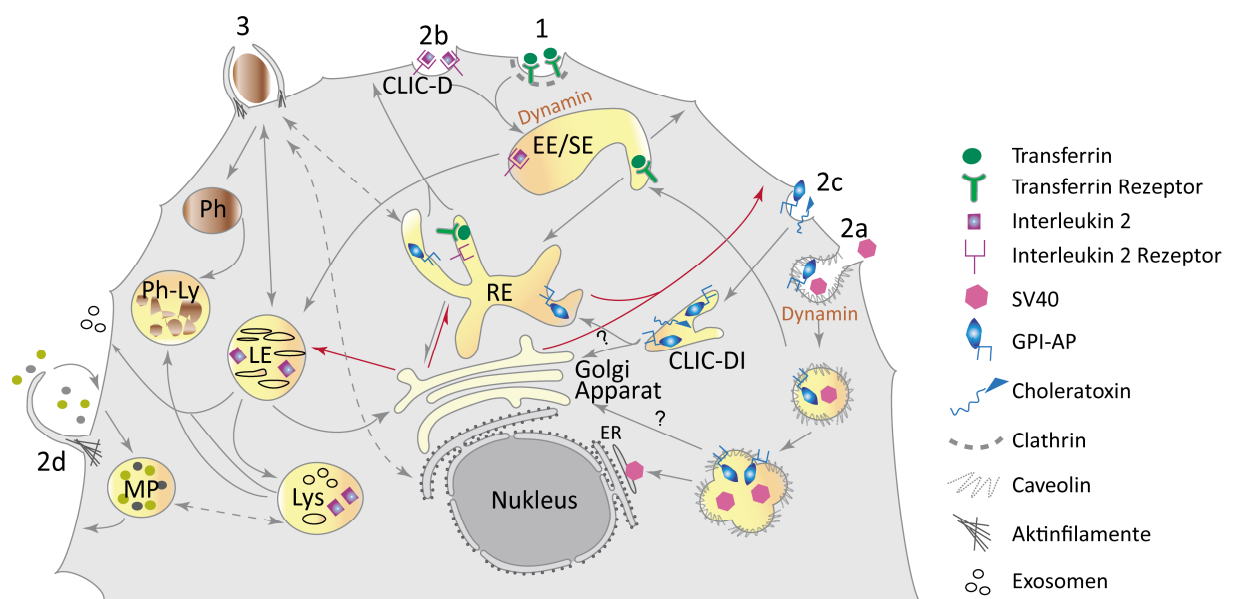


Abb. 2.3: Schematische Darstellung des endosomalen Systems.

(1) Clathrin-abhängige Endozytose. (2) Clathrin-unabhängige Endozytose Mechanismen: (2a) Caveolae, (2b) Dynamin-abhängig (CLIC-D – *Clathrin-independent Carrier* – *Dynamin*) (2c) Dynamin-unabhängig (CLIC-DI – *Clathrin-independent Carrier* – *Dynamin-independent*), (2d) Makropinozytose (MP). (3) Phagozytose (Ph). Modifiziert nach (Perret et al., 2005).

2.3.3 Endosomales Recycling und Zellmorphogenese

Die Morphogenese einer Zelle spielt während ihrer Differenzierung, der Reaktion auf physiologische Stimuli sowie ihrer Beweglichkeit eine fundamentale Rolle. Während der Morphogenese verändert sich meistens die Größe der Zelloberfläche. Zudem wird die Zelle von einer Umgestaltung ihrer Form und Membransysteme begleitet, die in Polarität resultiert. Hierbei spielen der Transport von Proteinen und Lipiden zu speziellen Orten der Plasmamembran und die Reorganisation des Zytoskeletts eine entscheidende Rolle. Neben den klassischen Studien an isolierten Zellen zeigen Transportanalysen von Proteinen *in vivo*, dass neben dem sekretorischen Transportweg, Endozytose und Recycling für die Morphogenese einer Zelle von großer Bedeutung sind. Dazu zählen beispielsweise die Biogenese der Membrandomänen polarisierter Epithelzellen, das Neuritenwachstum und der gerichtete axonale Transport in Neuronen, die Regulation des Zellumfangs während der Mitose sowie die rapide Ausdehnung von Lamellipodien in sich fortbewegenden Zellen (Alberts and Galli, 2003; Boucrot and Kirchhausen, 2007; Bretscher and Aguado-Velasco, 1998; Lecuit and Pilot, 2003; Perret et al., 2005; Wisco et al., 2003). Gerichtetes Recycling über endosomale Kompartimente ermöglicht hierbei die effiziente und schnelle Mobilisierung von Membranreservoirs zu speziellen Regionen der Plasmamembran.

2.3.4 Sekretorische Lysosomen bzw. Lysosomen-verwandte Organellen (LROs)

Lysosomen repräsentieren den Endpunkt des endosomalen Systems, wo > 40 saure Hydrolasen die katabolische Funktion der Zellen bei einem pH von 4,6 - 5 ausüben. Einige Zelltypen enthalten spezialisierte lysosomale Organellen, die ihren Inhalt als Reaktion auf externe Stimuli, Ca^{2+} -abhängig in die extrazelluläre Umgebung freisetzen (Stinchcombe and Griffiths, 1999). Diese Organellen werden allgemein als sekretorische Lysosomen oder Lysosomen-verwandte Organellen (LROs = *lysosome-related organelles*) bezeichnet. Dazu zählen unter anderem Melanosomen, lysosomale Granula, *Major Histocompatibility Class* (MHC) II Kompartimente, dense Granula, basophile Granula und azurophile Granula (Dell'Angelica et al., 2000). Dabei handelt es sich bei sekretorischen Lysosomen entweder um eine bestimmte Subpopulation von Organellen, wie z.B. bei Neutrophilen oder aber sie sind von den konventionellen Lysosomen nicht zu unterscheiden, wie z.B. bei den zytotoxischen T Lymphozyten. Sekretorische Lysosomen übernehmen in verschiedenen Zelltypen eine Vielfalt an Funktionen. Zytotoxische T-Zellen und natürliche Killerzellen sezernieren

2. Einleitung

beispielsweise das für die Initiation des Zelltods verantwortliche Poren formende Protein Perforin über sekretorische Lysosomen. Basophile und Mastzellen sezernieren Histamine und Antigen präsentierende Zellen degradieren und prozessieren endozytiertes Material, um die MHCII Moleküle mit Antigenen in LROs zu beladen und freizusetzen.

Außerhalb des Immunsystems machen z.B. Melanozyten, Thrombozyten und Spermatozoen für die Sekretion von Molekülen, von LROs Gebrauch (Stinchcombe et al., 2004). So handelt es sich bei Melanosomen um LROs, die das für die Pigmentierung der Haut, Haare und Nägel verantwortliche Melanin sezernieren.

Auch in nichtsekretorischen Zellen erfolgt die Fusion von Lysosomen mit der Plasmamembran über einen Ca^{2+} -gesteuerten Mechanismus (Jaiswal et al., 2002). In Fibroblasten trägt beispielsweise die Exozytose der membranreichen Lysosomen, nach Beschädigung der Plasmamembran und dem darauffolgenden Einstrom von extrazellulärem Ca^{2+} zur Wundheilung bei (Reddy et al., 2001). Desweiteren ist die Ca^{2+} -abhängige Exozytose von Lysosomen am Neuritenwachstum beteiligt (Arantes and Andrews, 2006).

2.3.5 Exosomen

Neben der Sekretion von löslichen Molekülen bzw. dem Einbau von Membranbestandteilen in die Plasmamembran können durch die Exozytose von späten Endosomen (MVBs) auch die im MVB Lumen enthaltenen Vesikel in den extrazellulären Raum freigesetzt werden. In diesem Fall werden die freigesetzten Vesikel als Exosomen bezeichnet (Keller et al., 2006; Thery et al., 2002). Viele Zelltypen, wie z.B. Retikulozyten, B- und T-Lymphozyten, dendritische Zellen, Mastzellen, Neuronen, Tumorzellen und Epithelzellen setzen *in vitro* Exosomen frei. Jedoch können Exosomen auch *in vivo* in verschiedenen Körperflüssigkeiten wie z.B. im Blut oder Urin nachgewiesen werden. Einige Studien weisen daraufhin, dass Exosomen bei der Entwicklung eine Rolle spielen. So wird beispielsweise während der Embryonalentwicklung von *Drosophila*, über sogenannte Argosomen, ein Morphogengradient des Proteins Wingless freigesetzt (Greco et al., 2001). Im Immunsystem sowie bei Krebs sind Exosomen an der interzellulären Kommunikation beteiligt (Denzler et al., 2000; Fevrier and Raposo, 2004; Keller et al., 2006). Hier tragen Exosomen beispielsweise zu der Präsentation von Antigenen oder zu der Entwicklung der Immuntoleranz bei. Interessanterweise zeigt eine neue Studie den Transfer von mRNA (mRNA und miRNA) über

Exosomen, was die Komplexität der Kommunikation zwischen den Zellen erhöht (Valadi et al., 2007).

2.4 Fragestellung der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war die Aufklärung der Transportwege von Myelinkomponenten, die zur Ausbildung der Subdomänen der Myelinmembran führen. Dabei wurden hauptsächlich Transportanalysen der Myelinproteine PLP, MAG und MOG durchgeführt. Da diese Proteine in drei unterschiedlichen Subdomänen der Myelinmembran lokalisiert sind, stellte sich die Frage, ob gemeinsame oder unterschiedliche Transportwege am Aufbau der Subdomänen beteiligt sind. Da das Hauptmyelinprotein PLP in LE/Lys angereichert ist, sollte untersucht werden, ob Endozytose generell an der Sortierung von Myelinproteinen beteiligt ist.

Desweiteren sollte geklärt werden, ob es sich bei den mit PLP angereicherten LE/Lys um sogenannte Lysosomen-verwandte Organellen (LROs) handelt, die nach einem regulierten, Ca^{2+} -abhängigen Mechanismus mit der Plasmamembran fusionieren. Um diese Hypothese zu testen, sollte der Einfluss von Ca^{2+} -Ionophoren auf das Transportverhalten von PLP analysiert werden.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

Tabelle 3.1: Verwendete Materialien, Software, Chemikalien, Enzyme und Kits

Software	
Aida Image Analyzer v.3.28	Raytest GmbH, Straubenhardt
Amira 3.0	Mercury Computer Inc., Düsseldorf
Clonemanager 7.01	Scientific & Educational Software, Cary (NC)
Image J	NIH, Bethesda, Maryland
Image Pro Plus 4.5	Media Cybernetics, Gleichen
Photoshop CS2	Adobe, München
Sigma Plot 9	Systat Software GmbH, Erkrath
Geräte + Zubehör	
<i>Cellcracker</i>	Isobiotech, Heidelberg
Elektrophoresekammer	Biorad, München
Elektrophoresekammer	Sigma-Aldrich, München
Elektrophoresekammer, NuPAGE	Invitrogen, Karlsruhe
Gene Pulser	Biorad, München
Glaswaren	VWR, Darmstadt
Transfermembranen, Hybond-P	GE Healthcare, München
Transfermembranen, Immobilon	Millipore, Schwalbach
"N ₂ -Bombe"	Parr Instruments, Frankfurt am Main
Nucleofector II	Amaza, Köln
PCR Maschine, T3 Thermocycler	Biometra, Göttingen
Photospectrometer Ultrospect 2100 pro	GE Healthcare, München
Plastikwaren	Falcon, Heidelberg; Nunc, Wiesbaden; Sarstedt, Nümbrecht
Mikroskope + Zubehör	
EM Leo 912AB	Zeiss, Jena
IX70	Olympus, Hamburg
TCS SP1	Leica, Wetzlar
TCS SP5	Leica, Wetzlar
Röntgenentwickler + Zubehör	
Optimax X-Ray Filmprocessor	MS Laborgeräte, Wiesloch
Röntgenfilme, Hyperfilm ECL	GE Healthcare, München
Citroline 2000 Entwicklerkonzentrat	Adefo, Dietzenbach
Adefofix Fixiererkonzentrat	Adefo, Dietzenbach
Zentrifugen + Zubehör	
Biofuge <i>fresco</i>	Heraeus, Hanau
Megafuge 1.0 R	Heraeus, Hanau
Ultrazentrifuge Optima MAX-E	Beckman, München
Rotoren (SW 40, TLA 55, TLS 55)	Beckman, München

3. Material und Methoden

Röhrchen (SW 40, TLA 55, TLS 55)	Beranek Laborgeräte, Weinheim
Chemikalien	
Biotin	Pierce, Bonn
Calcimycin	Sigma-Aldrich, München
Filipin III	Sigma-Aldrich, München
Fugene 6	Roche, Mannheim
Ionomycin-Ca ²⁺	Calbiochem, Merck, Darmstadt
Lipofectamine 2000 Reagent	Invitrogen, Karlsruhe
LysoTracker-Red DND-99	Molecular Probes, Karlsruhe
Neutravidin-Sepharose	Pierce, Bonn
Transferrin-alexa594,-FITC	Molecular Probes, Karlsruhe
Streptavidin-alexa546, FITC, Cy5	Molecular Probes, Karlsruhe
Streptavidin-HRP	Vector Laboratories, Burlingame, CA
Streptavidin-Sepharose	Vector Laboratories, Burlingame, CA
sonstige Chemikalien	Merck, Darmstadt Roth, Karlsruhe Sigma-Aldrich, München
Kits	
Qiagen Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
Wizard® Plus SV Miniprep DNA Purification System	Promega, Mannheim
QIAquick gel extraction kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR purification kit	Qiagen, Hilden
SuperSignal® West Pico Chemilumineszenz Substrat	Pierce, Bonn
Enzyme	
Restriktionsenzyme	NEB, Frankfurt am Main
PFU taq-Polymerase	Quiagen, Hilden
VENT taq-Polymerase	NEB, Frankfurt am Main
Marker	
BenchMark Pre-stained Western Protein Standard	Invitrogen, Karlsruhe
MagicMark XP Western Protein Standard	Invitrogen, Karlsruhe
SeeBlue Pre-stained Western Protein Standard	Invitrogen, Karlsruhe
SigmaMarker Western Protein Standard	Sigma-Aldrich, München

3. Material und Methoden

3.2 Puffer und Nährmedien

Puffer und Nährmedien wurden wie folgt in H₂O_{dd} angesetzt.

Tabelle 3.2: Verwendete Puffer und Nährmedien

Allgemeine Puffer	
PBS (Phosphate-Buffered Saline, pH 7,4)	150 mM NaCl 8 mM Na ₂ HPO ₄ 1,7 mM NaH ₂ PO ₄
TBS (Tris-Buffered Saline, pH 7,4)	50 mM Tris 150 mM NaCl
Zellkultur	
Einfriermedium	70 % RPMI 1640 20 % FCS 10 % DMSO
10 x Poly-L-Lysin	H ₂ O _{dd} 0,1 % PLL
Sato/1 % Pferdeserum (Oli-neu)	13,4 g/l DMEM 2 g/l NaHCO ₃ 0,01 g/l Transferrin 100 µg/l Insulin (Stock 10 µg/ml) 100 µM Putreszin 200 nM Progesteron 500 nM TIT 220 nM Na-Selenit 520 mM L-Thyroxin 0,05 % Gentamycin 1 % Pferdeserum
Sato/B27/ 1 % Pferdeserum (primäre Oligodendrozyten)	13,4 g/l DMEM 2 g/l NaHCO ₃ 20 ml/l B27 Zusatz 0,011 % Pyruvat 500 nM TIT 520 mM L-Thyroxin 0,05 % Gentamycin 1 % Pferdeserum
Trypsin/EDTA	HBSS ⁻ 0,01% Trypsin (Stock: 1 % in HBSS ⁻) 0,02 % EDTA (Stock: 0,2 % in HBSS ⁻)
Biochemie	
Blockierlösung (Western)	PBST 4 % Milchpulver
Coomassie-Entfärbelösung	10 % Ethanol 7,5 % Essigsäure
Coomassie-Färbelösung	0,1 % Coomassie Brilliant Blue R-250 40 % Ethanol 10 % Essigsäure

3. Material und Methoden

ECL-Lösung	Lösung A: 200 ml 0,1 M Tris-HCl, pH 8,6 50 mg Luminol (4°C) Lösung B: 11 mg <i>para-hydroxy coumaric acid</i> Entwicklung: 1ml A + 100 µl B + 0,3 µl H ₂ O ₂
Elektrophoresepuffer 20 x Bis-Glycin NuPAGE® MES	50 mM MES 50 mM Tris 0,1% SDS 1 mM EDTA pH 7,3
Elektrophoresepuffer 20 x Bis-Glycin NuPAGE® MOPS	50 mM MOPS 50 mM Tris 0,1% SDS 1 mM EDTA pH 7.7
5 x Elektrophoresepuffer Tris-Glycin	125 mM Tris 1,25 M Glycin 0,5 % (w/v) SDS pH 8,3
HBSS ⁺	500 ml HBSS + 7,5 ml MgSO ₄ (Stock: 10%)
Mowiol	2,4 g Mowiol 4-88 6 g Glycerin 6 ml H ₂ O _{dd} 12 ml 0,2 M Tris, pH 8,5
PBST (PBS/Tween 20)	1 x PBS 1 % Tween 20
Ponceau S	2 % Ponceau S 30 % Trichloressigsäure 30 % Sulfosalicylsäure
RIPA-Puffer	10 mM Tris, pH 7,5 150 mM NaCl 1 % Nonident P40 0,5 % Na-Deoxycholat 0,1 % SDS 2 mM EDTA 1 mM PMSF 1 µg/ml Aprotinin 1 µg/ml Leupeptin
Sammelgel-Puffer	1 M Tris, pH 6,8
4 x SDS Probenpuffer	200 mM Tris-Cl, pH 6,8 (400 mM DTT) 8 % (w/v) SDS (Elektrophoresegrad) 0,4 % Bromphenolblau 40 % (v/v) Glycerin

3. Material und Methoden

Strip-Puffer	0,2 M HCl pH 2,0/1M Glycin
Transferpuffer (<i>Semi-Dry</i>)	24 mM Tris 192 mM Glycin 20 % Methanol od. Ethanol
Transferpuffer (<i>Wet-Blot</i>), pH 7,2 20 x NuPAGE®	25 mM Bicine 25 mM Bis-Tris 1 mM EDTA 10 % (pro Gel) Methanol od. Ethanol
Trenngel-Puffer	1 M Tris, pH 8,8
Triton X-100 Lysis-Puffer	1 x PBS, pH 7,5 1 % Triton X-100 2 mM EDTA 1 mM PMSF 1 µg/ml Aprotinin 1 µg/ml Leupeptin
Molekularbiologie	
LB-Medium	10 g/l NaCl 10 g/l Trypton 5 g/l Hefeextrakt
LB-Agar	2,25 g Agar 150 ml LB-Medium
Probenpuffer für Agarose-Gele	1 % Bromphenolblau 2 % Xylencyanol 1 mM EDTA 0,5 % Saccharose
TAE (Tris/Acetic Acid/EDTA)	40 mM Tris 1 mM EDTA mit Essigsäure auf pH 8,0
Elektronenmikroskopie	
Fixierlösung für Immuno-EM	4 % Formaldehyd 0,2 % Glutaraldehyd in 0,1 M Phosphatpuffer
Fixierlösung für Morphologie	4 % Formaldehyd 2,5 % Glutaraldehyd in 0,1 M Phosphatpuffer
Phosphatpuffer (0,2 M, pH 7,4)	Stocklsg. A + B im Verhältnis 1:4
Stocklösung A	2,76 g NaH ₂ PO ₄ , ad 100 ml ddH ₂ O
Stocklösung B	3,56 g Na ₂ HPO ₄ , ad 100 ml ddH ₂ O

3. Material und Methoden

Lebendzellmikroskopie	
HANKS-Medium	200 ml HBSS 2,2 ml nichtessentielle Aminosäuren (100 x) 4,5 ml essentielle Aminosäuren (50 x) 2,2 ml PenStrep 11,2 ml FCS od. HS 1 ml N-Acetyl-L-Cystein (Stock: 1 M) pH 7,4 (NaOH) 25 mM Hepes

3.3 Antikörper

3.3.1 Primärantikörper

Tabelle 3.3: Primärantikörper

Antigen	Klon	Spezies	Verdünnung	Herkunft
58 K	58K-9	Maus	1:5000 (WB); 1:50 (IF)	Sigma-Aldrich
Bip	40	Maus	1:250 (WB); 1:50 (IF)	BD Biosciences
Calnexin		Kaninchen	1:2000 (WB); 1:200 (IF)	Stressgen
Calreticulin		Kaninchen	1:2000 (WB); 1:100 (IF)	Stressgen
Cathepsin D		Kaninchen	1:1000 (WB); 1:200 (IF)	Wako
Caveolin		Kaninchen	1:5000 (WB); 1:500 (IF)	BD Biosciences
Caveolin	C060	Maus	1:500 (WB); 1:50 (IF)	BD Biosciences
Clathrin HC	23	Maus	1:1000 (WB); 1:100 (IF)	BD Biosciences
Flotillin-1	18	Maus	1:250 (WB), 1:50 (IF)	BD Biosciences
GM130	35	Maus	1:250 (WB); 1:50 (IF)	BD Biosciences
LAMP1	1D4B	Ratte	1:500 (WB); 1:50 (IF)	BD Biosciences
LAMP2	ABL-93	Ratte	1:500 (WB); 1:50 (IF)	BD Biosciences
MAG	513	Maus	1:500 (WB); 1:50 (IF)	J. Trotter, Mainz
MOG	8-18-C5	Maus	1:1000 (WB); 1:200 (IF)	C. Linington, Aberdeen
Myc-tag		Kaninchen	1:100 (IF)	Cell Signaling
NaK-ATPase	464.6	Maus	1:5000 (WB)	Novus Biologicals
NG2/AN2	AN2	Ratte	1:200 (WB), 1:20 (IF)	J. Trotter, Mainz
OSP/Claudin11		Kaninchen	1:1500 (WB)	J. Bronstein, Los Angeles
PLP	O10	Maus	unverdünnt (IF)	M. Schachner, Hamburg
	3F4	Maus	1:10 (WB); 1:20 (IF)	K.-A. Nave, Göttingen
	A431	Kaninchen	1:250 (IF)	K.-A. Nave, Göttingen
	P6	Kaninchen	1:5000 (WB); 1:500 (IF)	C. Linington, Aberdeen
	aa3	Ratte	1:10 (WB), 1:20 (IF)	M.B. Lees,

3. Material und Methoden

				Waltham, MA
SCAMP		Kaninchen	1:2000 (WB); 1:200 (IF)	Synaptic Systems
SNAP-23		Kaninchen	1:1000 (WB); 1:100 (IF)	Synaptic Systems
SNAP-29		Kaninchen	1:1000 (WB); 1:100 (IF)	Synaptic Systems
Syntaxin 2		Kaninchen	1:5000 (WB), 1:500 (IF)	Synaptic Systems
Syntaxin 3		Kaninchen	1:1000 (WB), 1:100 (IF)	Synaptic Systems
Syntaxin 4		Kaninchen	1:5000 (WB); 1:500 (IF)	Synaptic Systems
Syntaxin 6		Kaninchen	1:5000 (WB), 1:500 (IF)	Synaptic Systems
Syntaxin 6	30	Maus	1:5000 (WB), 1:500 (IF)	BD Biosciences
Syntaxin 7		Kaninchen	1:1000 (WB); 1:100 (IF)	Synaptic Systems
Syntaxin 8		Kaninchen	1:1000 (WB); 1:100 (IF)	Synaptic Systems
Syntaxin 13		Kaninchen	1:2000 (WB); 1:200 (IF)	Synaptic Systems
Syntaxin 16		Kaninchen	1:1000 (WB); 1:100 (IF)	Synaptic Systems
TfR	H68.4	Maus	1:500 (WB), 1:50 (IF)	Zymed
Tubulin	DM 1A	Maus	1:5000 (WB), 1:500 (IF)	Sigma-Aldrich
VAMP2	CI 69.1	Maus	1:10000 (WB); 1:1000 (IF)	Synaptic Systems
VAMP4		Kaninchen	1:1000 (WB); 1:100 (IF)	Synaptic Systems

WB = Western-Blot, IF = Immunfluoreszenz

3.3.2 Sekundärantikörper

Tabelle 3.4: Sekundärantikörper

Antikörper gegen	Spezies	Konjugat	Verdünnung
Maus	Ziege	HRP	1:10.000
Maus spez.			1:5000
Ratte			1:10.000
Ratte spez.			1:5000
Kaninchen			1:10.000
Maus	Ziege	Cy3	1:1000
Maus spez.	Ziege	Cy2	1:100
Ratte	Ziege	Cy3	1:1000
Ratte spez.	Ziege	Cy3	1:1000
Ratte spez.	Ziege	Cy5	1:100
Kaninchen	Ziege	Cy3	1:1000
Kaninchen	Esel	Cy2	1:100
Ziege	Kaninchen	Cy5	1:100
Ziege	Kaninchen	Cy5	1:100
Ziege	Esel	Cy2	1:100

Alle Sekundärantikörper wurden von der Firma Dianova, Hamburg bezogen.

3.4 Fluoreszierende Marker

Tabelle 3.5: Fluoreszierende Marker

Marker	Markierung von	Konjugat	Verdünnung
LysoTracker	Lysosomen	Red DND-99	75 nM
Phalloidin	F-Aktin	FITC	1:300
Streptavidin	biotinylierte Proteine	alexa546, Cy5	1:200
Transferrin	Recycling Endosomen, Clathrin-abhängige Endozytose	FITC, alexa594	30 µg/ml

3.5 Plasmide

Tabelle 3.6: Plasmide

Plasmid	Resistenz	Herkunft
hCgB-EGFP	Ampicillin	H.-H. Gerdes, Bergen, Norwegen
hCgB-GFP(S65T)	Kanamycin	H.-H. Gerdes, Bergen, Norwegen
PLP-EGFP	Kanamycin	K.-A. Nave, Göttingen, Deutschland
pCMV-wtPLP	Ampicillin	K.-A. Nave, Göttingen, Deutschland
pcDNA1.1-S-/L-MAG	Ampicillin	S. Kelm, Bremen, Deutschland
pCMV-S-/L-MAG-EGFP	Ampicillin	N. Schären-Wiemers, Basel, Schweiz
pCDNA3.1-MOG	Ampicillin	C. Linington, Aberdeen, Schottland
AP180C-myc	Ampicillin	H.T. McMahon, Cambridge, England

3.6 Zellkultur

3.6.1 Präparation primärer Oligodendrozyten und gemischter Gehirnkulturen

Die Primärkulturen wurden aus E14 - E16 Mäusen gewonnen. Nach Entnahme der Gehirne, wurden die Gehirnhäute entfernt, die Gehirne für 1 min in 1 % Trypsin, HBSS⁻ inkubiert und zweimal mit HBSS⁺ gewaschen. Nach Zugabe von 0,05 % DNase, wurden die Gehirne mit Hilfe von 3 - 4 Pasteurpipetten unterschiedlichen Durchmessers (ganz, halb zugeschmolzen, ausgezogen, abgebrochen) zu einer Einzelzellsuspension dissoziiert. Die Zellen wurden zweimal mit HBSS⁺ gewaschen und für 10 min mit 130 x g bei 4°C abzentrifugiert. Für die Präparation primärer Oligodendrozyten wurde das Zellpellet in DMEM, 10 % Pferdeserum (HS) resuspendiert, 3 – 3,5 x 10⁷ Zellen pro Kulturflasche (250 ml Volumeninhalt) ausplattiert und in DMEM, 10 % HS kultiviert.

3.6.1.1 Gemischte Gehirnkulturen

Für Versuche mit gemischten Gehirnkulturen wurden die pelletierten Zellen (siehe oben) auf mit PLL beschichtete Kulturträger ausplattiert (Tabelle 3.7) und in Sato/B27/1 % HS kultiviert. Zur Gewinnung des Kulturüberstandes, wurden ca. 50.000 Zellen/cm² ausplattiert und in Sato/B27/1 % HS kultiviert (Trajkovic et al., 2006). Nach zwei Wochen wurde der Kulturüberstand abgenommen und bei -80°C gelagert.

Tabelle 3.7: Kulturträger und entsprechend ausplattierte Zellzahl der Mischkulturen

Kulturträger Ø	Zellzahl
10 cm bzw. 250 ml Flasche	3 - 3,5 x 10 ⁷
6 cm	1,5 x 10 ⁷
3,5 cm	7,5 x 10 ⁶
16 mm	2 x 10 ⁵
11 mm	1,5 x 10 ⁴

3.6.1.2 Neuronenkill und Abklopfen der Makrophagen

5 Tage nach der Primärzellpräparation wurden die Neurone durch Immunzytolyse entfernt. Die Zellen wurden für 1 - 3 h mit dem monoklonalen Antikörper M5 (358 Hybridomaüberstand, 1:10 verdünnt) und Meerschweinchenkomplement bei 37°C inkubiert, 2 x mit DMEM/10 % HS gewaschen und in DMEM/10 % HS/0,5 µg/ml Insulin weiter kultiviert. Nach 2 Tagen wurde ein halber Mediumwechsel durchgeführt.

Nach weiteren 4 Tagen wurden die Makrophagen durch leichtes Klopfen gegen die Kulturflaschen abgelöst und mit DMEM/10 % HS abgewaschen.

3.6.1.3 Oligodendrozyten-Shake

3 Tage nach dem Entfernen der Makrophagen wurden die Oligodendrozyten durch vertikales Schütteln der Kulturflaschen (ca. 30 x) von den restlichen Zellen abgelöst, für 10 min bei 130 x g und 4°C abzentrifugiert, in Sato/B27/1 % HS/0,01 µg/ml PDGF/0,005 µg/ml FGF resuspendiert, mit der entsprechenden Zellzahl auf mit PLL beschichtete Kulturträger ausplattiert und in Sato/B27/1 % HS/0,01 µg/ml PDGF/0,005 µg/ml FGF kultiviert.

3. Material und Methoden

Tabelle 3.8: Kulturträger und ausplattierte Zellzahl primärer Oligodendrozyten

Kulturträger Ø	Zellzahl
10 cm	1×10^7
6 cm	4×10^6
3,5 cm	$1,25 \times 10^6$
11 mm	1×10^5

Die Wachstumsfaktoren PDGF und FGF wurden für weitere 2 Tage in der oben angegebenen Konzentration zum Kulturmedium hinzugefügt. Die Kultivierung erfolgte bei 37°C und 5 % CO₂.

3.6.2 Oli-neu Zellen: Kultivierung, Passagieren, Auftauen und Einfrieren

Bei Oli-neu handelt es sich um eine durch retroviralen Onkogen transfer aus murinen primären Oligodendrozytenvorläuferzellen generierte Zelllinie. Die Immortalisierung wurde durch ein t-neu Onkogen beinhaltendes MMLV-Vektorkonstrukt erreicht (Jung et al., 1995). Die Kultivierung der Zellen erfolgte auf mit PLL beschichteten Kulturträgern, in Sato Medium mit 1 % HS, bei 37°C und 5 % CO₂.

Um zu dicht werdende Kulturen und das damit verbundene Absterben der Zellen zu vermeiden, wurden diese regelmäßig passagiert. Dazu wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen wurden für ca. 2 min mit 37°C warmen HBSS/0.01 % Trypsin/0.02 % EDTA von der Kulturschale gelöst. Um einen Verdau von Zelloberflächenproteinen zu vermeiden, wurde das Trypsin mit eiskaltem DMEM/10 % HS abgestoppt und die Zellen wurden bei 130 x g für 10 min bei 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 37°C warmen Sato Medium resuspendiert und die Zellen wurden in der gewünschten Dichte auf neue mit PLL beschichtete Kulturträger ausplattiert.

Zur Lagerung der Zellen wurde das Pellet einer konfluent bewachsenen 15 cm Kulturschale (ca. 5 mio Zellen) in 2 ml Einfriermedium aufgenommen und auf zwei Einfrierröhrchen verteilt. Die Zellen wurden zunächst in mit Isopropanol befüllten Einfrierbehältern bei -80°C gelagert und nach 24 h in flüssigen Stickstoff überführt.

Das Auftauen der Zellen erfolgte im 37°C Wasserbad. Um das im Einfriermedium befindliche, für Zellen toxische DMSO zu verdünnen, wurden die aufgetauten Zellen schnellstmöglich in 4°C kaltem DMEM/10 % HS verdünnt und für 10 min bei 130 x g und 4°C abzentrifugiert. Das

Pellet wurde in Sato/1% HS resuspendiert und in eine Kulturflasche (250 ml Volumen) ausplattiert.

3.6.3 Transiente Transfektion von Oli-neu Zellen

3.6.3.1 Elektroporation

Bei der Elektroporation wird durch einen kurzen Spannungsimpuls die Plasmamembran kurzzeitig perforiert, wodurch DNA in die Zellen eingeschleust werden kann. Für die Elektroporation von Oli-neu Zellen, wurden je nach Plasmid, 5 - 30 µg DNA mit 600 µl Zellsuspension (3×10^6 Zellen/ml) in einer Elektroporationskuvette (Elektrodenabstand: 4 mm) vermischt und für 5 min bei RT inkubiert. Die Zellen wurden mit einer Spannung von 220 V und 950 µF elektroporiert und erneut für 5 min bei RT inkubiert. Für Versuche am folgenden Tag wurde ein Elektroporationsansatz in eine 6 cm Kulturschale ausplattiert. Zur Steigerung der Expression wurden die Zellen ca. 4 h nach der Elektroporation mit 2 mM Natriumbutyrat und 1 mM dbcAMP behandelt.

3.6.3.2 AMAXA Nukleofektion

Bei der Nukleofektion wird die DNA mittels Elektroporation direkt in den Zellkern eingeschleust. Dazu wurden 1 Mio Oli-neu Zellen in 100 µl AMAXA-Lösung resuspendiert und mit 4 µg PLP-DNA in einer Elektroporationskuvette vermischt. Nach der Elektroporation (Programm O-005) wurden die Zellen in 500 µl 37°C warmen Sato Medium aufgenommen und auf eine 6 cm Kulturschale ausplattiert.

3.6.3.3 Liposomen-basierte Transfektion (Fugene 6, Lipofectamine 2000)

Bei den Liposomen-basierten Transfektionsmethoden werden meist kationische Lipide verwendet, die an die negativ geladene DNA binden und von der Zelle in Form von Liposomen aufgenommen werden.

Das folgende Protokoll wurde der Fugene® 6 (Roche) bzw. Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen) Gebrauchsanleitung entnommen. Die Zellen wurden am Vortag der Transfektion auf die gewünschten Kulturträger ausplattiert. Für die Fugene Transfektion waren die Zellen zum Zeitpunkt der Transfektion 50 - 80 % für die Lipofectamine 2000 Transfektion ca. 90 - 95 % konfluent. Die Transfektions-Reagenzien (bei Lipofectamine™ 2000 auch die DNA) wurden mit serumfreien DMEM oder Opti-MEM verdünnt. Nach einer 5 minütigen Inkubation bei RT

3. Material und Methoden

wurden die DNA und das Transfektionsreagenz miteinander vermischt und für weitere 20 min bei RT inkubiert. Die sich aus DNA und Reagenzien gebildeten Komplexe wurden dann zu den Zellen gegeben. Zur Steigerung der Expression wurden die Zellen ca. 4 h nach der Transfektion mit 1 mM dbcAMP und 2 mM Natriumbutyrat behandelt und nach ca. 20 h für den Versuch verwendet.

Tabelle 3.9: Pipettierschema Fugene® 6 und Lipofectamine™ 2000

Kulturschale	Plasmid-DNA [µg]	DMEM [µl]	Fugene® 6 [µl]	Gesamtvolumen [µl]	Vol.: Medium [ml]
3,5 cm Ø	1	97	3	100	2 ml
6 cm Ø	2	194	6	200	4 ml
			Lipofectamine™ 2000 [µl]		
3,5 cm Ø	4	jeweils 250	10	260	2 ml
6 cm Ø	8	jeweils 500	20	1020	4 ml

3.7 Präparation von Myelin und Zellmembranen

3.7.1 Isolierung von Myelin aus dem ZNS

Aufgrund seiner geringen Dichte, kann Myelin über einen Saccharose-Stufengradienten von anderen Membranen biochemisch getrennt werden (Norton and Poduslo, 1973). Die Isolierung von Myelin erfolgte aus P9/10 Mäusegehirnen. Die entnommenen Gehirne wurden in einer 10,5 %igen Saccharoselösung mit Hilfe eines Ultra-Turrax T25 homogenisiert und anschließend für 45 min bei 17.000 x g und 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wurde in einer 30 %igen Saccharoselösung resuspendiert, mit 10,5 %iger Saccharoselösung überschichtet und für 50 min bei 68.000 x g und 4°C zentrifugiert. Das Myelin wurde von der 10,5/30 % Interphase abgesammelt und durch Zugabe von H₂O_{dd} und einer anschließenden 30 minütigen Zentrifugation bei 68.000 x g und 4°C, einem hypoosmotischen Schock unterzogen. Nach Wiederholung des "Schockierschrittes" wurden kontaminierende Axolemmamembranen durch erneute Zentrifugation in einem Stufengradienten (wie oben) abgetrennt. Das aufgereinigte Myelin wurde 2 x mit H₂O_{dd} resuspendiert, für 30 min bei 68.000 x g und 4°C abzentrifugiert und in kleinen Volumina H₂O_{dd} bei – 80°C gelagert.

3.7.2 Fraktionierung von Myelin

Subdomänen von P9/10 Myelin (Kap.3.7.1) wurden in Anlehnung an (Matthieu et al., 1973; Rios et al., 2000) aufgetrennt. Dazu wurden 5 µg Myelin in 200 µl 0,32 M Saccharose, TBS/1 mM PMSF aufgenommen und auf einen Stufengradienten aus 1 ml 0,62 und 1 ml 0,8 M Saccharose/TBS/1mM PMSF, aufgetragen. Nach einer 30 minütigen Zentrifugation bei 75.000 x g und 4°C wurden drei Fraktionen abgesammelt: die 0,32/0,62 M Interphase (leichte Membranen), die 0,62/0,8 M Interphase (mittlere Membranen) und das Pellet (schwere Membranen). Alle Fraktionen wurden mit 10 mM Tris/5 mM EDTA/1 mM PMSF gewaschen und für 30 min bei 100.000 x g und 4°C pelletiert. Die Pellets wurden in 50 µl RIPA-Puffer (Tabelle 3.2) für 3 h auf Eis solubilisiert und mittels Western-Blot analysiert.

3.7.3 Präparation eines kernfreien Überstandes (PNS)

Um Zellmembranen zu präparieren, wurde die Plasmamembran der Zellen in einem detergenzfreien Puffer, mechanisch (siehe unten) aufgebrochen und die Zellkerne für 10 min bei 1000 x g und 4°C abzentrifugiert.

3.7.3.1 Aufbrechen von Zellen mit Hilfe einer 22 x G Kanüle

Die Zellen einer konfluent bewachsenen 6 cm Kulturschale wurde mit 500 µl des entsprechenden Puffers von der Schale geschabt und durch zwanzigfaches Aufziehen mit einer 22 x G Kanüle homogenisiert.

3.7.3.2 Aufbrechen von Zellen mit Hilfe eines *Cellcrackers*

Für primäre Oligodendrozyten und Oli-neu Zellen wurde eine Metallkugel (12 µm) verwendet, bei der der Zwischenraum zwischen Metallkugel und Gehäuse des *Cellcrackers*, 12 µm beträgt. Die Zellen von 3 – 4 konfluent bewachsenen 6 cm Kulturschalen wurden in 800 µl des entsprechenden Puffers abgeschabt und durch dreimaliges Aufziehen mit einer 22 x G Kanüle vereinzelt. Bevor die 1 ml Spritze mit der Zellsuspension luftblasenfrei auf den *Cellcracker* platziert wurde, wurde aus diesem die Luft mit dem verwendeten Puffer herausgedrückt. Anschließend wurde die Zellsuspension mit Hilfe von 1 ml Spritzen 6 x hin und her (= 12 x) gedrückt, wodurch die Zellen mittels Scherkräfte aufgebrochen wurden. Das sich im Gehäuse des *Cellcrackers* befindliche Totvolumen der Zellsuspension (= 0,5 ml) wurde mit Puffer herausgedrückt und mit einer 1 ml Spritze aufgefangen. Durch die

Vereinigung der homogenisierten Zellsuspensionen wurde ein Endvolumen von 1, 3 ml gewonnen.

3.7.3.3 Aufbrechen von Zellen mit Hilfe einer N₂-Bombe

Bei dieser Methode konnte eine beliebige Anzahl an Zellen in einem beliebigen Volumen Homogenisierungspuffer aufgenommen werden. Nach dem Abschaben wurden die Zellen in dem vorgekühlten Gehäuse der N₂-Bombe mit einem Druck von 80 bar für 10 min bei 4°C aufgebrochen.

3.7.4 Membranpräparation

Unter Verwendung eines detergenzfreien Puffers wurde ein PNS hergestellt (Kap. 3.7.3). Aus diesem wurden die Zellmembranen durch Ultrazentrifugation für 1 h bei 100.000 x g und 4°C pelletiert und das Pellet wurde in SDS-Probenpuffer resuspendiert.

3.7.5 Präparation von Myelin-ähnlichen Membranen (MLMs) aus primären Oligodendrozyten

Die Isolierung von Myelin-ähnlichen Membranen (MLMs) aus primären Oligodendrozyten erfolgte in Anlehnung an (Schneider et al., 2005). Die Zellen wurden mit 10 mM Tris/5 mM EDTA/1 mM PMSF/1 µg/ml Aprotinin und Leupeptin homogenisiert. Nach Präparation eines PNS (Kap.3.7.3), wurde aus diesem die Plasmamembran durch 10 minütige Zentrifugation bei 20.000 x g und 4°C pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Membranpellet wurde in 2 ml 0,85 M Saccharose/10 mM Tris/1 mM PMSF resuspendiert und mit 200 µl 0,25 M Saccharose/10 mM Tris/1 mM PMSF in einem TLS-55 Zentrifugenröhrchen überschichtet. Der Gradient wurde für 30 min bei 50.000 x g und 4°C zentrifugiert. Die Myelin-ähnlichen Membranen wurden an der 0,25/0,85 M Interphase abgesammelt (500 µl), mit 50 mM Tris/5 mM EDTA/1 mM PMSF gewaschen, für 30 min bei 50.000 x g und 4°C pelletiert, in 50 µl Lysis-Puffer resuspendiert und mittels Western-Blot analysiert.

3.7.6 Fraktionierung von oligodendroglialen Zellmembranen

Die Fraktionierung von Zellmembranen aus primären Oligodendrozyten, erfolgte wie in Kap.3.7.2 für Myelin beschrieben. Dazu wurde aus den Zellen ein PNS hergestellt (Kap.3.7.3). und aus diesem wurden die Membranen durch eine 15 minütige Zentrifugation bei 20.000 x

g und 4°C pelletiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Membranpellet wurde in 1 ml 0,8 M Saccharose/TBS/1 mM PMSF resuspendiert und in einem TLS-55 Zentrifugenröhrchen mit 1 ml 0,62 M und 200 µl 0,32 M Saccharose in TBS/1 mM PMSF überschichtet (Abb. 4.2 A). Die Zentrifugation sowie das Waschen und Solubilisieren der Fraktionen erfolgte wie in Kap.3.7.2 beschrieben.

3.7.7 Präparation von Exosomen

Für die Präparation von Exosomen wurden primäre Oligodendrozyten und Oli-neu Zellen über Nacht in serumfreiem Kulturmedium kultiviert. Am folgenden Tag wurde das Kulturmedium abgenommen und drei differentiellen Zentrifugationsschritten unterzogen. Tote Zellen und Zelltrümmer wurden durch 10 minütige Zentrifugation bei 300 x g und 4 °C abzentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen und aus dem verbleibenden Überstand wurden Membranfragmente für 10 min bei 10.000 x g und 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen und der Überstand wurde zum Pelletieren der Exosomen für mindestens 2 h bei 100.000 x g und 4°C zentrifugiert. Das 100.000 x g Pellet wurde in 4 x Probenpuffer resuspendiert und mittels Western-Blot analysiert.

3.8 Das Biotin-Avidin-System

Biotin ist ein Vitamin (Vitamin B7, Vitamin H) aus dem B-Komplex mit einem Molekulargewicht von 244 Da. Avidin ist ein im Eiweiß des Hühnereis vorkommendes Glykoprotein mit einer außerordentlich hohen Affinität zu Biotin. Die Avidin-Biotin Interaktion ist die stärkste bekannte nicht-kovalente Bindung zwischen einem Protein und seinem Ligand ($K_a=10^{15} \text{ M}^{-1}$). Die Bindung erfolgt sehr schnell und sobald sich der Komplex gebildet hat, ist er gegenüber extremen pH- und Temperaturschwankungen sowie gegenüber organischen Lösungsmitteln und anderen denaturierenden Agenzien unempfindlich. Diese Eigenschaften machen Avidin und andere Biotin-bindenden Proteine (siehe unten) zu Standardreagenzien für die Isolierung und Detektion diverser Moleküle (Savage et al., 1992).

3.8.1 Biotin-bindende Proteine: Avidin, Streptavidin und Neutravidin

Avidin, Streptavidin und Neutravidin binden jeweils 4 Moleküle Biotin. Avidin ist ein 66 kDa großes, kationisches Glykoprotein mit einem isoelektrischen Punkt bei ca. pH 10,5. Durch seine positiven Ladungen und die Oligosaccharidkomponenten kann Avidin unspezifisch an die negativ geladene Zelloberfläche binden, wodurch Hintergrundprobleme bei einigen Anwendungen auftreten können.

Das bakterielle Homolog Streptavidin ist hingegen nicht glykosyliert und besitzt seinen isoelektrischen Punkt im neutralen pH-Bereich. Allerdings besitzt Streptavidin eine Aminosäuresequenz (RYD), die der für die Zelladhäsion verantwortlichen Sequenz (RGD) von Fibronectin ähnelt, wodurch unspezifische Bindungen an Integrine und verwandte Zelloberflächenmoleküle auftreten können.

Bei Neutravidin handelt es sich um deglykosyliertes Avidin, bei dem zusätzlich der isoelektrische Punkt herabgesetzt wurde, wodurch seine unspezifischen Bindungseigenschaften minimiert wurden. Es ist ein breites Angebot an immobilisierten oder konjugierten Streptavidin- und Neutravidin-Reagenzien kommerziell erhältlich.

3.8.2 Biotinylierung von Molekülen

Da Biotin nur 244 Da groß ist, kann es an viele Proteine, Antikörper und andere Makromoleküle konjugiert werden, ohne deren biologische Aktivitäten sterisch zu behindern. Die mit Biotin markierten Proteine können dann über immobilisiertes Streptavidin bzw. Neutravidin von nicht-biotinylierten Proteinen getrennt werden oder über Streptavidin- bzw. Neutravidin-Konjugate mittels Western-Blot, Fluoreszenzmikroskopie oder ELISA detektiert werden. Durch die Veresterung von Biotin mit N-Hydroxysuccinimiden, (NHS) bildet das Biotin in einem pH-Bereich von 7 - 9, stabile Amidbindungen mit primären Aminogruppen ($-NH_2$). Proteine besitzen normalerweise in den Seitenketten der Aminosäure Lysin sowie am N-Terminus jeder Polypeptidkette eine Reihe an primären NH_2 -Gruppen, die als Angriffsziele der aktivierten Biotin-Moleküle dienen. Es sind viele EZ-Link®NHS-Biotin Reagenzien mit unterschiedlichen Eigenschaften und *Spacerarmen* (LC) unterschiedlicher Länge kommerziell verfügbar. Durch die unterschiedlichen Längen der *Spacerarme* können sterische Behinderungen während der Biotinylierung umgangen werden und ermöglichen daher eine optimale Markierung und Detektion. Im Laufe dieser Arbeit wurden

3. Material und Methoden

ausschließlich wasserlösliche, membranimpermeable Sulfo-NHS-Biotin Reagenzien für die Zelloberflächenbiotinylierung verwendet.

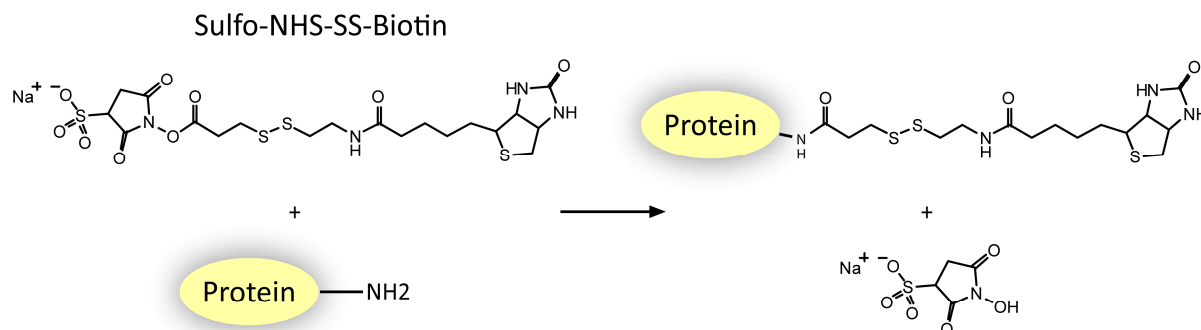


Abb. 3.1: Reaktionsschema von EZ-Link®Sulfo-NHS-SS-LC-Biotin mit primären Aminogruppen.

3.8.2.1 Zelloberflächenbiotinylierung

Um den Membrantransport während der Biotinylierung zu blockieren, wurden alle Schritte bei 4°C bzw. auf Eis durchgeführt und ausschließlich kalte Puffer verwendet. Vor der Biotinylierung wurden die Zellen für ca. 10 min mit PBS auf Eis heruntergekühlt. Die Biotinylierung erfolgte für 30 min in PBS mit membranimpermeablem EZ-Link-Sulfo-NHS-LC-Biotin (0,5 mg/ml) oder EZ-Link-Sulfo-NHS-SS-Biotin (0,25 mg/ml, Abb. 3.1). Um anschließend überschüssiges Biotin gründlich zu entfernen, wurden die Zellen zweimal für 5 min mit 50 mM Glycin in PBS und einmal für 5 min mit PBS gewaschen.

3.9 Fluoreszenzmarkierungen von Proteinen und Organellen

Für Doppelfärbungen wurden Fluorochrome verwendet, deren Anregungs- und Emissionsspektren in unterschiedlichen Wellenlängenbereichen liegen. Dies ermöglichte die Unterscheidung und Darstellung der verschiedenen Proteine mittels konfokaler *Laser-Scanning-Mikroskopie (LSM)*.

3.9.1 Immunfluoreszenz

Für die Immunfluoreszenz wurden die Zellen auf mit PLL beschichtete Glasdeckgläser ausplattiert. Überschüssiges Kulturmedium wurde durch Waschen mit PBS entfernt und anschließend wurden die Zellen mit 4 % Paraformaldehyd in PBS für 15 min bei RT fixiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen für die Detektion intrazellulärer

Epitope mit 0,1 % Triton X-100 in PBS für 2 min bei RT permeabilisiert. Unspezifische Bindungen wurden für 15 min mit DMEM/10 % HS bei RT blockiert. Die Antikörper wurden in DMEM/10 % HS verdünnt. Die Zellen wurden für 30 min mit den Primärantikörpern und für 20 min mit den Sekundärantikörpern inkubiert. Nach jeder Antikörperinkubation erfolgten drei Waschschritte mit PBS für 2 min. Um überschüssige Salze zu entfernen, wurden die Zellen kurz in destilliertes Wasser getaucht und anschließend in Mowiol eingebettet.

3.9.2 Markierung der Recycling-Endosomen mit fluoreszierendem Transferrin

Für die Markierung der Recycling-Endosomen wurden Oli-neu Zellen mit 30 µg/ml fluoreszierendem Transferrin für 15 – 60 min in Sato Kulturmedium bei 37°C inkubiert.

Primäre Oligodendrozyten wurden vor der Markierung über Nacht in DMEM kultiviert und anschließend wurden die Zellen für mindestens 1 h mit 30 µg/ml fluoreszierendem Transferrin in DMEM inkubiert.

3.9.3 Markierung der Lysosomen mit LysoTracker®

Für die Markierung der Lysosomen wurden die Zellen mit 75 nM LysoTracker® für 2 h in Sato Kulturmedium inkubiert.

3.9.4 Detektion biotinylierter Proteine mit fluoreszierendem Streptavidin

Für die Visualisierung biotinylierter Proteine, wurden die Zellen wie in Kap. 3.9.1 beschrieben fixiert, permeabilisiert, blockiert, gewaschen und eingebettet. Die Markierung mit fluoreszierendem Streptavidin (1:400 in DMEM/10 % HS) erfolgte für 30 min bei RT.

3.10 Methoden zur Analyse des endosomalen Transports von Myelinproteinen

3.10.1 Antikörper-Endozytose

Bei der Antikörper-Endozytose wurden die Proteine mit spezifischen Primärantikörpern markiert, die extrazellulär lokalisierte Epitope der Proteine erkennen. Um den Membrantransport während der Antikörperinkubationen zu blockieren, wurden ausschließlich kalte Pufferlösungen verwendet sowie alle Schritte auf Eis durchgeführt.

3. Material und Methoden

Die Zellen wurden für 10 min in DMEM/10 % HS auf Eis heruntergekühlt und für 45 min mit den Primärantikörpern (in DMEM/10 % HS) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 3 x für 2 min mit PBS gewaschen und für 30 min mit einem speziesspezifischen, Fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert und 3 x mit PBS gewaschen. Um die Endozytose der markierten Zelloberflächenproteine zu ermöglichen, wurden die Zellen in vorkonditioniertem Kulturmedium bei 37°C für beliebige Zeiten inkubiert. Der Kontrollansatz wurde währenddessen bei 4°C in PBS inkubiert bzw. direkt fixiert. Anschließend wurden die Zellen erneut für 10 min in DMEM/10 % HS heruntergekühlt. Die Antikörperkomplexe an der Zelloberfläche wurden mit einem speziesspezifischen, Fluorochrom-gekoppelten Tertiärantikörper gegengefärbt. Nach dreimaligem Waschen für jeweils 2 min mit PBS wurden die Zellen mit 4 % PFA fixiert und in Mowiol eingebettet. Für die Kollokalisationsstudien der endozytierten Proteine mit endosomalen Markerproteinen wurden die Zellen wie in Kap.3.9.1 beschrieben, doppelgefärbt. Hierbei war darauf zu achten, dass Kreuzreaktivitäten zwischen den verwendeten Sekundärantikörpern ausgeschlossen wurden. Zur Markierung der Recycling-Endosomen wurde während der 37°C Inkubation Fluorochrom-gekoppeltes Transferrin (30 µg/ml) zum Kulturmedium hinzugegeben.

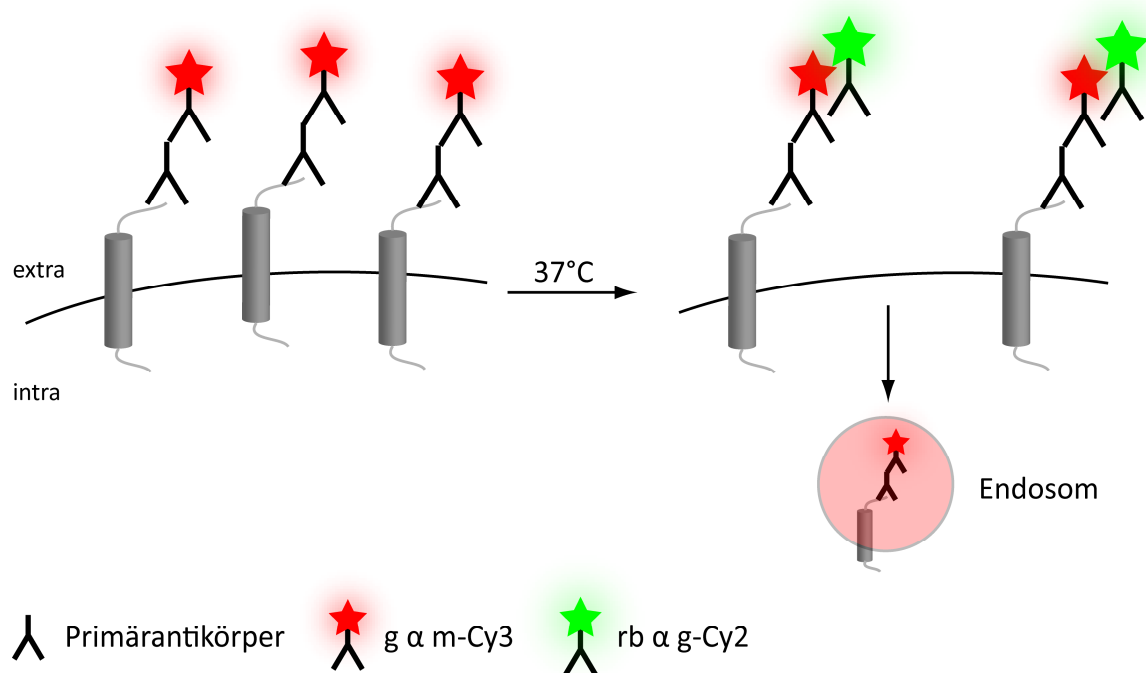


Abb. 3.2: Schematische Darstellung der Antikörper-Endozytose.

Zelloberflächenproteine wurden auf Eis mit spezifischen Primär- und Sekundärantikörpern (rot) markiert. Nach der 37°C Inkubation wurden an der Zelloberfläche verbleibende Antikörperkomplexe mit einem weiteren Sekundärantikörper (grün) gegengefärbt. Endozytierte, markierte Proteine sind in Rot, Zelloberflächenproteine

sind nach Überlagerung der aufgenommenen Fluoreszenz hingegen in Gelb dargestellt.

3.10.2 Endozytose und Recycling von zelloberflächenbiotinylierten Proteinen

3.10.2.1 *Pulse Chase*-Markierung von Zelloberflächenproteinen mit Sulfo-NHS-SS-Biotin

Die Markierung von Zelloberflächenproteinen mit einem spaltbaren Biotin, ermöglicht die Analyse des Endozytose Verhaltens biotinylierter Proteine in einem *Pulse Chase*-System. Dazu wurden die Zellen wie in Kap.3.8.2.1 beschrieben, mit Sulfo-NHS-SS-Biotin zelloberflächenbiotinyliert. Um die Endozytose der markierten Proteine zu ermöglichen, wurden die Zellen nach der Biotinylierung bei 37°C in vorkonditioniertem Sato Medium inkubiert. Anschließend wurde das an Zelloberflächenproteine gebundene Biotin, 2 x für 15 min mit 100 mM DTT abgespalten. Überschüssiges DTT wurde 3 x für 5 min mit 5 mg/ml Iodacetamid in PBS gewaschen. Die Zellen wurden in PBS/1 % T X-100/2 mM EDTA/1 mM PMSF/1 µg/ml Aprotinin und Leupeptin lysiert und unlösliches Material wurde bei 300 x g und 4°C für 10 min abzentrifugiert. Das Zell-Lysat wurden über Nacht bei 4°C auf dem Rotationsrad mit Neutravidin-*Beads* inkubiert. Anschließend wurden die *Beads* kurz bei 4°C abzentrifugiert und 4 x mit Lysis-Puffer und 1 x mit PBS gewaschen. Um die gebundenen, biotinylierten Proteine von den *Beads* zu lösen, wurden sie mit 4 x Probenpuffer (ohne DTT) für 5 min bei 95°C gekocht. Die *Beads* wurden abzentrifugiert und der Überstand mit den enthaltenen biotinylierten Proteinen mittels Western-Blot analysiert.

Folgende Kontrollansätze wurden parallel durchgeführt:

1. Biotinylierungskontrolle: ohne 37°C Inkubation (stattdessen Inkubation bei 4°C) und ohne Abspaltung des Zelloberflächenbiotins.
2. Abspaltkontrolle: ohne 37°C Inkubation (stattdessen Inkubation bei 4°C) und mit Abspaltung des Zelloberflächenbiotins.
3. Endozytose: mit 37° Inkubation und mit Abspaltung des Zelloberflächenbiotins.
4. Negativkontrolle: Die Zellen wurden nicht biotinyliert und mit Neutravidin-*Beads* inkubiert.

3.10.2.2 Recycling-Analyse von biotinylierten Zelloberflächenproteinen

Für die Recycling-Analysen von Myelinproteinen wurden primäre Oligodendrozyten auf Deckgläser und 6 cm Kulturschalen ausplattiert und nach 4 Tagen in Kultur wie in Kap.3.8.2.1 beschrieben mit Sulfo-NHS-LC-Biotin zelloberflächenbiotinyliert. Um Endozytose und

anschließendes Recycling der markierten Proteine zu ermöglichen, wurden die Zellen für 0 h (Kontrolle), 4 h und 24 h bei 37°C, in verschiedenen Kulturmedien inkubiert. Für die Visualisierung biotinylierter Proteine wurden die Zellen auf den Deckgläsern fixiert und wie in Kap. 3.9.1 u. 3.9.4 beschrieben, immunzytochemisch und mit Fluorochrom-gekoppeltem Streptavidin gefärbt.

Von den Zellen aus den Kulturschalen wurden wie in Kap.3.7.6 beschrieben, "schwere", "mittelschwere" und "leichte" Membranfraktionen isoliert. Die gewaschenen Fraktionen wurden für 3 h in 500 µl RIPA-Puffer bei 4°C auf dem Rotator solubilisiert und anschließend wurden die biotinylierten Proteine über Nacht bei 4°C mit Neutravidin-*Beads* präzipitiert und mittels Western-Blot analysiert.

3.11 Mikroskopische Analysen

3.11.1 Elektronenmikroskopie

Die elektronenmikroskopischen Analysen wurden von Dr. Wiebke Möbius, Max-Planck Institut für experimentelle Medizin, Abteilung für Neurogenetik, Göttingen durchgeführt. Für morphologische Analysen wurden die Zellen durch Zugabe von 2 x konzentrierter Fixierlösung (Tabelle 3.2) zum Kulturmedium (im Verhältnis 1:1) vorfixiert. Nach 5 min wurde der Überstand abgenommen und durch 1 x Fixierlösung ersetzt. Die Zellen wurden für mindestens 4 h bei RT fixiert. Anschließend wurden die Zellen in 1 % OsO₄ in 0,1 M Phosphatpuffer postfixiert und nach Dehydrierung mit Ethanol und *en bloc* Färbung mit 1,5 % Uranylacetat und 1,5 % Tungstophosphorsäure in 70 % Ethanol, in Epon eingebettet.

Die ultradünnen Schnitte wurden parallel zum Substrat mit einem Ultracut S Ultramicrotom (Leica, Vienna, Austria) geschnitten.

3.11.2 Immuno-Elektronenmikroskopie

Für die Immuno-Elektronenmikroskopie wurden die Zellen wie oben beschrieben fixiert (Tabelle 3.2). Anschließend wurden die Zellen mit 0,1 M Phosphatpuffer gewaschen, mit 0,1 M Phosphatpuffer/1 % Gelatine von den Kulturschalen geschabt und in 0,1 M Phosphatpuffer/10 % Gelatine bei 37°C resuspendiert. Die Zellen wurden abzentrifugiert, das Pellet auf Eis gekühlt, aus dem Reagenzgefäß entnommen und in kleine Blöcke geschnitten. Diese Blöcke wurden in 1 M Phosphatpuffer/2,3 M Saccharose infiltriert, auf Aluminium Pins

3. Material und Methoden

für die Ultramikrotomie eingebettet und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die ultradünnen Kryoschnitte wurden in einem 1:1 Gemisch aus 2 % Methylzellulose und 2,3 M Saccharose aufgenommen. Für die Immunfärbungen wurden die Schnitte mit spezifischen Primärantikörpern inkubiert. Polyklonale Primärantikörper wurden mit Protein A-gold (10 nm) detektiert. Monoklonale Antikörper wurden mit Brückenantikörpern (rb α g) markiert und anschließend mit Protein A-gold detektiert.

3.11.3 Lebendzellmikroskopie

Für die Lebendzellmikroskopie wurden Oli-neu Zellen mit 10 μ g PLP-EGFP oder- S/L-MAG-GFP mittels Elektroporation (Kap. 3.6.3.1) transient transfiziert. 300 μ l des Transfektionsansatzes wurden auf eine für die Lebendzellmikroskopie geeignete 3,5 cm Kulturschale ausplattiert und nach ca. 4 h mit 2 mM Natriumbutyrat behandelt und für ca. 20 h in Sato Kulturmedium kultiviert. 1 h vor der Lebendzellmikroskopie wurde das Sato Medium abgenommen und durch von Oli-neu Zellen vorkonditionierten (über Nacht) HANKs-Puffer (Tabelle 3.2) ersetzt.

3.12 Bradford-Test

Der Bradford-Test dient der Konzentrationsbestimmung von Proteinen. Nach Bindung des Farbstoffes Coomassie brilliant blue G-250 an Proteine, verschiebt sich sein Absorptionsmaximum von 465 nm (ohne Protein) nach 595 nm (mit Protein). Die Zunahme der Absorption bei 595 nm ist demnach ein Maß für die Proteinkonzentration einer Lösung. Zur Ermittlung der Proteinkonzentration einer Probe, wurde zunächst eine BSA-Verdünnungsreihe (12,5, 10, 5, 2,5, 1 μ g/ml) in dem der zu messenden Probe entsprechenden Puffer angesetzt. 800 μ l der Probe wurden mit 200 μ l Bradford-Lösung gemischt und für 30 min bei RT inkubiert. Die Standardkurve wurde durch photometrische Messung der Extinktion bei 595 nm erstellt und die Konzentration der Probe wurde mittels der gemessenen OD₅₉₅ anhand der Standardkurve ermittelt.

3.13 SDS-PAGE

Die SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) wird standardmäßig zur Auftrennung von Proteingemischen eingesetzt. Hierbei handelt es sich um eine Methode, bei der Proteine

3. Material und Methoden

entsprechend ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. SDS (Sodiumdodecylsulfat) ist ein anionisches Detergenz, das an hydrophobe Regionen der Proteine bindet und deren Eigenladung überdeckt. Die Proteine wurden denaturiert, indem sie mit einem Überschuss SDS für 5 min auf 95°C bzw. 65°C (bei Membranproteinen), erhitzt wurden. Durch die Zugabe von reduzierendem Dithiotreithol (DTT) oder β -Mercaptoethanol wurden zusätzlich Disulfidbrücken zwischen Cysteinen aufgespalten. Die Elektrophorese erfolgte meist in einem diskontinuierlichen Lämmli-System, bei dem Tris-Glycin Puffer verwendet wurden. Hierbei wurde ein Trenngel (Tris-Glycin-Puffer pH 8,8; 5-20 % Acrylamid) mit einem Sammelgel (Tris-Glycin-Puffer pH 6,8; 3-4 % Acrylamid) überschichtet.

Tabelle 3.10: Pipettierschema SDS-Gele

	Sammelgel (2 ml)	Trenngel (5 ml)				
	5 %	6 %	8 %	10 %	12 %	15 %
H ₂ O	1,4	2,6	2,3	1,9	1,6	1,1
30 % Acrylamid	0,33	1,0	1,3	1,7	2,0	2,5
1 M Tris	0,25	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3
10 % SDS	0,02	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
10 % APS	0,02	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
TEMED	0,002	0,004	0,003	0,002	0,002	0,002

aus Sambrook und Russel, 3. Ausgabe, 2001

Im Laufe dieser Arbeit wurden zudem 4 - 12 % Bis-Tris (Bis (2-hydroxyethyl) imino-tris (hydroxymethyl) methane-HCl) NuPAGE Gele (Invitrogen) mit MES (2-(N-morpholino) ethane sulfonic acid) Puffer zur Auftrennung niedermolekularer und MOPS (3-(N-morpholino) propane sulfonic acid) Puffer zur Auftrennung mittelgroßer Proteine verwendet.

3.13.1 Coomassie-Färbung

Coomassie *brilliant blue* G-250 bindet an Proteine mit einer Nachweisgrenze von 0,1 - 2 μ g Protein. Für die Färbung der Proteine wurde das Polyacrylamidgel (Kap.3.13) für mindestens 30 min in der Coomassie-Färbelösung bei RT auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde das Gel kurz mit H₂O_{dd} abgespült und über Nacht auf einem Schüttler in Coomassie-Entfärbelösung inkubiert.

3.14 Western-Blot

Beim Western-Blot werden die mittels SDS-PAGE (Kap.3.13) aufgetrennten Proteine elektrophoretisch auf eine Membran übertragen. Im Laufe dieser Arbeit wurde sowohl das "Semi-Dry" als auch das "Wet-Blot" (NuPAGE, Invitrogen) Verfahren (s.u.) für den Transfer der Proteine verwendet. Als Transfermembranen dienten jeweils Polyvinyliden-difluoridmembranen (PVDF) Membranen. Diese wurden vor Gebrauch kurz mit Ethanol benetzt, mit destilliertem Wasser gewaschen und für 5 min in Transferpuffer äquilibriert. Für den Transfer wurde die Membran auf in Transferpuffer getränktes Filterpapier (*Whatman*) gelegt. Das Gel wurde auf die Membran platziert und mit weiteren in Transferpuffer getränkten Filterpapieren bedeckt. Luftblasen zwischen den Lagen wurden durch Rollen einer Plastikpipette entfernt. Im Laufe dieser Arbeit wurden folgende Parameter verwendet.

Verfahren:	Semi-Dry	Wet-Blot
Stromstärke:	150 mA (1 Gel), 220 mA (2 Gele)	30 V (1 Gel), 60 V (2 Gele)
Zeit	90 min	90 min
Aufbau:	<div><div>-----Kathode-----</div><div>3 x Filterpapier</div><div>Gel</div><div>Membran</div><div>3 x Filterpapier</div><div>++++Anode++++</div></div>	<div><div>-----Kathode-----</div><div>Blotting Pads</div><div>1 x Filterpapier</div><div>Gel</div><div>Membran</div><div>1 x Filterpapier</div><div>Blotting Pads</div><div>++++Anode++++</div></div>

3.14.1 Ponceau-S Färbung

Nach dem Proteintransfer wurde überschüssiges SDS kurz mit H_2O_d von der Membran gewaschen. Um die Effizienz des Proteintransfers zu überprüfen, die Markerbanden zu visualisieren und die Proteine auf der Membran zu fixieren, wurden die Membranen für ca. 5 min bei RT mit Ponceau-S Färbelösung auf einem Schüttler inkubiert und anschließend mit H_2O_d gewaschen, bis die Banden deutlich zu erkennen waren.

3.14.2 Immundetektion

Um unspezifische Bindungsstellen auf der Membran abzusättigen, wurden die Membranen für 30 min mit 4 % Milchpulver (MP)/PBST inkubiert. Anschließend wurden die Proteine mit

Hilfe von spezifischen Antikörpern detektiert. Die Antikörper wurden in 4 % MP/PBST verdünnt. Die Inkubation der Primärantikörper erfolgte für 1 – 2 h bei RT oder über Nacht bei 4°C, die des HRP-gekoppelten, speziesspezifischen Sekundärantikörpers für 30 min bei RT. Um überschüssige Antikörper zu entfernen, folgten auf beide Antikörperinkubationen 4 10 minütige Waschschrte mit PBST. Die markierten Proteine wurden mittels ECL-Reagenz detektiert. Dabei spaltet die Meerettichperoxidase das in der ECL-Lösung vorhandene Luminol, was zu Lichtsignalen führt, die eine Schwärzung von Röntgenfilmen verursachen. Biotinylierte Proteine wurden mit HRP-Streptavidin (1:1000) in 4 % MP/PBST für 30 min bei RT inkubiert, wie oben gewaschen und detektiert.

3.15 Klonierung

3.15.1 Transformation

Für die Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA wurden 100 µl hitzekompetente Top10F Bakterienkultur mit 1 µl DNA-Suspension gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte für 1 min bei 37°C, gefolgt von einer 2 minütigen Inkubation auf Eis. Anschließend wurden die Bakterien mit 800 µl LB-Medium für 60 min bei 37°C und leichtem Schütteln inkubiert. 50-100 µl des Ansatzes wurden auf Antibiotika-haltigen Agar ausplattiert und selektioniert.

3.15.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Zur Aufreinigung geringer Plasmid-Mengen (bis 20 µg) wurden 3 ml Antibiotika-haltiges LB-Medium mit einer Einzelkolonie angeimpft und bei 37°C und leichtem Schütteln (ca. 300 rpm) 12 - 16 h kultiviert. Die Bakterien wurden bei ca. 6800 x g pelletiert und die Plasmid-DNA nach Protokoll des Wizard® Plus SV Miniprep DNA *Purification Systems* isoliert. Zur Aufreinigung größerer Plasmid-Mengen (bis 500 µg) wurde das Quiagen Plasmid Maxi Kit verwendet.

3.15.3 Konzentrationsmessung von DNA-Lösungen

Die Konzentration der isolierten Plasmid-DNA wurde durch photometrische Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm (A₂₆₀) bestimmt. Dabei entspricht die

optische Dichte (OD) von 1,0 bei doppelsträngiger DNA einer Konzentration von 50 µg/ml. Die Seitenketten aromatischer Aminosäuren absorbieren Licht bei einer Wellenlänge von 280 nm. Aus dem Verhältnis der OD_{260 nm}/OD_{280 nm} lässt sich die Reinheit einer DNA-Lösung überprüfen. Eine proteinfreie Nukleinsäurelösung weist ein Verhältnis von 1,8 - 2,0 auf.

3.15.4 Restriktionsverdau

Für den analytischen Restriktionsverdau wurden 0,2 - 1 µg DNA mit der gewünschten Restriktionsendonuklease, dem passenden Puffer (entsprechend der Herstellerliste) und nukleasefreiem H₂O_{dd} für 90 min bei 37°C inkubiert.

3.15.5 Aufreinigung von DNA

Für die Isolierung der gewünschten DNA-Fragmente wurden diese unter einer UV-Lampe aus dem Agarose-Gel ausgeschnitten und mit dem Gel-Extraktions-Kit (Quiagen) aufgereinigt. Alternativ wurde eine Aufreinigung des verdauten PCR-Produktes mit dem PCR-Aufreinigungs-Kit (Promega) durchgeführt.

3.15.6 Ligation

Die DNA-Fragmente wurden mit Hilfe der T4-DNA-Ligase und 10 x Ligationspuffer mit dem Vektor ligiert. Dazu wurde fünfmal mehr DNA-Fragment als Vektor eingesetzt. Die Ligation wurde entweder für 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert.

3.15.7 Analyse von DNA

3.15.7.1 Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente wurden mittels der Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und identifiziert. Je nach aufzutrennender Fragmentgröße wurden Gele mit Agarosekonzentrationen von 0,5 - 2,0 % hergestellt. Die Agarose wurde in TAE Puffer durch Erhitzen in der Mikrowelle gelöst und nach dem Abkühlen mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid versehen. Nach dem Aushärten der Agaroselösung in einer Elektrophoresekammer, wurde die DNA mit 6 x Probenpuffer aufgetragen und bei 60 V aufgetrennt.

3.15.8 Amplifizierung von DNA

3.15.8.1 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Tabelle 3.11: Pipettierschema für den PCR-Ansatz

PCR-Ansatz (50 µl)	
H ₂ O _{dd}	ad. 50 µl
10 x PCR-Puffer	5 µl
MgSO ₄	2 mM
dNTPs (10mM)	200 µM
sensePrimer (100 µM)	50 pmol
antisensePrimer	50 pmol
Template	0,1 µg
Vent-Polymerase	1 U

Tabelle 3.12: Einstellungen der PCR-Maschine

Schritte	Temperatur [°C]	Zeit [sec]	Zyklen
1. Denaturierung	95	240	1
2. Denaturierung	95	40	35
3. <i>Annealing</i>	55	40	
4. Elongation	72	60	
5. <i>Chase</i>	72	600	1

3.15.9 Sequenzierung

Die PCR-Produkte wurden mittels des Qiaquick PCR-*Purification* Kits aufgereinigt und von der Firma GENterprise (Mainz) sequenziert. Die erhaltenen Sequenzdaten wurden mit dem Programm Clonemanager ausgewertet.

4 Ergebnisse

4.1 *In vitro* Modelle zur Analyse des oligodendroglialen Membrantransports

In vitro differenzieren primäre Oligodendrozyten (pOI) auch ohne den Einfluss neuronaler Signale spontan und exprimieren die Myelinproteine PLP, MAG und MOG, die *in vivo* erst in sehr späten Entwicklungsstadien von myelinisierenden Oligodendrozyten exprimiert werden. Zudem generieren pOI *in vitro* ein ausgedehntes Membransystem mit kompakten, mehrlagigen, meist ringförmigen, myelinähnlichen Strukturen (MLMs – *myelin like membranes*)(Dubois-Dalcq et al., 1986; Schneider et al., 2005) und dienen daher als geeignetes Modellsystem für Transportanalysen von Myelinkomponenten.

Da sich primäre Oligodendrozyten schwer manipulieren lassen, wurde für die zellbiologischen Transportanalysen die oligodendrogliale Zelllinie Oli-neu verwendet (Jung et al., 1995; Kap.3.6.2). Zwar handelt es sich hierbei um eine Vorläufer-Zelllinie, jedoch hat sie sich als die beste, momentan erhältliche Linie bewiesen, da ihre zellbiologischen Eigenschaften denen von pOI stark ähneln (Erb et al., 2003; Krämer et al., 2001; Simons et al., 2002; Trajkovic et al., 2006). Durch die Behandlung mit dbcAMP (dibutyryl zyklisches Adenosin-Monophosphat) kann die Differenzierung von Oli-neu Zellen induziert werden, wodurch die Zellen verzweigte Membransysteme, ähnlich denen von pOI ausbilden (Jung et al., 1995).

4.2 Subzelluläre Lokalisierung von PLP, MAG und MOG in primären Oligodendrozyten und Oli-neu Zellen

4.2.1 PLP, MAG und MOG assoziieren *in vitro* mit morphologisch unterschiedlichen Membrandomänen

Um die subzelluläre Verteilung von PLP, MAG und MOG in pOI morphologisch zu vergleichen, wurden die Zellen auf Deckgläsern ausplattiert und nach 5 Tagen in Kultur mit Antikörpern gegen PLP (aa3) und MAG (513) bzw. PLP und MOG (8-18-C5) immunzytochemisch gefärbt (Abb. 4.1).

Um die Verteilung der Myelinproteine an der Plasmamembran darzustellen, wurden in Abb. 4.1 konfokale Ebenen nahe des Deckglases gewählt. Die Fokussierung intrazellulärer Kompartimente ist in der dargestellten Ebene vernachlässigt. Die Färbung zeigt, dass PLP, MAG und MOG mit unterschiedlichen Domänen der Plasmamembran assoziieren. PLP ist über die gesamte Fläche der Fortsätze verteilt (Abb. 4.1 A, Sterne). MAG beschränkt sich hingegen auf die vom Zellkörper ausgehenden Hauptfortsätze sowie auf den äußeren Rand der flächigen Membranfortsätze (Abb. 4.1 A, a', Pfeile). MOG ist mit definierten Domänen innerhalb der Fortsätze assoziiert (Abb. 4.1 A, a'', Pfeile). Kolokalisierungen von PLP und MAG bzw. PLP und MOG sind in Gelb zu erkennen. Ausser in einigen membranreichen Knotenpunkten sind hier kaum Kolokalisierungen zu beobachten.

Um die intrazelluläre Verteilung von PLP, MAG und MOG in pOI zu vergleichen, wurden in Abb. 4.1 B konfokale Ebenen dargestellt, welche die Organellen im Zellkörper in Fokus setzen. Zwischen PLP und MAG sind in relativ seltenen Fällen Kolokalisierungen zu beobachten (Abb. 4.1 B, b', Pfeile), jedoch lässt sich hierbei keine Aussage über die Art des Organells treffen. MOG ist hauptsächlich an der Plasmamembran lokalisiert und per Immunfluoreszenz schwer in intrazellulären Kompartimenten zu detektieren. Kolokalisierungen von MOG und PLP sind selten zu beobachten.

PLP, MAG und MOG assoziieren demzufolge ähnlich wie im Myelin, auch *in vitro* in primären Oligodendrozyten mit unterschiedlichen Membrandomänen.

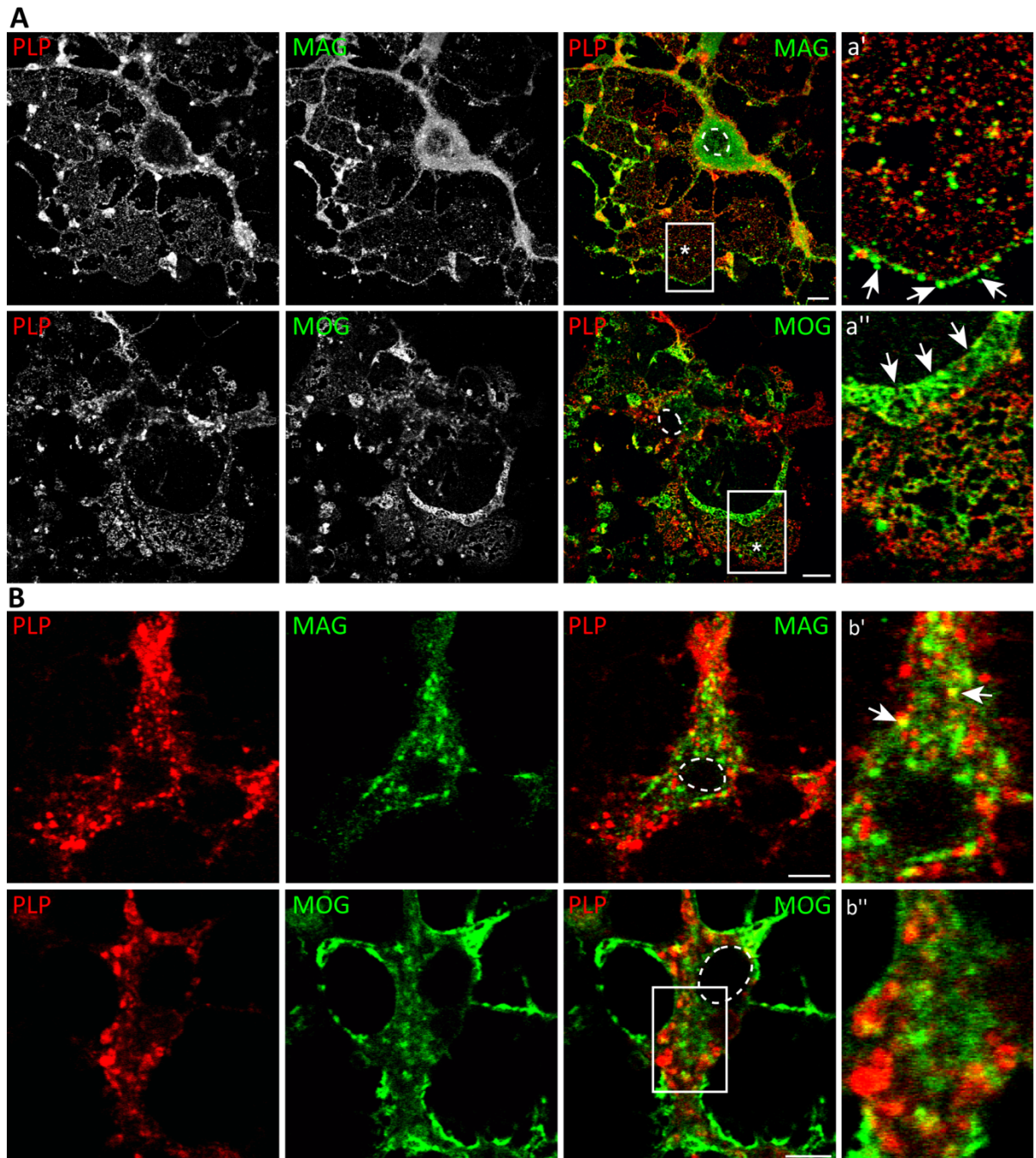


Abb. 4.1: Doppelimmunfluoreszenz von pOI mit Antikörpern gegen die Myelinproteine PLP, MAG und MOG. Konfokale Aufnahmen von immunzytochemisch gefärbten pOI (5 Tage in Kultur) mit Antikörpern gegen PLP (rot) und MAG (obere Reihe, grün) bzw. PLP und MOG (untere Reihe, grün). Kolokalisierungen sind in Gelb sichtbar. Gestrichelte Linien umranden die Zellkerne. Die rechteckig markierten Ausschnitte sind in a bzw. b vergrößert dargestellt. (A) Weiße Sterne markieren flächige Membranfortsätze. Alle drei Proteine sind mit unterschiedlichen Domänen der Plasmamembran assoziiert. PLP ist über die gesamte Fläche der Membranfortsätze verteilt. MAG ist vorzugsweise in den Hauptfortsätzen und am äußeren Rand der flächigen Fortsätze lokalisiert (a', weiße Pfeile). MOG ist mit definierten Plasmamembran-Domänen assoziiert (a'', weiße Pfeile) und hebt sich deutlich von PLP und MAG ab. In B ist die intrazelluläre Verteilung der Proteine dargestellt. Kolokalisierungen zwischen den Proteinen (b', weiße Pfeile) sind sehr selten zu beobachten. Größenbalken, 5 µm.

4.2.2 Biochemische Subfraktionierung von Myelin und oligodendroglialen Zellmembranen

Aufgrund ihrer charakteristischen biochemischen Zusammensetzung können die Subdomänen der Myelinmembran über einen Saccharose-Stufengradienten aufgetrennt werden (Matthieu et al., 1973; Rios et al., 2000). Kompaktes Myelin flotierte in diesem Gradienten u.a. in die Fraktion mit geringer Saccharosedichte ("leichte" Membranen), wohingegen Komponenten des nicht-kompakten Myelins ausschließlich mit der mittleren und schweren Fraktion assoziieren. Im folgenden Versuch sollten die Beobachtungen, dass PLP, MAG und MOG wie im Myelin, auch in pOI mit unterschiedlichen Membrandomänen assoziieren (Abb. 4.1) biochemisch unterstützt werden. Dazu wurde die Methode der Membranfraktionierung auf pOI angewendet. Um die Verteilung der Myelinproteine in den Subdomänen der oligodendroglialen Plasmamembran mit deren Verteilung im Myelin vergleichen zu können, wurde im folgenden Versuch P10 Myelin verwendet, da sich dieses in einem analogen Entwicklungsstadium zu differenzierten pOI *in vitro* befindet.

Für die Fraktionierung wurden aufgereinigte Myelinmembranen und aus dem post-nukleären Überstand (PNS = *post nuclear supernatant*) von pOI pelletierte Zellmembranen, über einen Stufengradienten in "leichte" (L), "mittelschwere" (M) und "schwere" (S) Membranen aufgetrennt (Abb. 4.2 A). Die aufbereiteten Membranfraktionen wurden in RIPA-Puffer solubilisiert und mittels Western-Blot analysiert (Abb. 4.2 B).

Claudin 11/OSP, welches die Paranodien von kompaktem Myelin abgrenzt, wurde als zusätzlicher Marker für nicht-kompaktes Myelin verwendet. Das SNARE Protein Syntaxin 6, welches auf Endosomen und dem *trans*-Golgi Netzwerk (TGN) lokalisiert ist, diente als Marker für intrazelluläre Membranen. Dessen Ausschluss aus der "leichten" Gradientenfraktion zeigt, dass diese nicht durch intrazelluläre Membranen verunreinigt ist. Die Myelinproteine PLP, MAG, MOG und OSP verteilen sich im Myelin- und Oligodendrozytengradienten sehr ähnlich. PLP und MOG flotieren in die leichte Gradientenfraktion, wohingegen MAG und OSP ausschließlich in der schweren Fraktion repräsentiert sind.

Daraus lässt sich schließen, dass pOI *in vitro* Membrandomänen entwickeln, die in ihrer biochemischen Zusammensetzung den Myelindomänen ähneln.

4. Ergebnisse

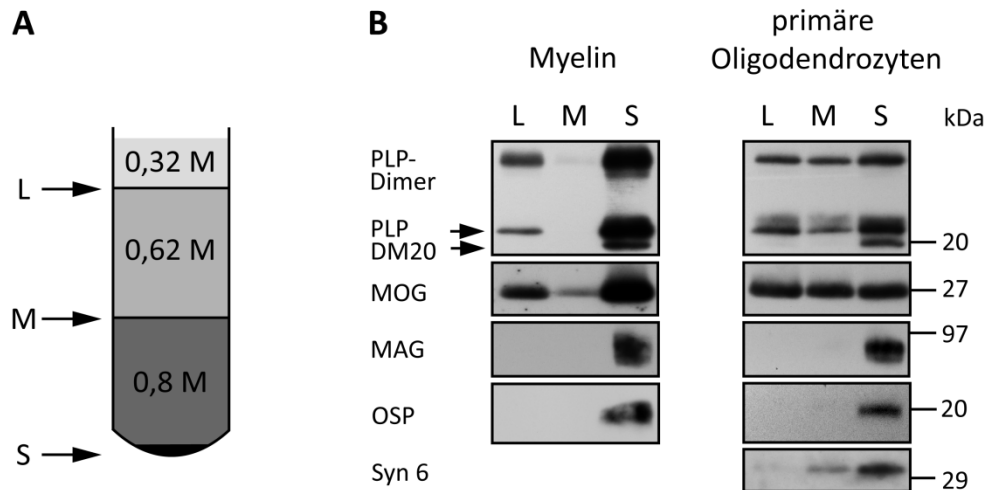


Abb. 4.2: Subfraktionierung von Myelin und oligodendroglialen Zellmembranen.

POI wurden mit 10 mM Tris, pH 7,4 homogenisiert und für 10 min bei 300 x g zentrifugiert. Der daraus resultierende PNS wurde für weitere 15 min bei 20.000 x g zentrifugiert. Das 20.000 x g Membranpellet sowie P10 Myelin wurden über einen Saccharose-Stufengradienten in "leichte" (L), "mittelschwere" (M) und "schwere" (S) Membranfraktionen aufgetrennt (A). Die Fraktionen wurden einmal mit 10 mM Tris, pH 7,4 gewaschen, für 15 min bei 100.000 x g pelletiert, in RIPA-Puffer solubilisiert und mit Antikörpern gegen PLP, MAG, MOG, OSP und Syntaxin 6 mittels Western-Blot analysiert (B). OSP dient als Marker für nicht-kompaktes Myelin, Syn 6 als Marker für intrazelluläre Membranen (Endosomen und Golgi-Apparat). Die Verteilung der Proteine ist im Myelin- und pOI-Gradienten ähnlich. PLP und MOG assoziieren mit den "leichten" Membranen (L), MAG, OSP und Syn6 sind ausschließlich in der "schweren" Fraktion (S) detektierbar.

4.2.3 Kolokalisierung von PLP und LAMP1

In Oligodendrozyten ist sowohl *in vivo* als auch *in vitro* ein erheblicher Teil des Hauptmyelinproteins PLP in spät endosomalen/lysosomalen Kompartimenten (LE/Lys) angereichert (Krämer et al., 2001; Simons et al., 2002; Trajkovic et al., 2006).

Um die endosomale Verteilung von PLP während der Entwicklung von primären Oligodendrozyten morphologisch zu analysieren, wurden die Zellen nach 3, 5 und 8 Tagen in Kultur durch Doppelimmunmarkierung mit dem Lysosomen-assoziierten Membranprotein 1 (LAMP1) als Marker für LE/Lys untersucht (Abb. 4.3).

Nach 3 Tagen haben die Zellen noch keine ausgedehnten Membranstrukturen ausgebildet. In diesem Reifestadium ist PLP hauptsächlich in intrazellulären Organellen lokalisiert. Zwar ist hin und wieder eine Kolokalisierung mit LAMP1 (Abb. 4.3 A, Tag 3, vergrößerte Darstellung, Pfeil) zu beobachten, jedoch ist diese nach 3 Tagen noch nicht sehr prominent. Nach 5 Tagen hingegen zeigt die starke Kolokalisierung von PLP mit LAMP1 die Anreicherung von PLP in großen LE/Lys im Zellkörper und in den Fortsätzen (Abb. 4.3 A, Tag 5). Nach 8 Tagen haben die LE/Lys an Größe abgenommen und sind weit verbreitet, sowohl im

4. Ergebnisse

Zellkörper als auch in flächigen, PLP enthaltenden Membranfortsätzen zu beobachten. PLP kolokalisiert u.a. in den distalen Fortsätzen mit LAMP1 (Abb. 4.3 A, Tag 8, vergrößerte Darstellung mit Strich, Pfeile). Die Lokalisierung von PLP in den perinukleären LE/Lys ist hingegen stark reduziert (Abb. 4.3 A, vergrößerte Darstellung mit Stern).

Um zu analysieren, ob die PLP enthaltenden LE/Lys mit der Plasmamembran fusionieren, wurden die Zellen lebend mit einem anti-PLP Antikörper (O10, rot) gefärbt, der an die extrazelluläre Domäne des Moleküls bindet und daher ausschließlich an der Zelloberfläche lokalisiertes PLP markiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mit anti-LAMP1 Antikörpern doppelgefärbt (Abb. 4.3 B). In einigen Regionen befindet sich LAMP1 zusammen mit PLP in der Plasmamembran, was auf die gemeinsame Exozytose aus sekretorischen Lysosomen hinweist (Abb. 4.3 B, vergrößerte Darstellung, Pfeile).

Um Aufschluss über die Ultrastruktur der PLP enthaltenden LE/Lys zu erhalten, wurden differenzierte pOI mittels Immuno-Elektronenmikroskopie mit anti-PLP (P6, 10 nm-gold) und –LAMP1 (15 nm-gold) Antikörpern sowie gold-gekoppelten Sekundärantikörpern untersucht (Abb. 4.3 C).

PLP ist in bis zu ca. 500 nm großen multivesikulären und multilamellaren (Abb. 4.3 C, a u. b, schwarze Sterne) Organellen zu beobachten. Die multilamellaren Strukturen (MLMs) enthalten sowohl PLP, als auch LAMP1 (Abb. 4.3 C, b, c, orange Pfeile = LAMP1) und erinnern in ihrer Ultrastruktur an Myelin (Abb. 2.2). Sie sind u.a. intrazellulär in der Nähe der Zelloberfläche (Abb. 4.3 C, b, weiße Pfeilspitze) zu beobachten. In Abb. 4.3 C, c ist ein Zellfortsatz dargestellt. Zwar ist hier die Topologie der MLMs schwer zu beurteilen; jedoch legen die Interpretation der EMs eine extrazelluläre Lokalisierung nahe (Abb. 4.3 C, c, weiße Pfeile).

Diese Beobachtungen weisen daraufhin, dass PLP enthaltende LE/Lys an der Exozytose von PLP und möglicherweise an der Bildung von ausgedehnten Membranfortsätzen beteiligt sind. Im folgenden Abschnitt sollte daher die Lokalisierung von PLP und LAMP1 in auswachsenden Fortsätzen genauer betrachtet werden.

4. Ergebnisse

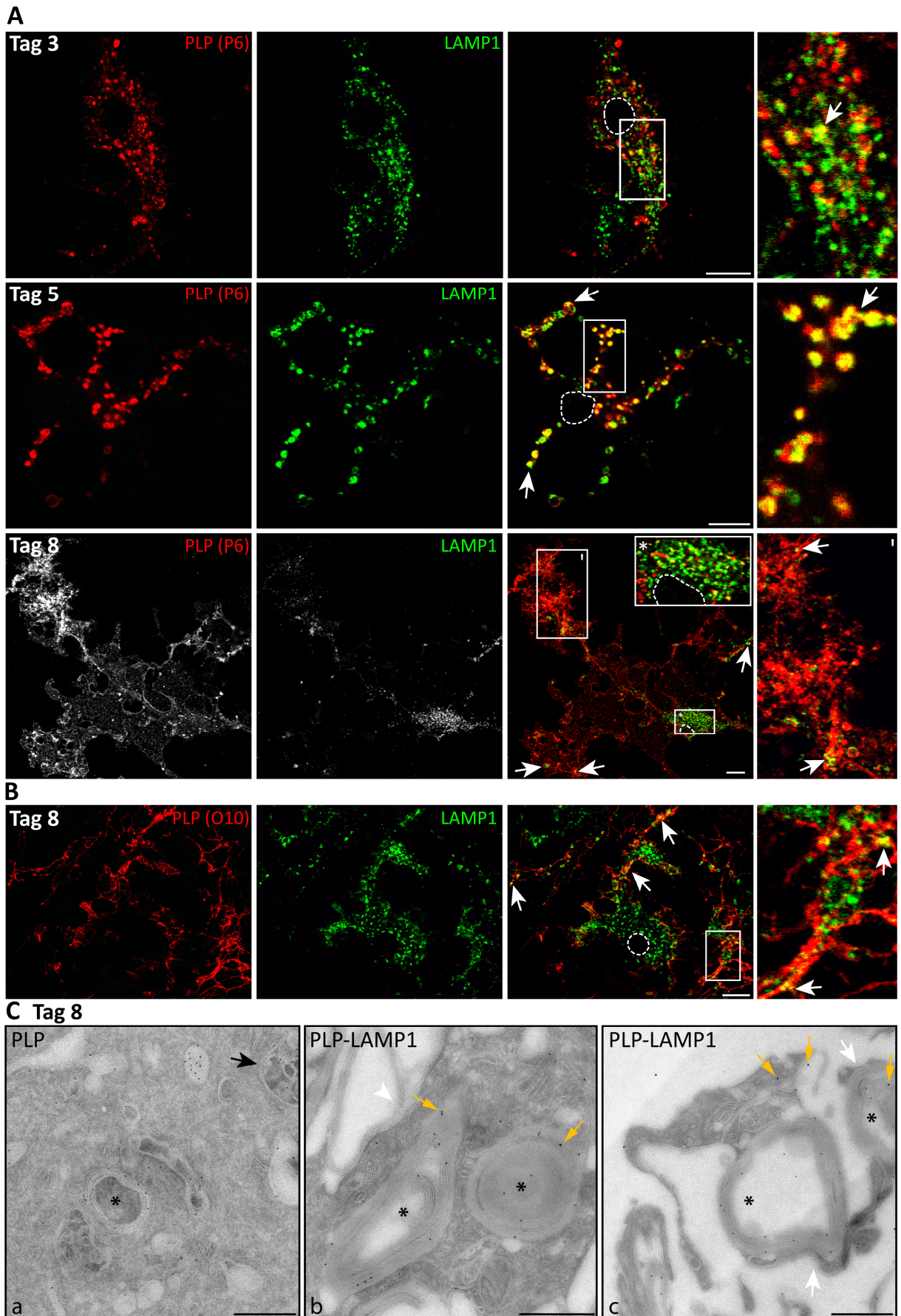


Abb. 4.3: Kolokalisierung von PLP mit LAMP1 in LE/Lys und an der Zelloberfläche.

(A, B) Doppelimmunfluoreszenz von pOI mit Antikörpern gegen das Hauptmyelinprotein PLP (rot) und den

4. Ergebnisse

LE/Lys Marker LAMP1 (grün). Die markierten Ausschnitte sind vergrößert dargestellt. Die gestrichelten Linien markieren die Zellkerne. (A) Die Zellen wurden nach 3, 5 und 8 Tagen in Kultur fixiert, permeabilisiert und mit anti-PLP (P6, rot) und anti-LAMP1 (grün) Antikörpern doppelmarkiert. (B) Nach der Zelloberflächenfärbung von pOI (8 Tage in Kultur) mit einem spezifischen Antikörper gegen ein extrazelluläres Epitop von PLP (O10, rot), wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mit anti-LAMP1 Antikörpern doppelgefärbt (grün). Nach 5 Tagen in Kultur ist PLP stark in LE/Lys angereichert (Tag 5, gelb, weiße Pfeile). Nach 8 Tagen in Kultur ist eine Kolokalisierung mit LAMP1 an der Plasmamembran zu beobachten (A, Tag 8, weiße Pfeile; B, weiße Pfeile). Größenbalken, 10 µm. (C) Einzel- (a) bzw. Doppelimmuno-EM (b, c) von pOI (8 Tage in Kultur) mit Antikörpern gegen PLP (P6, 10 nm-gold) und LAMP1 (15 nm-gold). PLP ist in multivesikulären (schwarzer Pfeil) und – lamellaren (schwarze Sterne), LAMP1 positiven (orange Pfeile) Organellen lokalisiert. Diese befinden sich zum Teil in der Nähe der Zelloberfläche (b, weiße Pfeilspitze) und sind zudem Bestandteile der Membranfortsätze (c, weiße Pfeile). Größenbalken, 500 nm.

4.2.4 Immunzytochemische Lokalisierung von PLP und LAMP1 an der Spitze von wachsenden Membranfortsätzen

Um die Verteilung der LE/Lys in auswachsenden Fortsätzen zu analysieren, wurde PLP in Olineu Zellen exprimiert. Diese ektopische Expression, im Vergleich zur Analyse endogener PLP Expression in pOI hat den Vorteil, dass sich die PLP-Expression und das Auswachsen von Fortsätzen zeitlich gleichschalten lassen.

Um die Verteilung von PLP und LAMP1 während des Fortsatzwachstums zu beobachten, wurde 45 min nach dem Ausplattieren die Differenzierung, d.h. das Fortsatzwachstum der Zellen durch die Beigabe von 1 mM dbcAMP zum Kulturmedium induziert (Jung et al., 1995). Anschließend wurden die Zellen 1 h, 2 h und 24 h nach dem Ausplattieren fixiert, permeabilisiert und mit anti-PLP und anti-LAMP1 Antikörpern doppelgefärbt (Abb. 4.4).

1 h nach der Transfektion exprimieren die Zellen noch nicht ausreichend PLP, um es mittels Immunfluoreszenz detektieren zu können. Allerdings haben sich hier bereits kurze Membranfortsätze ausgebildet in deren Spitzen LAMP1 enthaltende LE/Lys deutlich zu beobachten sind (Abb. 4.4, 1 h, vergrößerte Darstellung, Pfeile). 2 h nach der Transfektion ist PLP zum Einen in kleinen Vesikeln lokalisiert, die sich gleichmäßig über die gesamte Zelle verteilen, zum Anderen ist PLP in LE/Lys zu beobachten, die sich in den auswachsenden Fortsätzen anreichern (Abb.4.4, 2 h, Pfeile). 24 h nach dem Ausplattieren ist die Anzahl kleiner PLP positiver Vesikel reduziert. PLP akkumuliert vollständig in LE/Lys, die auch an den Fortsatzverzweigungen und –spitzen zu beobachten sind (Abb.4.4, Pfeile). Offensichtlich findet ein Transport von PLP in LE/Lys an die Plasmamembran statt. Im Folgenden wurde die Exozytose von LE/Lys genauer untersucht.

4. Ergebnisse

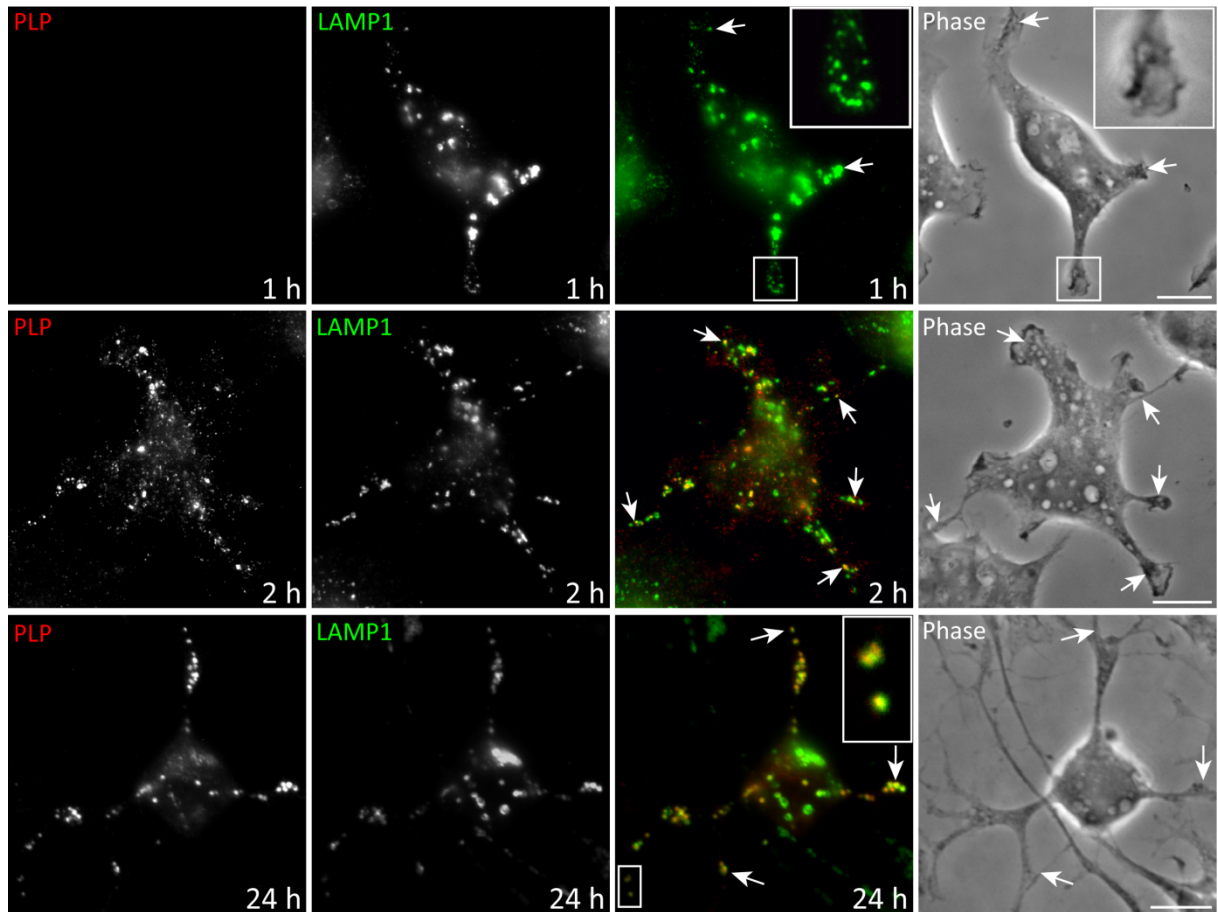


Abb. 4.4: Kolokalisierung von PLP und LAMP1 in wachsenden Membranfortsätzen.

Oli-neu Zellen wurden mittels Nukleofektion mit 4 μ g PLP-DNA transfiziert, ausplattiert und nach 45 min mit 1 mM dbcAMP behandelt. 1 h, 2 h und 24 h nach dem Ausplattieren wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mit anti-PLP (3F4, rot) und anti-LAMP1 (grün) Antikörpern doppelgefärbt. Die rechteckig bzw. quadratisch markierten Ausschnitte sind vergrößert dargestellt. LAMP1 enthaltende LE/Lys sind in den Spitzen der wachsenden Fortsätze lokalisiert (1 h, vergrößerte Darstellung, Pfeile). PLP kolokalisiert mit LAMP1 in den Verzweigungen sowie an den Spitzen der wachsenden Fortsätze (2 h u. 24 h, vergrößerte Darstellung, Pfeile). Größenbalken, 5 μ m.

4.3 Exozytose von Myelinproteinen in Oligodendrozyten

4.3.1 Nachweis der Exozytose von PLP enthaltenden LE/Lys in Oli-neu Zellen

Um die Fusion der PLP enthaltenden LE/Lys an lebenden Zellen nachzuweisen, wurden PLP-EGFP exprimierende Oli-neu Zellen mittels Lebendzellmikroskopie analysiert (Abb. 4.5). Dazu wurden Oli-neu Zellen am Vortag der mikroskopischen Untersuchungen mit dem Fusionsprotein PLP-EGFP transfiziert und auf speziellen Kulturträgern ausplattiert, die im Zentrum mit einem Glasboden ausgestattet sind.

Ohne die Zugabe von dbcAMP konnten innerhalb des durchgeführten Zeitrahmens keine Exozytose-Vorgänge beobachtet werden. Ausschließlich nach der Zugabe von 1 mM dbcAMP konnte innerhalb von ca. 4 min die Fusion eines in der Nähe der Zelloberfläche lokalisierten LE/Lys mit der Plasmamembran beobachtet werden (Abb. 4.5, oranger Pfeil).

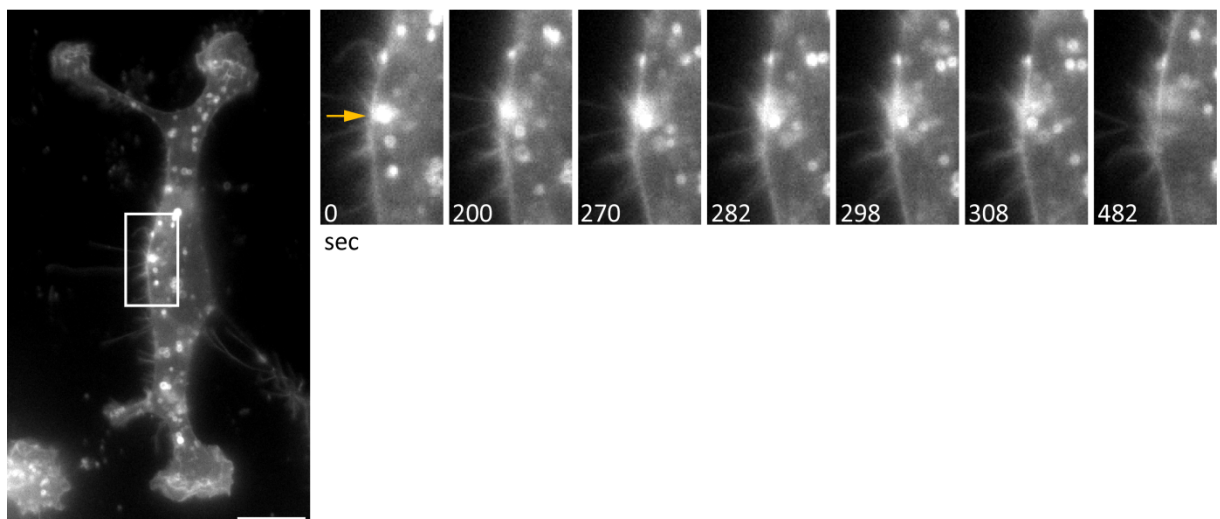


Abb. 4.5: Lebendzellmikroskopie von PLP-EGFP nach dbcAMP-Behandlung von Oli-neu Zellen.

Mit PLP-EGFP transfizierte Oli-Zellen wurden mittels Lebendzellmikroskopie analysiert. Alle 2 sec wurde eine Aufnahme gemacht. Repräsentative Beispiele des rechteckig markierten Ausschnittes sind als Bildfolge dargestellt. Nach der Zugabe von 1 mM dbcAMP konnte innerhalb von ca. 4 min die Fusion eines PLP-EGFP enthaltenden LE/Lys mit der Plasmamembran beobachtet werden (oranger Pfeil). Größenbalken, 10 µm.

Da im Falle einer Fusion der LE/Lys mit der Plasmamembran, das LAMP1 Epitop für den Antikörper (Klon 1D4B) extrazellulär zugänglich wird, wurde im Folgenden ein Versuch zum Nachweis von LAMP1 an der Zelloberfläche nach dbcAMP-Behandlung durchgeführt.

Dazu wurden Oli-neu Zellen mit PLP-EGFP transfiziert und für die Induktion der Differenzierung der Zellen, 5 Tage lang, täglich mit 1 mM dbcAMP behandelt. Anschließend wurden die Zellen einer Lebendfärbung mit anti-LAMP1 Antikörpern unterzogen (Abb. 4.6).

4. Ergebnisse

Einen Tag nach der Behandlung mit dbcAMP besitzen die Zellen eine bipolare Morphologie mit vereinzelt Verzweigungen. PLP ist stark in LE/Lys angereichert und kaum in der Plasmamembran zu beobachten. Zu diesem Zeitpunkt ist kein LAMP1 an der Zelloberfläche detektierbar. 5 Tage nach der dbcAMP-Behandlung haben die Zellen hingegen ein reich-verzweigtes Membrannetzwerk ausgebildet. Die Lokalisierung von PLP ist in den LE/Lys reduziert und an der Plasmamembran verstärkt zu beobachten. Zu diesem Zeitpunkt ist LAMP1 punktförmig über die Fortsätze verteilt an der Zelloberfläche detektierbar. Offensichtlich hat hier eine Exozytose der PLP enthaltenden LE/Lys stattgefunden.

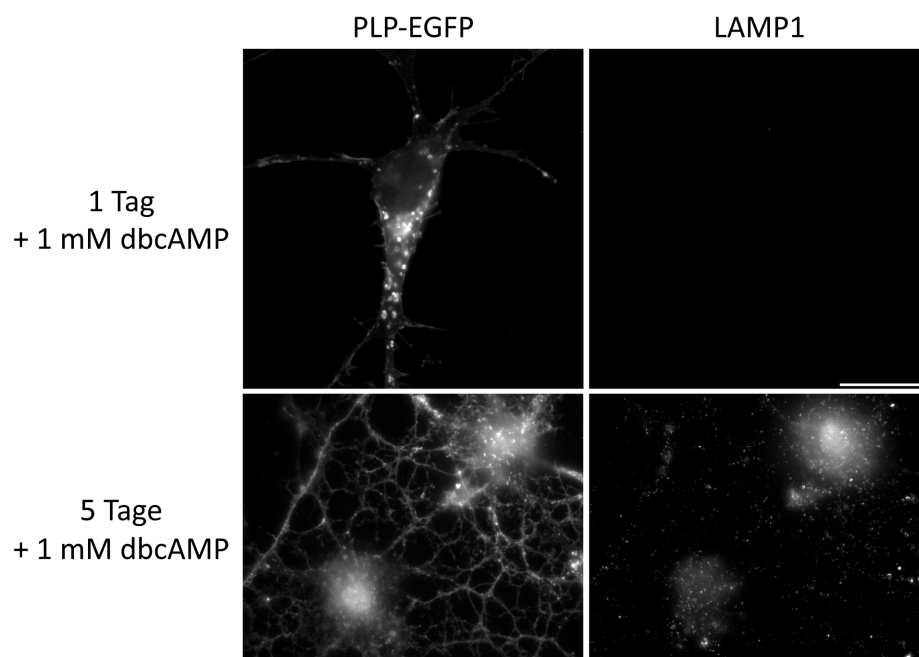


Abb. 4.6: Zelloberflächenfärbung von LAMP1 nach dbcAMP-Behandlung von Oli-neu Zellen.

Oli-neu Zellen wurden mittels Elektroporation mit 20 µg PLP-EGFP-DNA transfiziert und für 1 - 5 Tage mit 1 mM dbcAMP behandelt. Anschließend wurden die Zellen einer Zelloberflächenfärbung mit anti-LAMP1 Antikörpern unterzogen. Nach 5 Tagen Behandlung mit dbcAMP ist LAMP1 an der Zelloberfläche detektierbar. Die dargestellten Bilder wurden mit identischer Belichtungszeit aufgenommen sowie unter Berücksichtigung identischer Parameter bearbeitet. Größenbalken, 10 µm.

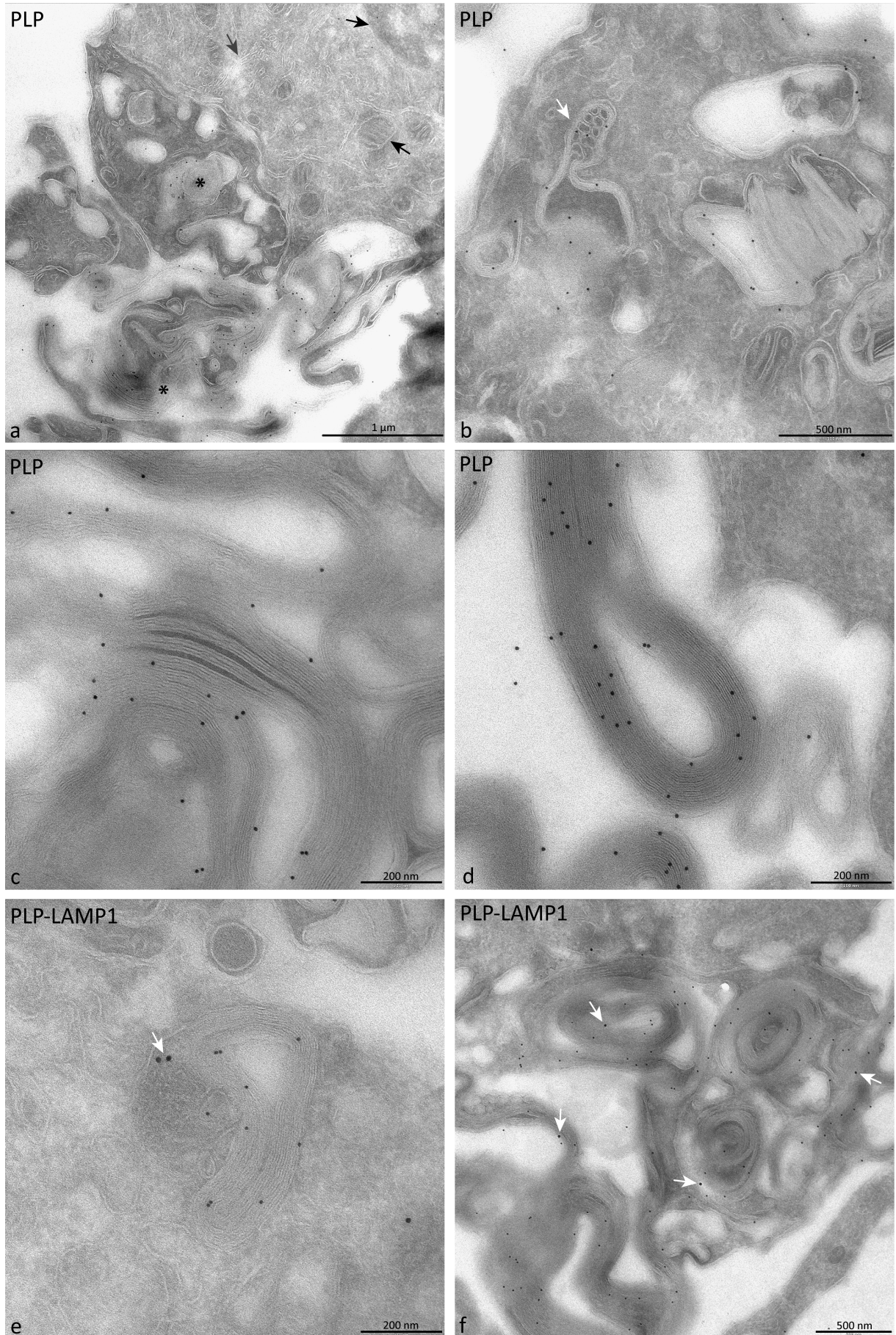
4.3.2 Ca^{2+} -abhängige Translokation von PLP, MAG und MOG an die Plasmamembran von pOI

Die Exozytose von sekretorischen Lysosomen bzw. LROs (Kap. 2.3.4) verläuft nach einem Ca^{2+} -abhängigen Mechanismus. Um die Hypothese zu testen, dass auch die PLP enthaltenden LE/Lys Ca^{2+} -abhängig mit der Plasmamembran fusionieren, wurde der Effekt des Ca^{2+} -Ionophors Ionomycin auf die Lokalisierung von PLP und LAMP1 analysiert. Zum Vergleich wurde auch der Effekt von Ionomycin auf die Verteilung der Myelinproteine MAG und MOG untersucht.

Um die Ultrastruktur der mit Ionomycin behandelten pOI zu analysieren, wurden die Zellen nach einer 1,5 stündigen Inkubation mit 1 μM Ionomycin- Ca^{2+} für die Immuno-Elektronenmikroskopie fixiert und mit anti-PLP, (Abb. 4.7 a - d) –MAG (Abb. 4.7, g) oder –MOG (Abb. 4.7, h) Antikörpern einzel- bzw. anti-PLP (10 nm-gold) und anti-LAMP1 (15 nm-gold) Antikörpern sowie gold-gekoppelten Sekundärantikörpern doppelmarkiert (Abb. 4.7, e u. f). Die Abb. 4.7 a zeigt, dass die Zellen durch die Ionomycin-Behandlung unbeschädigt blieben und intakte Organellen aufwiesen (schwarze Pfeile, v.l.n.r.: Golgi-Apparat, Zellkern, Mitochondrien). Im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Abb. 4.3 C), hat die Ionomycin-Behandlung zur vermehrten Bildung intrazellulärer (Abb. 4.7, b u. e) und extrazellulärer (Abb. 4.7, a, c, d u. f-h) multilamellarer, Myelin-ähnlicher Strukturen (MLMs) geführt. PLP und LAMP1 kolokalisieren sowohl intrazellulär auf multilamellaren LE/Lys und extrazellulär auf MLMs (Abb. 4.7 e u. f, weiße Pfeile = LAMP1).

Prinzipiell sind MAG und MOG auf intrazellulären Organellen schwer detektierbar. MOG ist vor allem auf extrazellulären MLMs zu detektieren (Abb. 4.7, h). MAG ist nach der Ionomycin-Behandlung hauptsächlich auf Exosomen zu beobachten (Abb. 4.7, g, schwarzer Pfeil), die durch die Fusion von MVBs mit der Plasmamembran in den extrazellulären Raum freigesetzt wurden und an der Zelloberfläche haften blieben.

4. Ergebnisse



4. Ergebnisse

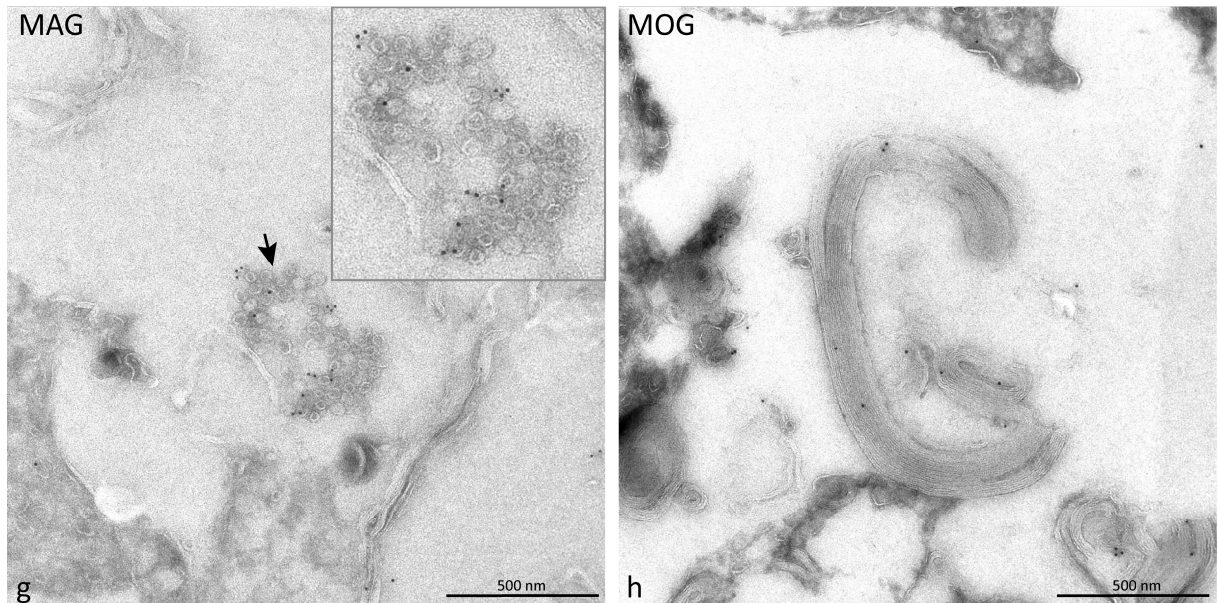


Abb. 4.7: Elektronenmikroskopische Analysen von Ionomycin-behandelten pOI.

POI (8 Tage in Kultur) wurden für 1,5 h mit 1 μM Ionomycin- Ca^{2+} behandelt. Anschließend wurden die Zellen fixiert und mit anti-PLP (a-d), -MAG (g), oder -MOG (h) bzw. anti-PLP (10 nm gold) und anti-LAMP1 (15 nm gold) Antikörpern (e-f), speziesspezifischen Sekundärantikörpern und gold-gekoppeltem Protein A für die Immuno-Elektronenmikroskopie markiert. Die Zellen besitzen nach Ionomycin-Behandlung intakte Organellen (a, schwarze Pfeile v.l.n.r.: Golgi-Apparat, Zellkern, Mitochondrien). Es ist die vermehrte Bildung von intrazellulären (b, e) und extrazellulären (a, d, f-h) multilamellaren Strukturen (MLMs) zu beobachten. PLP und LAMP1 (e, f, weiße Pfeile = LAMP1) kolokalisieren intrazellulär auf multilamellaren LE/Lys (e) und extrazellulär auf MLMs (f). MAG ist nach Ionomycin-Behandlung auf Exosomen detektierbar (g, schwarzer Pfeil). MOG ist hauptsächlich auf extrazellulären MLMs lokalisiert.

4. Ergebnisse

Um den Einfluss der Ca^{2+} -Stimulierung auf die Lokalisierung von PLP, MAG und MOG mittels Immunfluoreszenz zu analysieren, wurden pOI (4 Tage in Kultur) für 1,5 h mit 1 μM Ionomycin- Ca^{2+} behandelt. Anschließend wurden die Zellen mit anti-PLP (aa3), -MAG (513) oder -MOG (8-18-C5) Antikörpern immunzytochemisch gefärbt (Abb. 4.8). Nach 4 Tagen in Kultur sind die Zellen noch nicht ausdifferenziert und haben relativ unverzweigte Membranfortsätze ausgebildet. PLP ist stark in LE/Lys angereichert (Abb. 4.8, obere Reihe Pfeilspitzen) und kaum in der Plasmamembran zu beobachten. Nach Ionomycin-Behandlung ist zwar keine Abnahme von PLP aus LE/Lys, jedoch eine Zunahme von PLP enthaltenden flächigen Membranfortsätzen erkennbar (Abb. 4.8, obere Reihe, Pfeil). Insgesamt sind die Zellen nach Ionomycin-Behandlung morphologisch differenzierter und haben deutlich ausgeprägte flächige Membranen entwickelt.

MAG ist vor und nach Ionomycin-Behandlung im Golgi-Apparat, in den Hauptfortsätzen sowie am äußeren Rand der Membranfortsätze (Abb. 4.8, mittlere Reihe, Pfeile) lokalisiert. Eine Veränderung des Verteilungsmusters ist bei MAG nicht zu beobachten.

MOG ist zunächst hauptsächlich stark in der Plasmamembran des Zellkörpers zu finden (Abb. 4.8, untere Reihe, Pfeilspitze). Nach Ionomycin-Behandlung ist MOG wie PLP, verstärkt in flächigen Membranen zu beobachten (Abb. 4.8, untere Reihe, Pfeil).

Die Stimulierung der Zellen mit Ca^{2+} scheint die Verteilung von PLP und MOG, jedoch nicht von MAG zu beeinflussen.

4. Ergebnisse

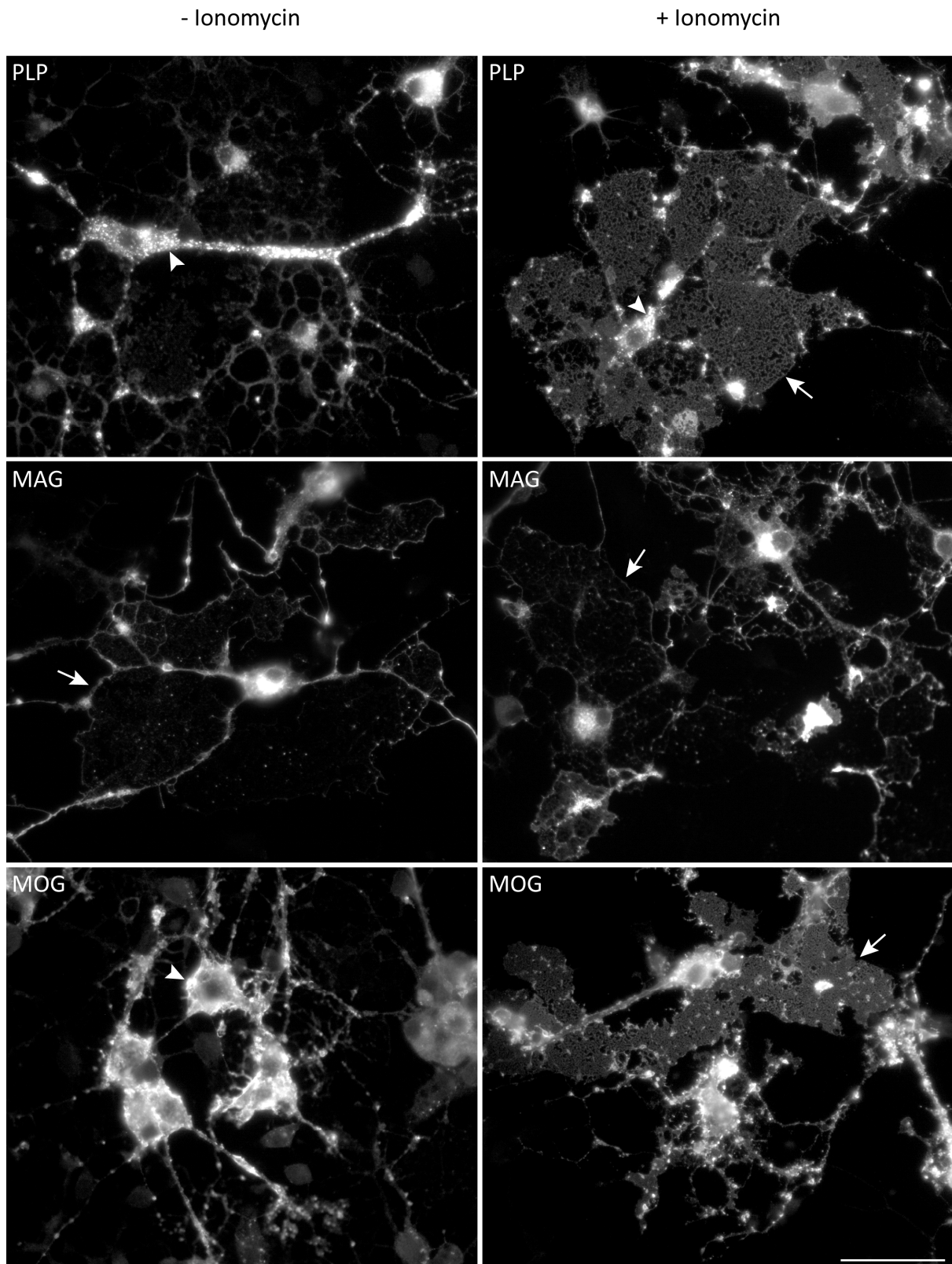


Abb. 4.8: Immunzytochemische Analysen von PLP, MAG und MOG nach Ionomycin-Behandlung.

POI (4 Tage in Kultur) wurden für 1,5 h mit 1 μM Ionomycin- Ca^{2+} behandelt, fixiert, permeabilisiert und mit anti-PLP (aa3), -MAG (513) oder -MOG (8-18-C5) Antikörpern immunzytochemisch gefärbt. PLP ist in LE/Lys angereichert (obere Reihe, Pfeilköpfe). Nach Ionomycin-Behandlung sind PLP und MOG verstärkt in MLMs (obere und untere Reihe, Pfeile) zu beobachten. MAG ist ausschließlich in den Hauptfortsätzen sowie am Rand der MLMs lokalisiert (mittlere Reihe, Pfeile). Die dargestellten Bilder wurden mit identischer Belichtungszeit aufgenommen sowie unter Berücksichtigung identischer Parameter bearbeitet. Größenbalken, 10 μm .

4. Ergebnisse

Da im Falle einer Fusion der LE/Lys mit der Plasmamembran, das LAMP1 Epitop für den Antikörper (Klon 1D4B) extrazellulär zugänglich wird, wurde im Folgenden ein Versuch zum Nachweis von LAMP1 an der Zelloberfläche nach Ionomycin-Behandlung durchgeführt. Dazu wurden pOI nach der Ionomycin-Behandlung einer Lebendfärbung mit anti-PLP (O10) und anti-LAMP1 Antikörpern unterzogen. Beide Antikörper detektieren extrazellulär lokalisierte Epitope der Proteine, so dass bei einer Lebendfärbung ausschließlich an der Zelloberfläche lokalisierte Proteine markiert werden. In diesem Zusammenhang wurde eine ausgedehnte Versuchsreihe durchgeführt, bei der pOI in unterschiedlichen Entwicklungsstadien (4 h - 8 Tage in Kultur) analysiert wurden. Die Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen Ionomycin und Ca^{2+} behandelt sowie unterschiedliche Inkubationszeiten getestet. Anschließend wurden die Zellen für 45 min auf Eis mit Primärantikörpern inkubiert und fixiert (Abb. 4.9).

Bei pOI kann nach 7 Tagen in Kultur, LAMP1 bereits ohne Ionomycin-Behandlung an der Zelloberfläche detektiert werden (Abb. 4.9 A). Die 1,5 stündige Inkubation mit 1 μM Ionomycin und 1 mM Ca^{2+} zeigt einen nur schwachen Effekt (Abb. 4.9 B). Wurden hingegen Zellen nach 5 Tagen in Kultur für 10 min mit 5 oder 10 μM Ionomycin und 1 mM Ca^{2+} inkubiert, so ist eine deutlich verstärkte Zelloberflächenfärbung von LAMP1 zu beobachten. Diese breitet sich zum Einen bis in die PLP-enhaltenden MLMs aus, zum Anderen ist sie in definierten, stark fluoreszierenden Regionen erkennbar (Abb. 4.9 C, Pfeile). Allerdings scheint die Morphologie der Zellen unter dem Einfluss von hohen Konzentrationen Ionomycin zu leiden. Die Zellkörper erscheinen zwar intakt, jedoch sind die Fortsätze nicht mehr so ausgebreitet wie bei unbehandelten Zellen.

Um die Spezifität der LAMP1 Zelloberflächenfärbung abzusichern, wurden die Zellen unter Aussparung des Primärantikörpers wie oben immunzytochemisch gefärbt (Abb. 4.9 D). Bei gleicher Belichtungszeit sind keine unspezifischen Bindungen des Sekundärantikörpers zu beobachten.

Oli-neu Zellen reagierten bereits auf geringe Ionomycin-Konzentrationen mit einem Absterben, woraufhin die Versuche abgebrochen wurden.

4. Ergebnisse

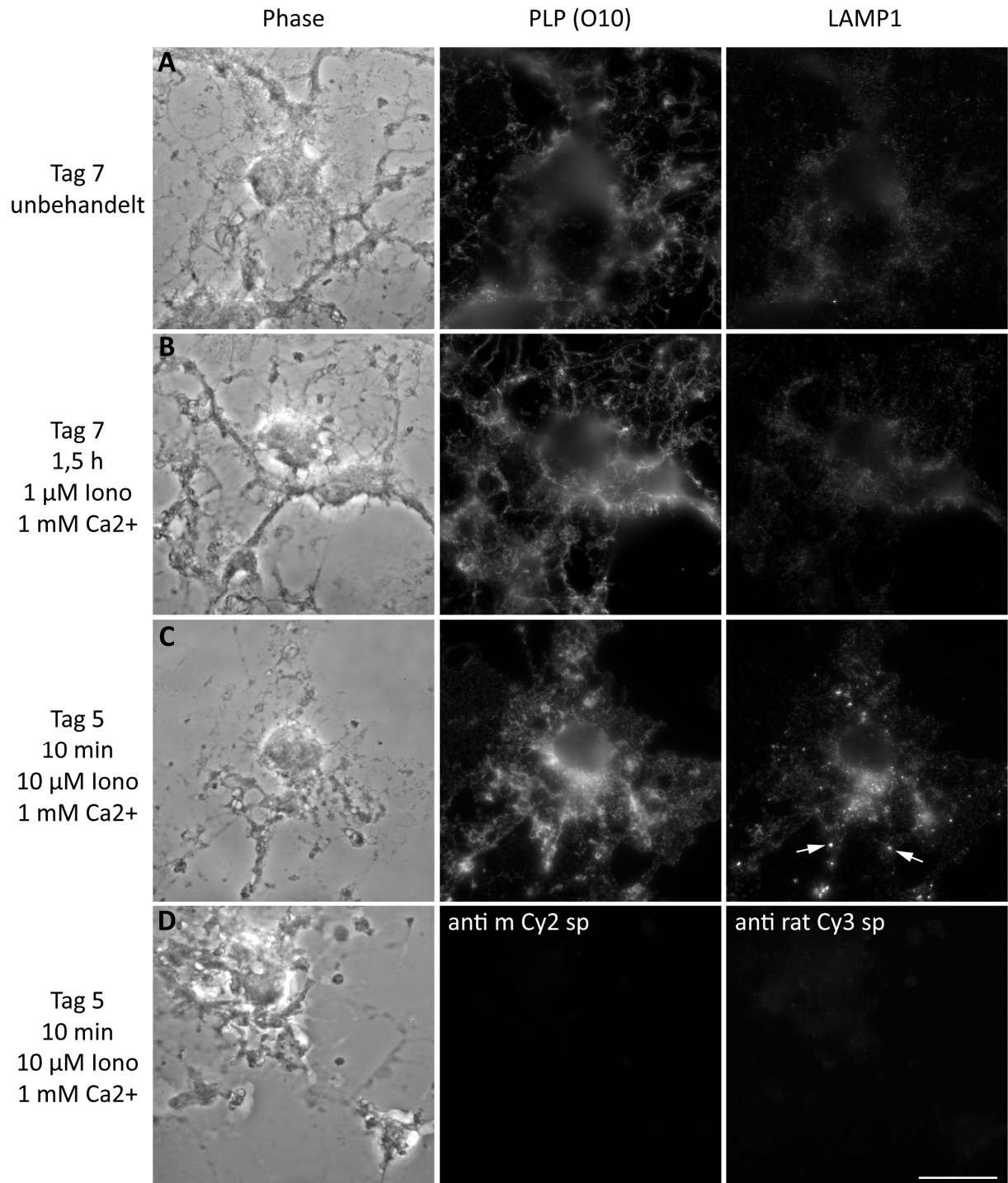


Abb. 4.9: Zelloberflächenfärbung von PLP und LAMP1 nach Ionomycin-Behandlung von pOI.

Unbehandelte (A, 7 Tage in Kultur), für 1,5 h mit 1 μ M Ionomycin und 1 mM Ca^{2+} (B, 7 Tage in Kultur) oder für 10 min mit 10 μ M Ionomycin und 1 mM Ca^{2+} behandelte pOI (C, 5 Tage in Kultur) wurden lebend mit anti-PLP (O10) und -LAMP1 Antikörpern inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und mit Fluorochromgekoppelten Sekundärantikörpern markiert. LAMP1 ist bereits ohne Ionomycin-Behandlung an der Zelloberfläche detektierbar (A). Geringe Konzentrationen Ionomycin sowie lange Inkubationszeiten zeigen kaum Effekt (B). Hohe Konzentrationen Ionomycin sowie kurze Inkubationszeiten zeigen die Translokation von LAMP1 an die Zelloberfläche (C, orange Pfeile). (D) Negativkontrolle. Die Zellen wurden wie oben unter Aussparung der Primärantikörper immunzytochemisch gefärbt. Alle Bilder wurden mit identischer Belichtungszeit aufgenommen sowie unter Berücksichtigung identischer Parameter bearbeitet. Größenbalken, 10 μ M.

Ca²⁺-Stimulierung führt zur vermehrten Bildung von extrazellulären und intrazellulären multilamellaren Strukturen (MLMs) und zur Translokation von PLP, MOG und LAMP1 an die Plasmamembran von pOI. Da sich dieser Effekt mittels Immunfluoreszenz schwer quantifizieren ließ, sollte zu diesem Zweck im Folgenden eine biochemische Methode angewendet werden.

4.3.3 Präparation von MLMs nach Ionomycin-Behandlung

Da MLMs im Aufbau und Struktur dem Myelin ähnlich sind, lassen sie sich wie dieses, mittels Dichtegradientenzentrifugation isolieren. Um den potentiellen Effekt der Ionomycin-Behandlung auf die Bildung von MLMs biochemisch zu analysieren und quantifizieren, wurden die MLMs über einen Saccharose-Dichtegradienten von anderen Zellmembranen getrennt (Schneider et al., 2005) und mittels Western-Blot auf die Präsenz von PLP und LAMP1 überprüft.

Im unten dargestellten Ansatz wurden unbehandelte sowie für 1,5 h mit 1 µM Ionomycin behandelte pOI (5 Tage in Kultur) homogenisiert und ein PNS hergestellt. Aus diesem wurden die Membranen pelletiert und über einen Saccharose-Stufengradienten aufgetrennt (Abb. 4.10 A). Die MLMs wurden nach der Ultrazentrifugation an der 0,25/0,85 M Interphase abgesammelt und die restlichen Membranen wurden aus dem pelletierten Material gewonnen und mittels Western-Blot analysiert (Abb. 4.10 B).

Da bei den beiden Ansätzen nicht davon ausgegangen werden kann, dass exakt die gleiche Zellzahl eingesetzt wurde, ist für die Quantifizierung das Verhältnis von MLMs zu Membranpellet ausschlaggebend. In Abb. 4.10 ist nach Ionomycin-Behandlung der Zellen eine leichte Zunahme von PLP und LAMP1 in den MLMs zu beobachten, wohingegen die Verteilung des Transferrin-Rezeptors (TfR) unverändert bleibt. Zwar könnte diese Beobachtung auf eine Translokation von PLP und LAMP1 in die MLMs hinweisen, jedoch war das Ergebnis nicht eindeutig reproduzierbar und wurde daher nicht statistisch ausgewertet. Innerhalb der Versuchsreihe wurden 4 Experimente unabhängig voneinander durchgeführt. Dabei wurden verschiedene Konzentrationen Ionomycin und Ca²⁺ sowie unterschiedliche Inkubationszeiten getestet.

Zusammengefasst ermöglichten die durchgeführten Versuche mit Ionomycin behandelten Zellen keine Quantifizierung der Ergebnisse und zeigten somit keine eindeutigen Resultate.

4. Ergebnisse

Die Zellen sind gegenüber hohen Ionomycin Konzentrationen sehr sensitiv, was die beobachteten Ergebnisse in Frage stellt.

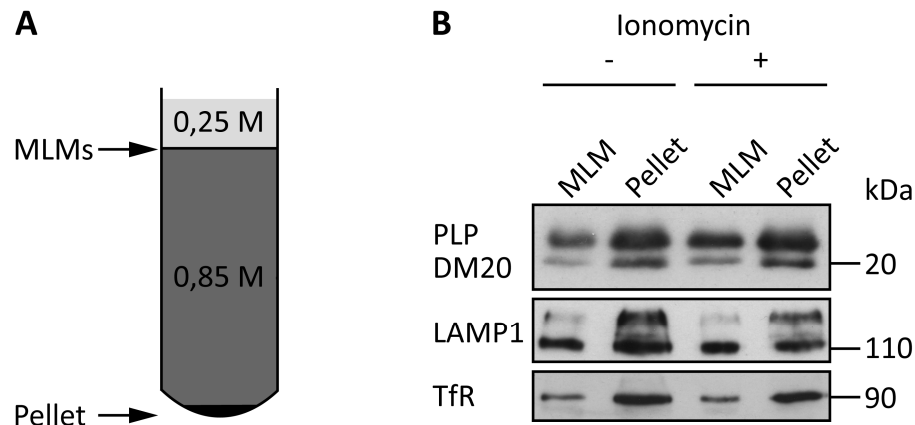


Abb. 4.10: Präparation von MLMs nach Ionomycin-Behandlung.

Unbehandelte (-) und für 1,5 h mit 1 μ M Ionomycin behandelte (+) pOI (5 Tage in Kultur) wurden homogenisiert, ein PNS wurde hergestellt und aus diesem die Membranen durch Zentrifugation bei 20.000 x g und 4°C für 10 min pelletiert. Das Membranpellet wurde in 2 ml 0,85 M Saccharoselösung resuspendiert, mit 200 μ l 0,25 M Saccharoselösung überschichtet und für 30 min bei 50.000 x g und 4°C zentrifugiert. Die an der 0,85/0,25 M Interphase abgesammelten MLMs sowie die restlichen pelletierten Membranen wurden mit 50 mM Tris/5mM EDTA/1 mM PMSF gewaschen, für 30 min bei 50.000 x g und 4°C pelletiert, in 50 μ l Lysis-Puffer resuspendiert und mittels Western-Blot analysiert.

4.3.4 Exosomen-Präparation aus dem Kulturüberstand von pOI

Als Nachweis der Exozytose von LE/Lys wurden im Laufe dieser Arbeit Exosomen aus dem Kulturüberstand von pOI präpariert (Kap. 2.3.5).

Tote Zellen und Membranfragmente wurden durch zwei differentielle Zentrifugationsschritte des Kulturüberstandes pelletiert und verworfen. Aus dem resultierenden Überstand wurden die Exosomen durch Ultrazentrifugation für 2 h bei 100.000 x g pelletiert und mittels Western-Blot analysiert. Parallel wurde aus den identischen Zellen eine Gesamtmembranfraktion erstellt und als Positivkontrolle mit analysiert (Abb. 4.11 B).

Die Abwesenheit der NaK-ATPase, des Transferrin-Rezeptors (TfR) und des SNARE Proteins Syntaxin 6 (Syn 6) schließen grobe Verunreinigungen durch Plasmamembranfragmente, Recycling-Endosomen und Golgi-Apparat in der Exosomen-Fraktion aus. Interessanterweise können die Myelinproteine PLP und MOG sowie einige SNARE-Proteine in der Exosomen-Fraktion detektiert werden. Die Anwesenheit des mittels EM auf Exosomen lokalisierten Myelinproteins MAG, konnte aufgrund reduzierender Bedingungen während der

4. Ergebnisse

Gelelektrophorese hier nicht analysiert werden. Eine präzisere Aufreinigung und Charakterisierung der Exosomen würde eine Dichtegradientenzentrifugation der Exosomen-Fraktion erfordern. Die selektive Freisetzung von Myelinproteinen durch Exosomen ist ein interessanter Aspekt des Membrantransports in Oligodendrozyten, stellt jedoch im Rahmen der Myelinbildung kein eindeutiges Maß für die Exozytose von Myelinproteinen dar. Deshalb wurde eine präzisere Untersuchung der Exosomen im Rahmen dieser Arbeit nicht unternommen, jedoch im Laufe einer Diplomarbeit fortgeführt.

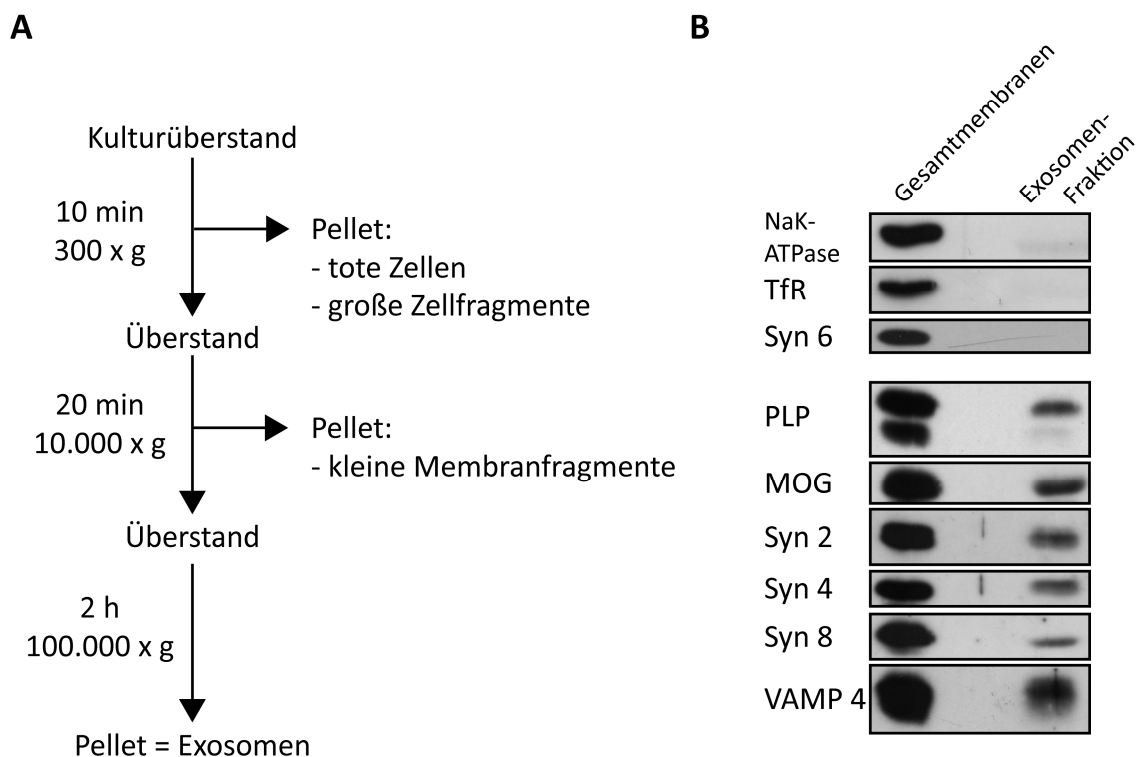


Abb. 4.11: Präparation von Exosomen aus dem Kulturüberstand von pOI.

(A) Zur Gewinnung von Exosomen wurden 26 ml Kulturüberstand von pOI (8 Tage in Kultur) drei differentiellen Zentrifugationsschritten unterzogen. Das Exosomen enthaltende 100.000 x g Pellet wurde in SDS-Probenpuffer aufgenommen und mittels Western-Blot analysiert (B). Parallel wurden aus den Zellen die Membranen präpariert und als Positivkontrolle mit analysiert. Die intrazelluläre Lokalisierung der verwendeten Antigene ist wie folgt: NaK-ATPase = Plasmamembran; TfR = Plasmamembran, RE, Golgi-Apparat; Syn 6 = Endosomen, Golgi-Apparat; PLP u. MOG = Myelinproteine; Syn 2 u. 4 = Plasmamembran; Syn 8 = LE; VAMP4 = Golgi-Apparat.

Zusammengefasst war das Exozytose-Verhalten der Myelinproteine mit den oben verwendeten Methoden schwer zu erfassen, da bereits ohne externen Stimulus ein Großteil der Proteine in der Plasmamembran angereichert ist.

4.4 Analysen zum endosomalen Transport von PLP, MAG und MOG

4.4.1 Unter *Steady State*-Bedingungen ist ausschließlich PLP in endosomalen Kompartimenten angereichert

Die Ergebnisse aus Kap. 4.2.3, 4.2.4 und 4.3 sowie die von (Trajkovic et al., 2006) gezeigten Daten weisen daraufhin, dass PLP über die Exozytose von LE/Lys an die Plasmamembran von Oligodendrozyten transportiert wird, was zur Bildung von MLMs bzw. Myelin beiträgt. Aufgrund dieser Beobachtungen stellte sich die Frage, ob sich endosomales Recycling auf das Hauptmyelinprotein PLP beschränkt oder ob auch andere Myelinproteine diesem Transportweg unterliegen. Daher wurde die endosomale Lokalisierung von PLP, MAG und MOG in primären Oligodendrozyten immunzytochemisch analysiert (Abb. 4.12).

Die Zellen wurden mit dem Recycling-Endosomen (RE)-Marker Transferrin-FITC (Tfr-FITC) markiert und anschließend mit anti-PLP, -MAG oder -MOG und -LAMP1 Antikörpern doppelgefärbt (Abb. 4.12). Eine Lokalisierung der Proteine in den LE/Lys stellt sich in den überlagerten Bildern in Magenta dar, eine Lokalisierung in den RE in Gelb.

Wie schon gezeigt, kolokalisiert PLP mit LAMP1 (Abb. 4.12, vergrößerte Darstellung). Sowohl MAG als auch MOG zeigen hingegen kaum Kolokalisierung mit LAMP1. Da in differenzierten pOI die Aufnahme von Tfr über den Tfr-Rezeptor sehr gering ist, ist ein Großteil des Tfr-FITC an der Zelloberfläche an den Rezeptor gebunden und markiert daher die Fortsätze und den Zellkörper. Die normalerweise perinukleär akkumulierenden RE sind hier relativ schwach gefärbt. Ein geringer Teil der Myelinproteine kolokalisiert mit Tfr-FITC, jedoch ist keines in den RE angereichert. Die spät endosomale Anreicherung ist daher spezifisch für PLP.

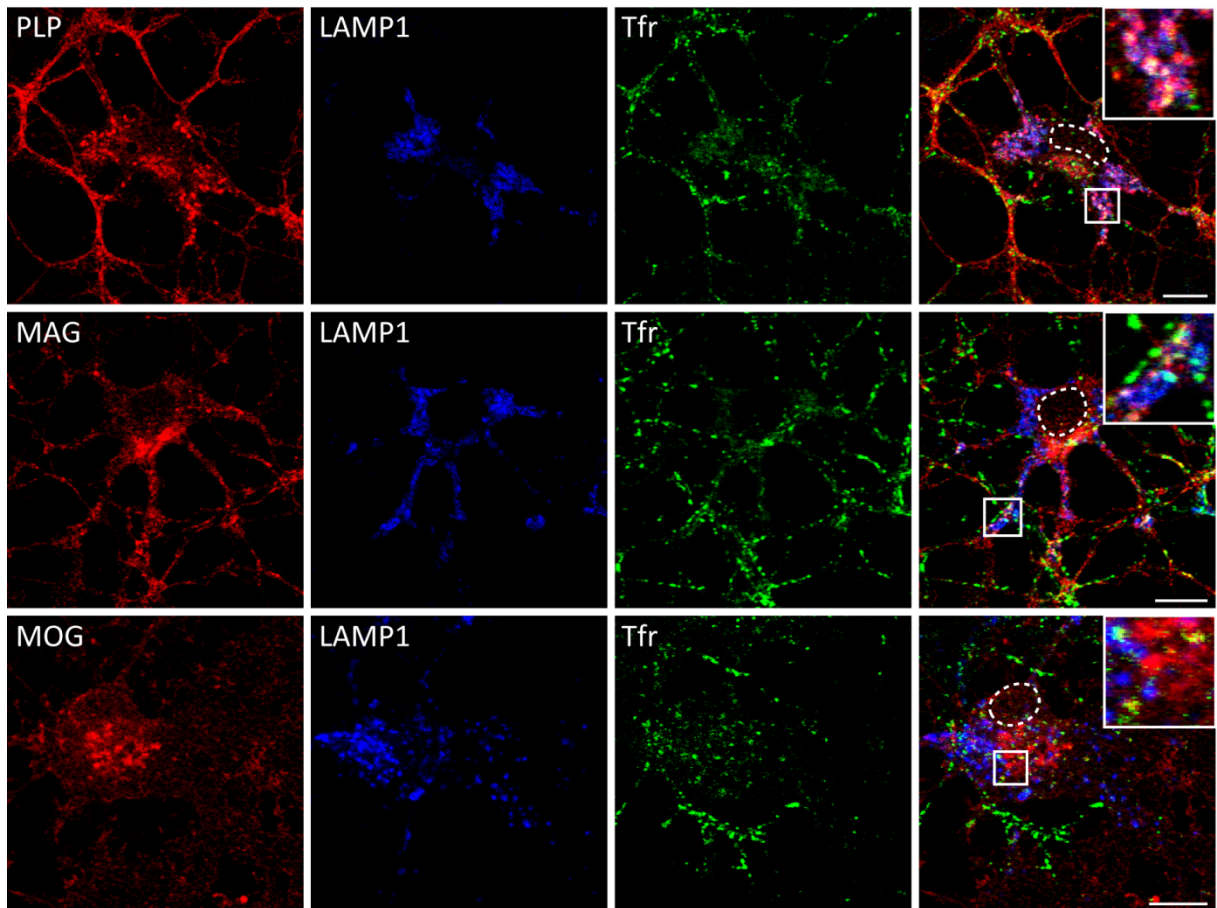


Abb. 4.12: Triplefärbungen von primären Oligodendrozyten mit PLP, MAG oder MOG, dem LE/Lys Marker LAMP1 und dem RE Marker Tfr.

Um RE zu markieren, wurden primäre Oligodendrozyten (5 Tage in Kultur) für 1 h mit 30 µg/ml Tfr-FITC (grün) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und jeweils mit Antikörpern gegen die Myelinproteine PLP, MAG oder MOG (rot) und dem LE/Lys Marker LAMP1 (blau) gefärbt. Die Lokalisierung der Myelinproteine in RE ist in Gelb, in LE/Lys hingegen in Magenta dargestellt. Die Zellkerne sind mit einer gestrichelten Linie weiß umrandet. Die Abbildung zeigt einzelne konfokale Ebenen. Die quadratisch markierten Ausschnitte sind vergrößert dargestellt. PLP ist in LE/Lys angereichert. MAG und MOG sind nur geringfügig in endosomalen Kompartimenten detektierbar. Größenbalken, 10 µm.

4.4.2 Endozytose von zelloberflächenbiotinylierten Myelinproteinen

Zwar zeigen die immunzytochemischen Analysen aus Kap. 4.4.1, dass ausschließlich PLP in endosomalen Kompartimenten akkumuliert, jedoch sind transiente Lokalisierungen von Proteinen unter *Steady State*-Bedingungen oft nicht detektierbar.

Um die potentielle Endozytose von PLP, MAG und MOG in einem *Pulse Chase*-System dynamisch verfolgen zu können, wurden pOI und transient transfizierte Oli-neu Zellen einer Zelloberflächenbiotinylierung unter Verwendung eines reduzierbaren (abspaltbaren) Biotins (Abb. 3.1) unterzogen. Um die Endozytose der biotinylierten Zelloberflächenproteine zu ermöglichen, wurden die Zellen für 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das nach der

4. Ergebnisse

Endozytose noch an der Zelloberfläche gebundene Biotin durch Reduktion seiner Disulfidbindung mit DTT abgespalten. Endozytiertes Biotin war hingegen vor einer Abspaltung geschützt, wodurch endozytierte, biotinylierte Proteine mittels Neutravidin-*Beads* aus den Zell-Lysaten präzipitiert und mittels Western-Blot analysiert werden konnten (Abb. 4.13 B, C a).

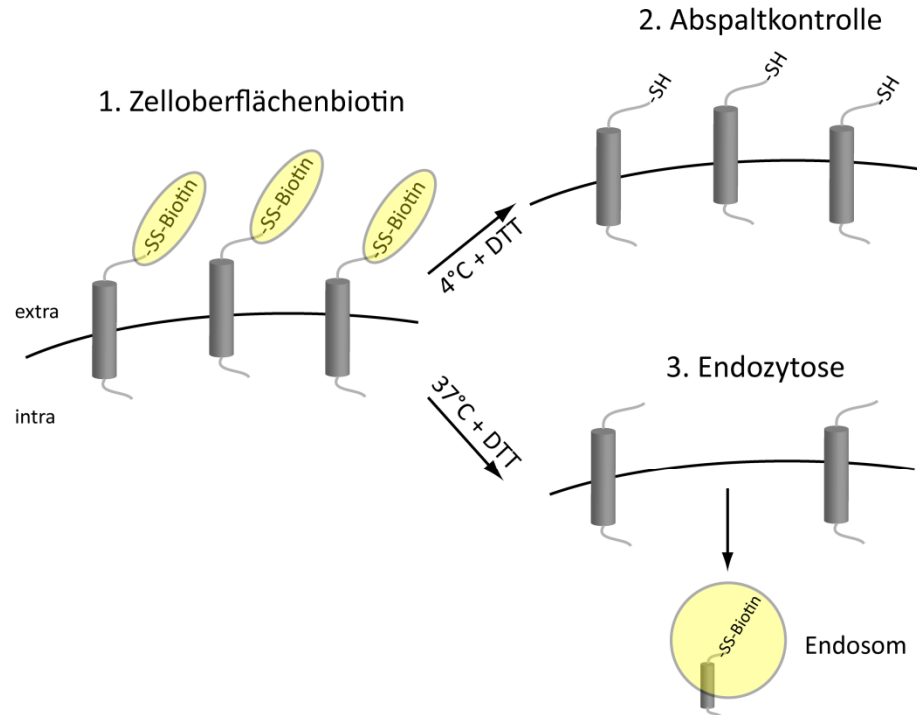
Folgende Kontrollansätze wurden parallel zu dem oben beschriebenen Ansatz durchgeführt:

1. Kontrolle Zelloberflächenbiotinylierung (ohne Endozytose, ohne Abspaltung; Abb. 4.13, Zelloberflächenbiotin).
2. Abspaltkontrolle: Zelloberflächenbiotinylierung, ohne Endozytose (1 h 4°C), mit Abspaltung des Zelloberflächenbiotins (Abb. 4.13, Abspaltkontrolle).
3. Endozytose: Zelloberflächenbiotinylierung, Endozytose, mit Abspaltung des Zelloberflächenbiotins (Abb. 4.13, Endozytose).

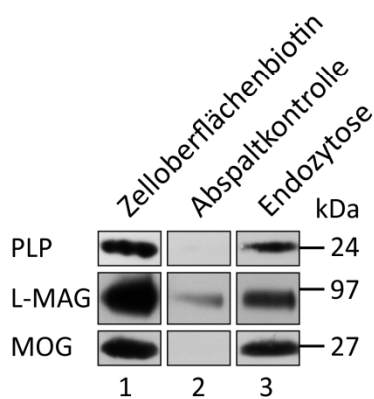
Die Spur 1 zeigt die Effizienz der Zelloberflächenbiotinylierung, die Spur 2 die der Abspaltung des Zelloberflächenbiotins. Die Abspaltung erfolgte nicht immer hundertprozentig oder während der Inkubation bei 4°C wurde ein geringer Anteil der biotinylierten Proteine endozytiert und dadurch vor der Reduktion mit DTT geschützt. Jedoch machen die stärkeren Signale in Spur 3, im Vergleich zur Abspaltkontrolle (Spur 2) deutlich, dass die Myelinproteine endozytiert wurden. NaK-ATPase diente als Plasmamembranmarker und wurde im Gegensatz zu den Myelinproteinen nicht endozytiert. Für pOI wurden 3 unabhängig voneinander durchgeführte Experimente densitometrisch quantifiziert. Zur Ermittlung des prozentualen Anteils endozytierter Proteine, wurde das Signal der Abspaltkontrolle von dem Signal der Endozytose abgezogen. Aus den erhaltenen Werten wurde der Mittelwert berechnet und entsprechend als prozentualer Anteil der gesamten Zelloberflächenbiotinylierung graphisch dargestellt (Abb. 4.13 C, b). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung vom Mittelwert (SEM = *standard error of the mean*). Innerhalb einer Stunde wurden von PLP ca. 12 +/- 7 %, von MAG ca. 7 +/- 2 % und von MOG ca. 14 +/- 5 % endozytiert. Im Vergleich zu transient transfizierten Oli-neu Zellen ist die Endozytoserate der endogenen Proteine zwar geringer, an sich konnte jedoch eine permanente Aufnahme aller drei Myelinproteine in pOI beobachtet werden. Aufgrund der starken Schwankungen zwischen den Experimenten mit pOI, kann keine Aussage über die Endozytosekinetiken der Myelinproteine getroffen werden.

4. Ergebnisse

A



B Oli-neu



C primäre Oligodendrozyten

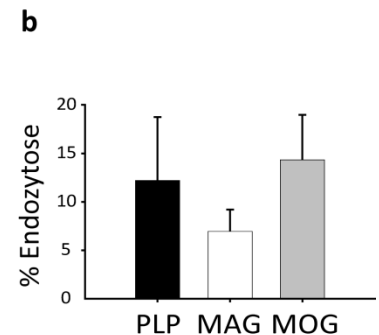
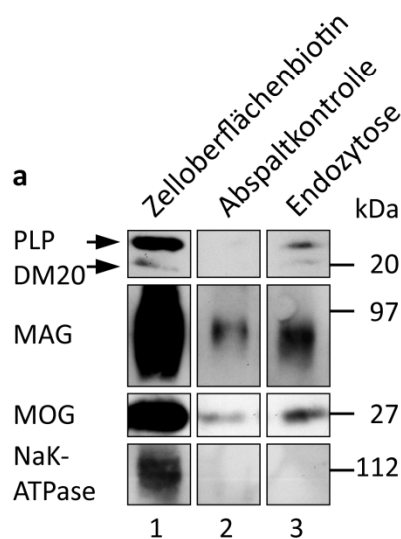


Abb. 4.13: Endozytose von zelloberflächenbiotinylierten Myelinproteinen.

(A) Schematische Darstellung des Versuchsablaufs. Mit PLP, MAG oder MOG transient transfizierte Oli-neu Zellen (B) und pOI (C) wurden mit abspltbarem Sulfo-NHS-SS-LC-Biotin zelloberflächenbiotinyliert. Anschließend wurden die Zellen entweder direkt lysiert (Spur 1, Zelloberflächenbiotin) oder für 1 h bei 4°C inkubiert um Endozytose zu blockieren, gefolgt von der Abspaltung des Zelloberflächenbiotins mit 100 mM DTT (Spur 2, Abspaltkontrolle) oder für 1 h bei 37°C inkubiert, um die Endozytose der zelloberflächenbiotinylierten Proteine zu ermöglichen, mit anschließender Abspaltung des Zelloberflächenbiotins (Spur 3, Endozytose). Nach der Zelllyse wurden biotinylierte Proteine mit Neutravidin-*Beads* präzipitiert und mittels Western-Blot analysiert. PLP, MAG und MOG jedoch keine NaK-ATPase wurden mit den endozytierten Proteinen präzipitiert. (C, b) Densitometrische Auswertung von 3 unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten mit primären Oligodendrozyten. Die Graphen zeigen den prozentualen Anteil der markierten, endozytierten Proteine (Zelloberflächenbiotin = 100 %) nach Abzug der Kontrolle (Spur 3 minus Spur 2). Die Fehlerbalken zeigen den SEM.

4. Ergebnisse

Im folgenden Versuch wurde die Endozytose von zelloberflächenbiotinyliertem PLP, MAG und MOG morphologisch analysiert. Dazu wurden pOI für 30 min mit Sulfo-NHS-LC-Biotin (nicht abspaltbar) zelloberflächenbiotinyliert. Zur Inhibierung der Endozytose während der Zelloberflächenbiotinylierung, wurden alle Schritte auf Eis bzw. bei 4°C durchgeführt. Um die Endozytose der mit Biotin markierten Proteine zu ermöglichen, wurden die Zellen für 0 und 4 h bei 37°C in Sato/B27 Medium kultiviert. Die Zellen wurden anschließend fixiert, permeabilisiert und biotinylierte Proteine wurden mit Streptavidin-FITC detektiert (Abb. 4.14, grün). Zudem wurden die Zellen mit anti-PLP, -MAG und -MOG Antikörpern doppelmarkiert (Abb. 4.14, rot). Direkt nach der Biotinylierung ist das Streptavidin ausschließlich an der Zelloberfläche lokalisiert (Abb. 4.14, 0 h, grün). Die Zelloberflächenbiotinylierung der Myelinproteine wird durch die Kolokalisierung mit Streptavidin-FITC an der Plasmamembran deutlich (Abb. 4.14, 0 h, gelb). Die relativ geringe Kolokalisierung von Biotin mit PLP zeigt, dass PLP im Vergleich zu MOG und MAG nur schwach biotinyliert wurde, was sich auch in den biochemischen Analysen widerspiegelte. Intrazellulär lokalisierte Myelinproteine wurden nicht biotinyliert (Abb. 4.14, 0 h, rot). Innerhalb von 4 h bei 37°C wurde ein Teil der biotinylierten Proteine endozytiert. Hier zeigt die Kolokalisierung von intrazellulärem Biotin mit PLP, MAG und MOG die Endozytose der zelloberflächenbiotinylierten Myelinproteine (Abb. 4.14, 4 h 37°C, vergrößerte Darstellung, gelb). Um endozytiertes Biotin eindeutig darzustellen, ist in Abb. 4.14 ein Stapel aus mehreren konfokalen Ebenen gezeigt. Dadurch erscheint die effiziente Zelloberflächenbiotinylierung teilweise überexponiert (z.B. PLP, 4 h, 37°C).

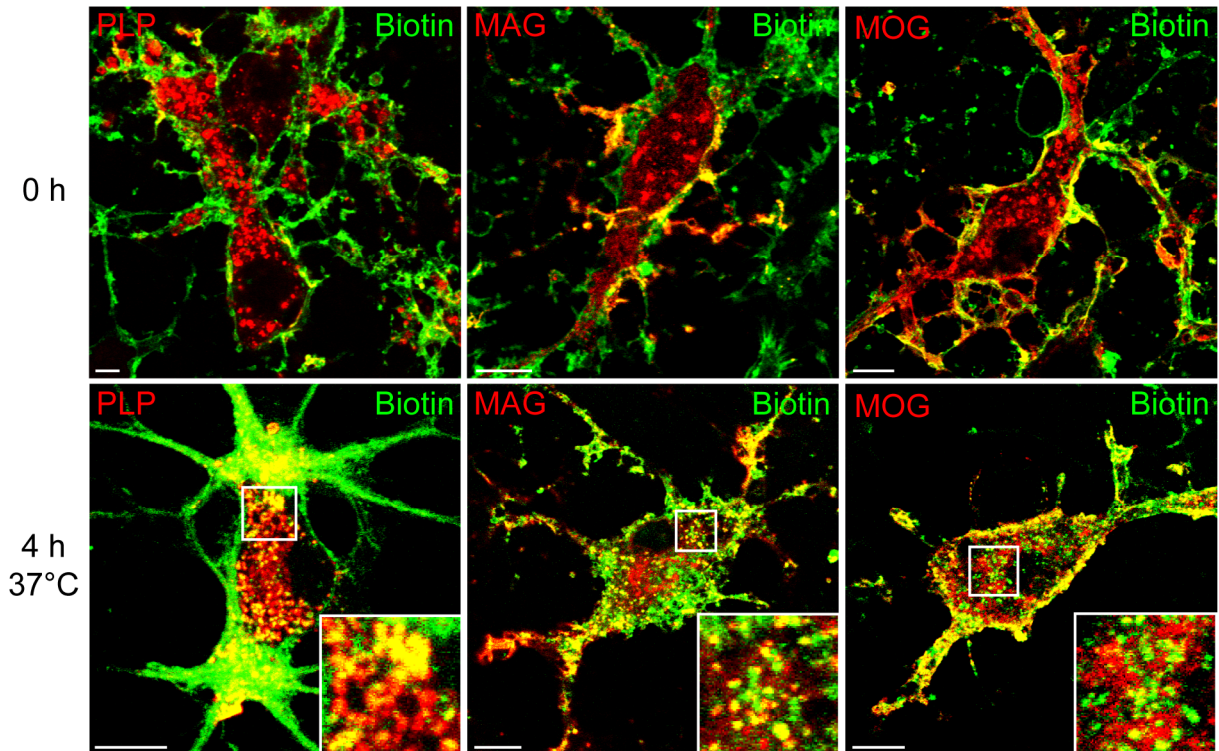


Abb. 4.14: Endozytose von zelloberflächenbiotinyliertem PLP, MAG und MOG in pOI.

Nach der Zelloberflächenbiotinylierung von pOI (4 Tage in Kultur) mit 0,5 mg/ml Sulfo-NHS-LC-Biotin und dreimaligem Waschen mit 50 mM Glycin/PBS wurden die Zellen für 0 und 4 h bei 37°C in Sato/B27 Kulturmedium inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mit Streptavidin-FITC (grün) und mit anti-PLP, -MAG oder -MOG Antikörpern doppelgefärbt (rot). Die rechteckig markierten Ausschnitte sind vergrößert dargestellt. Direkt nach der Biotinylierung beschränkt sich das Streptavidin-Signal auf die Zelloberfläche (0 h, grün). Nach 4 h wurden biotinylierte Proteine endozytiert und Streptavidin-FITC kolokalisiert mit PLP, MAG und MOG in intrazellulären Kompartimenten (4h 37°C, Vergrößerung, gelb). Zur Visualisierung von intrazellulärem Biotin, sind die konfokalen Ebenen mit Hilfe der ImageProPlus *extended depth of field* Funktion, gestapelt dargestellt. Zelloberflächenbiotin erscheint daher überexponiert. Größenbalken, 5 µm.

4.4.3 Morphologischer Nachweis der Endozytose von Myelinproteinen mit Antikörpern

Um spezifisch den endosomalen Transport der Myelinproteine zu visualisieren, wurden transient transfizierte Oli-neu Zellen und pOI lebend mit Antikörpern gegen extrazelluläre Epitope von PLP (O10), MAG (513), MOG (8-18-C5) oder NG2 (AN2) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Cy3-gekoppelten Sekundärantikörpern (g α m Cy3 für PLP, MAG, MOG bzw. g α rat Cy3 für NG2) markiert. Um die Endozytose der markierten Proteine zu ermöglichen, wurden die Zellen für 0 min, 15 min, 30 min (nicht dargestellt) und 1 h bei 37°C inkubiert. Um endozytierte von nicht endozytierten Proteinen unterscheiden zu können, wurden anschließend die an der Zelloberfläche verbliebenen, Cy3-markierten Proteine mit Cy2-gekoppelten (rb α g Cy2) Tertiärantikörpern gegengefärbt. Endozytierte Proteine sind nach Überlagerung der Bilder in Rot zu erkennen, wohingegen an der Zelloberfläche

4. Ergebnisse

verbliebene Proteine in Gelb sichtbar sind (Abb. 4.15 A, B).

Verbleiben die Zellen bei 4°C, so wird Endozytose blockiert und die Antikörperkomplexe sind ausschließlich an der Zelloberfläche lokalisiert (Abb. 4.15 A, B, 0 min). Innerhalb einer Stunde ist sowohl in transfizierten Oli-neu Zellen (Abb. 4.15 A) als auch in endogen exprimierenden pOI (Abb. 4.15 B) eine deutliche Zunahme endozytierter Myelinproteine zu beobachten, wohingegen das endogen exprimierte oligodendrogliale Zelloberflächenprotein NG2 nicht endozytiert wird. Besonders in Oli-neu Zellen wird deutlich, dass sich das Verteilungsmuster endozytierter Myelinproteine unterscheidet. MOG akkumuliert perinukleär, wohingegen sich endozytiertes PLP und MAG über den gesamten Zellkörper und die Fortsätze verteilen.

4. Ergebnisse

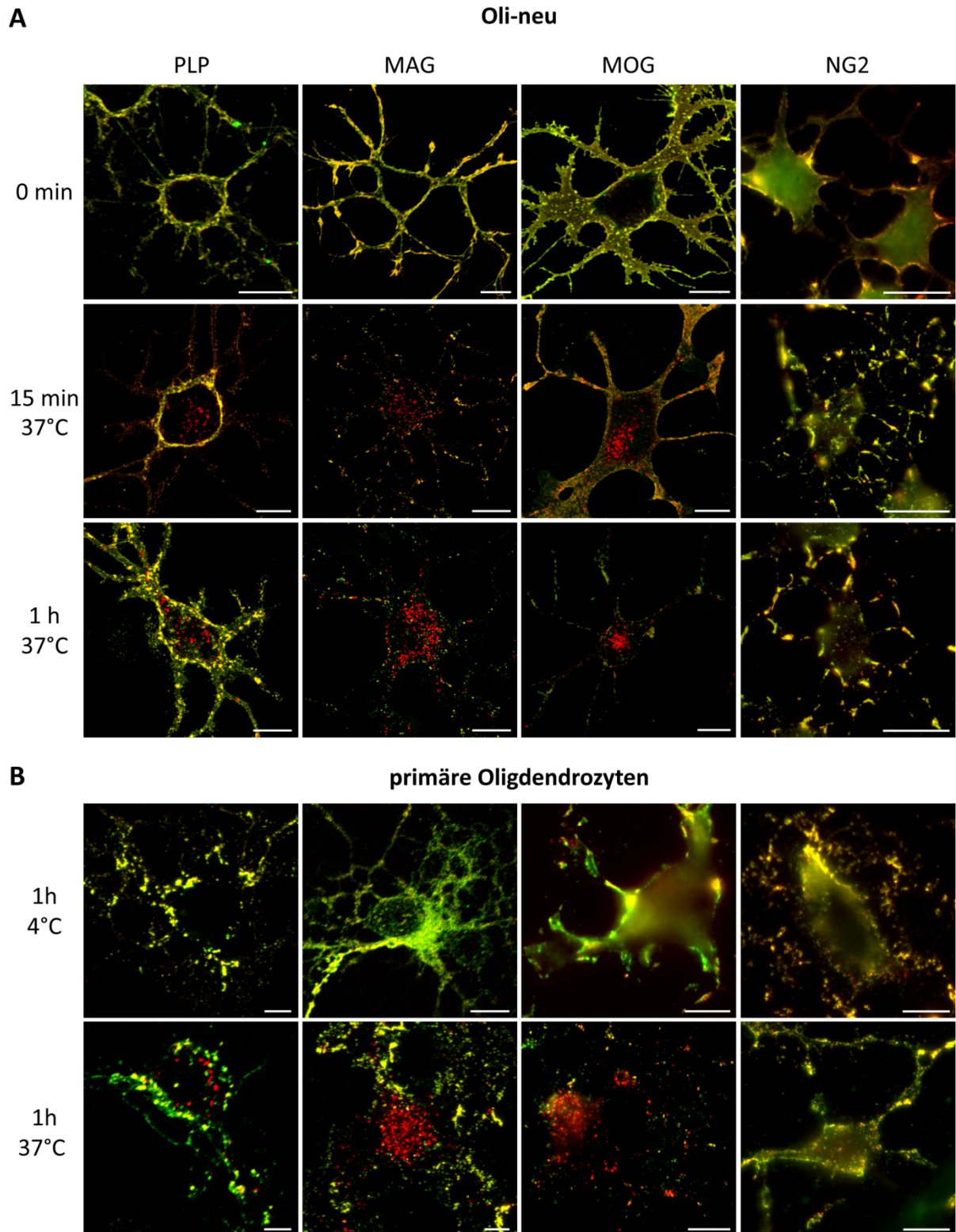


Abb. 4.15: Antikörper-Endozytose von Myelinproteinen.

Mit PLP, MAG oder MOG transient transfizierte Oli-neu Zellen (A) und pOI (B) wurden lebend mit spezifischen Antikörpern gegen extrazelluläre Epitope von PLP (O10), MAG (513), MOG (8-18-C5) oder NG2 (mAN2) gefolgt von Cy3-gekoppelten Sekundärantikörpern markiert. Nach einer Inkubationszeit für 0, 15 min, oder 1 h bei 37°C, wurden die Zelloberflächen-Antikörper-Komplexe mit Cy2-gekoppelten Tertiärantikörpern gegengefärbt. Endozytierte Proteine sind in Rot, Zelloberflächenproteine hingegen in Gelb dargestellt. Innerhalb von 1 h bei 37°C ist die Zunahme endozytierter Myelinproteine zu beobachten. Endozytiertes PLP und MAG sind über den gesamten Zellkörper verteilt, wohingegen MOG perinukleär akkumuliert. Das oligodendrogliale Zelloberflächenprotein NG2 wird nicht endozytiert. Größenbalken, 10 µm.

4. Ergebnisse

Durch Antikörperinkubationen bei 37°C können Proteine an der Zelloberfläche quervernetzt werden. Die daraus resultierende Ansammlung der Proteine an bestimmten Regionen der Plasmamembran ist auch in Abb. 4.15 zu beobachten. Meist wird durch die Quervernetzung die Endozytose von Proteinen induziert. Um dies als Ursache für die Aufnahme der Myelinproteine auszuschließen, wurde überprüft, ob Endozytose auch ohne Zugabe des Sekundärantikörpers während der 37°C Inkubation erfolgt (Abb. 4.15).

Im Kontrollansatz bei 4°C findet keine Endozytose statt. Hier ist eine deutliche Zelloberflächenfärbung von PLP, MAG und MOG zu erkennen. Nach 1 h bei 37°C werden alle Myelinproteine endozytiert. Die Verteilung der endozytierten Proteine ist zu der in Abb. 4.15 identisch. PLP ist in relativ großen vesikulären Strukturen zu beobachten, MAG enthaltende Endosomen verteilen sich über den gesamten Zellkörper und MOG ist perinukleär angereichert (Abb. 4.16, weiße Pfeile).

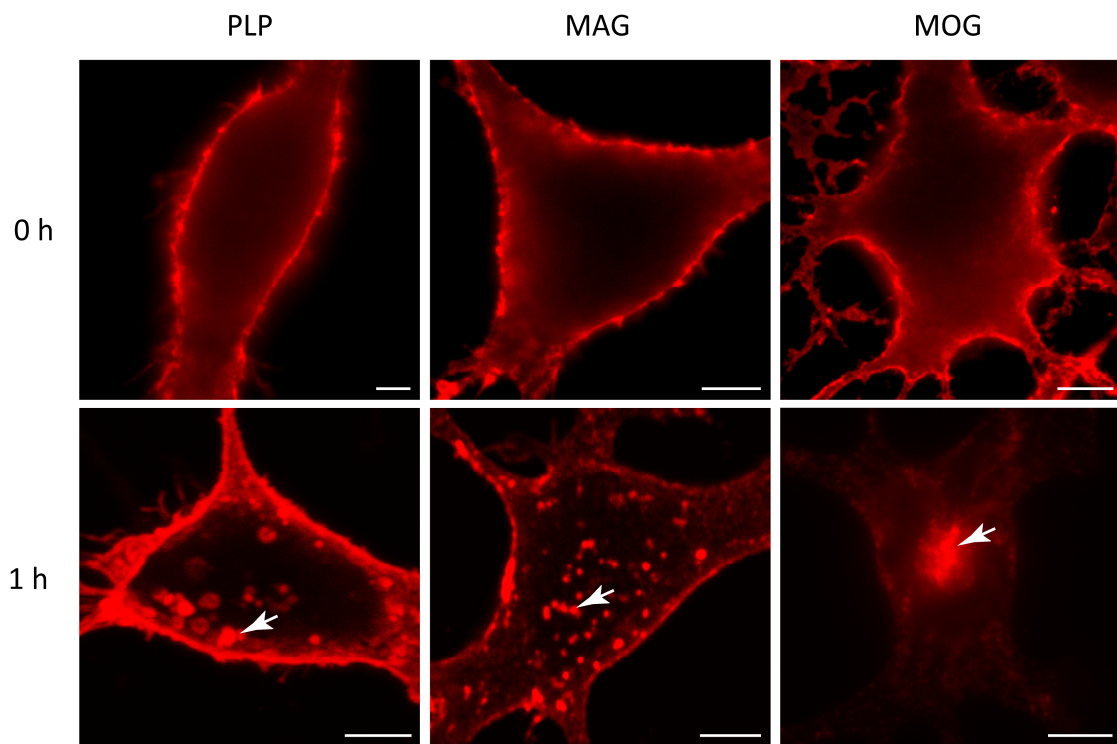


Abb. 4.16: Antikörper-Endozytose ohne Sekundärantikörper-induzierte Quervernetzung der Proteine an der Zelloberfläche.

Mit PLP, MAG oder MOG transient transfizierte Oli-neu Zellen wurden lebend auf Eis mit spezifischen Antikörpern gegen extrazelluläre Epitope von PLP (O10), MAG (513) oder MOG (8-18-C5) markiert. Nach der Inkubation für 1 h auf Eis oder bei 37°C wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mit Cy3-gekoppelten Sekundärantikörpern inkubiert. Die weißen Pfeile markieren endozytierte Proteine nach Inkubation bei 37°C. Die Verteilung endozytierter Proteine ist zu der aus Abb. 4.15 identisch. PLP ist in großen Endosomen zu beobachten, MAG ist über den gesamten Zellkörper verteilt und MOG akkumuliert perinukleär. Größenbalken, 5 µm.

4.4.4 PLP, MAG und MOG endozytieren in unterschiedliche endosomale Zielkompartimente

Die Verteilung endozytierter Myelinproteine in unterschiedlichen Regionen der Zelle (Abb. 4.15, Abb. 4.16) lässt verschiedene endosomale Zielkompartimente vermuten. Um diese zu identifizieren, wurden transient transfizierte Oli-neu Zellen und pOI, wie oben beschrieben, einer Antikörper-Endozytose unterzogen und anschließend mit verschiedenen endosomalen Markern gegengefärbt (Abb. 4.17).

Für die Markierung der Recycling-Endosomen wurde während der 37°C Inkubation Tfr-FITC zum Kulturmedium hinzugegeben. Alternativ wurden die Zellen für die Markierung der LE/Lys mit Antikörpern gegen LAMP1 immunzytochemisch gefärbt. An der Zelloberfläche verbliebene Antikörper-Komplexe wurden bei pOI vor dem Fixieren mit Cy5-gekoppelten Tertiärantikörpern gegengefärbt und sind in den überlagerten Bildern in Magenta dargestellt (Abb. 4.17, B). Kollokalisierungen endozytierter Myelinproteine mit den entsprechenden endosomalen Markern sind in den überlagerten Bildern in Gelb zu erkennen.

Interessanterweise kollokalisieren sowohl endozytiertes PLP als auch MAG mit LAMP1 in den LE/Lys, wohingegen MOG mit Tfr im perinukleären Recycling Endosom kollokaliert. Zwar zeigen primäre Oligodendrozyten eine ähnliche Verteilung endozytierter Myelinproteine, jedoch ist diese nicht so ausgeprägt und eindeutig, wie bei der Zelllinie Oli-neu.

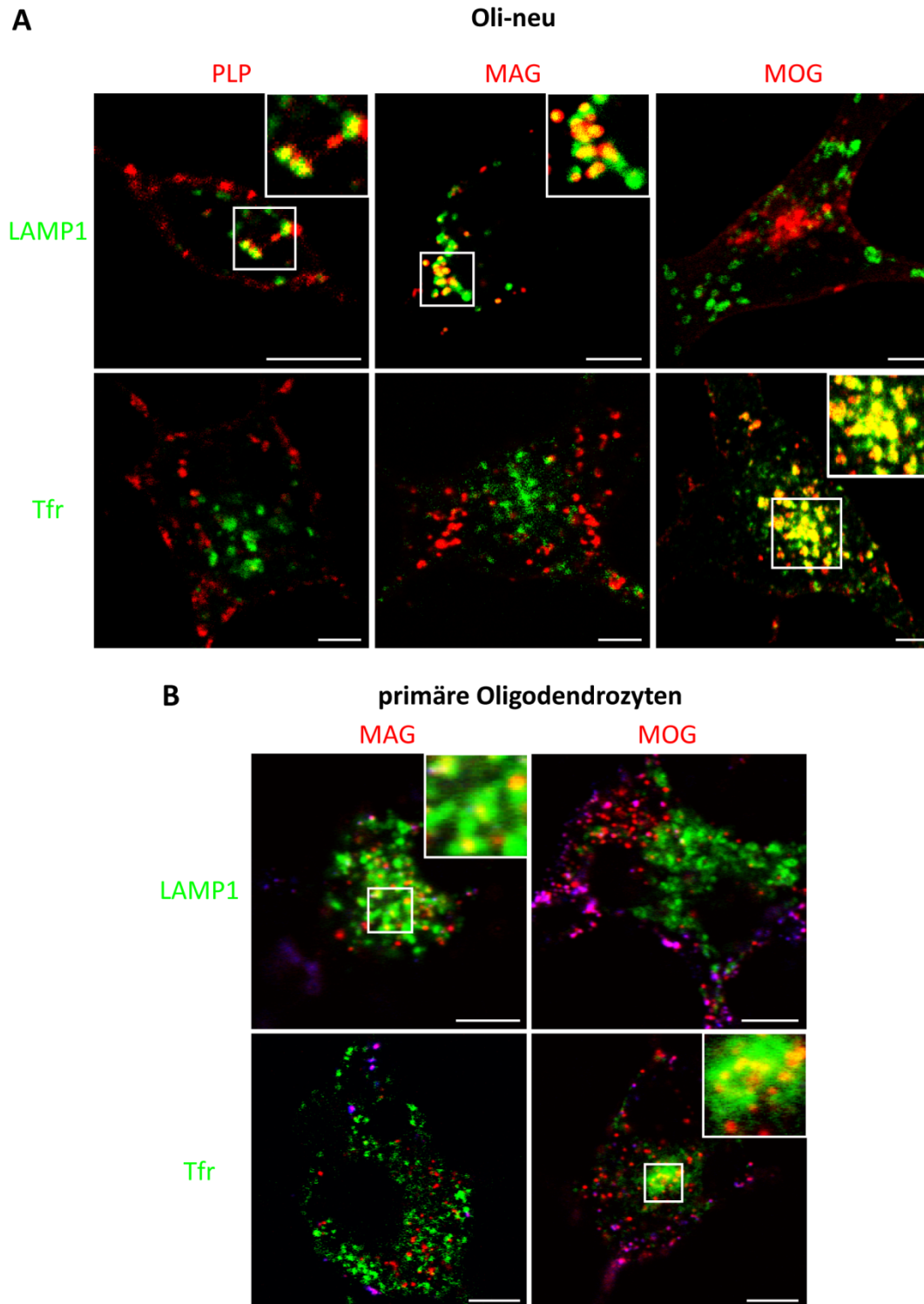


Abb. 4.17: Kolokalisierung endozytierter Myelinproteine mit endosomalen Markern.

Mit PLP, MAG oder MOG transient transfizierte Oli-neu Zellen (A) und pOI (B) wurden auf Eis mit spezifischen Antikörpern gegen extrazelluläre Epitope von PLP (O10), MAG (513) oder MOG (8-18-C5) und Cy3-gekoppelten Sekundärantikörpern markiert. Nach 1 h bei 37°C wurden die an der Zelloberfläche verbliebenen Antikörper-Komplexe bei pOI mit Cy5-gekoppelten Tertiärantikörpern gegengefärbt (B, magenta). Für die Markierung der RE wurden 30 µg/ml Tfr-FITC während der 37°C Inkubation zum Kulturmedium hinzugefügt (A, B, untere Bilder, grün). Für die Markierung der LE/Lys, wurden die Zellen nach der 37°C Inkubation fixiert, permeabilisiert und mit Antikörpern gegen LAMP1 gefärbt (obere Bilder, grün). Die konfokalen Aufnahmen zeigen die Kolokalisierung von PLP und MAG mit LAMP1 in LE/Lys (obere Bilder, gelb) und die Kolokalisierung von MOG mit Tfr in den RE (untere Bilder, gelb). Die quadratisch markierten Ausschnitte sind vergrößert dargestellt. Größenbalken, 5 µm.

4. Ergebnisse

Die Sortierung von PLP und MAG in LAMP1-positive späte Endosomen impliziert zunächst, dass beide Proteine denselben Endozytoseweg benutzen und in identische Zielorganellen gelangen. Möglich wäre jedoch auch eine Sortierung in unterschiedliche Subpopulationen von Endosomen. Um dies zu überprüfen, wurde eine simultane Endozytose von PLP und MAG in kotransfizierten Oli-neu Zellen durchgeführt. Die Zellen wurden wie oben beschrieben gleichzeitig mit Antikörpern gegen PLP (IgM, O10) und MAG (IgG, 513) inkubiert. Der O10 Antikörper wurde mit einem IgM-spezifischen, Cy3-gekoppelten, der 513 Antikörper hingegen mit einem IgG-spezifischen, Cy2-gekoppelten Sekundärantikörper markiert. Die Zellen wurden für 5, 10 und 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend wurden verbleibende Antikörperkomplexe an der Zelloberfläche, mit Cy5-gekoppelten Tertiärantikörpern gegengefärbt (Abb. 4.18 magenta, cyan oder weiß). Endozytiertes PLP ist in Rot, MAG in Grün und Kolokalisierungen von endozytiertem PLP und MAG in Gelb dargestellt (Abb. 4.18).

Nach 5 min bei 37°C ist keine Kolokalisierung von endozytiertem PLP und MAG zu beobachten. Beide Proteine sind in unterschiedlichen vesikulären Strukturen lokalisiert (Abb. 4.18, 5 min, vergrößerte Darstellungen). Nach 10 bzw. 30 minütiger Inkubation bei 37°C kolokalisieren die Proteine hingegen zunehmend in großen, spät-endosomalen Organellen (Abb. 4.18, 10 bzw. 30 min, vergrößerte Darstellung). PLP und MAG gelangen somit zunächst in unterschiedliche Populationen von frühen Endosomen, treffen dann jedoch in späten Endosomen zusammen.

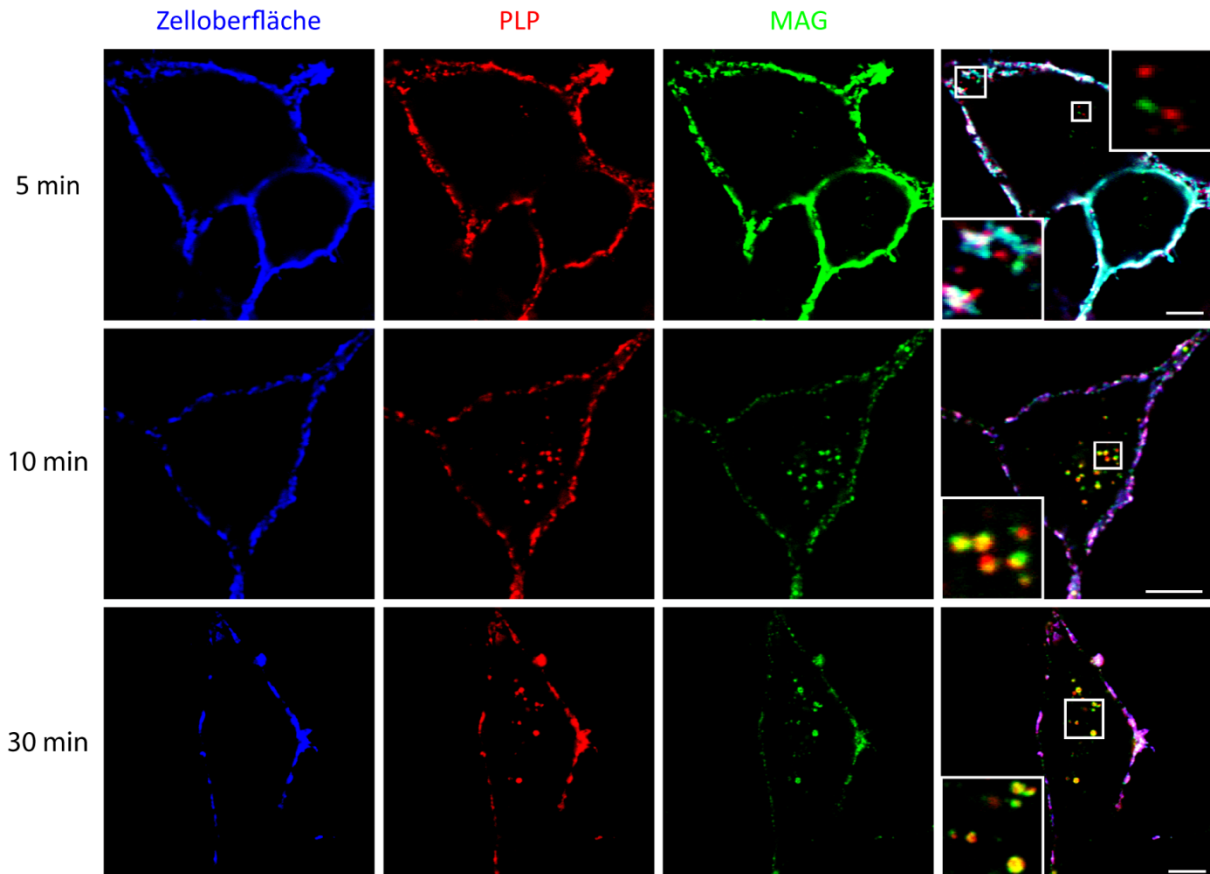


Abb. 4.18: Ko-Endozytose von PLP und MAG.

Oli-neu Zellen wurden transient mit PLP und L-MAG kotransfiziert und auf Eis mit spezifischen Antikörpern gegen extrazelluläre Epitope von PLP (IgM, O10) und MAG (IgG, 513) sowie Cy3- bzw. Cy2-gekoppelten Sekundärantikörpern doppelgefärbt. Nach Inkubation der Zellen für 5, 10 und 30 min bei 37°C wurden an der Zelloberfläche verbliebene Antikörper-Komplexe mit Cy5-gekoppelten Tertiärantikörpern gegengefärbt (magenta, cyan od. weiß). Die quadratisch markierten Ausschnitte sind vergrößert dargestellt. Die konfokalen Aufnahmen zeigen, dass PLP (rot) und MAG (grün) nach 5 min Endozytose in getrennten frühen Endosomen lokalisiert sind. Nach 10 bzw. 30 min Endozytose kolokalisieren die Proteine hingegen zunehmend in späten Endosomen (gelb). Größenbalken, 5 µm

4.4.5 Clathrin-vermittelte Endozytose von MAG und MOG

Die unterschiedliche endosomale Sortierung von PLP, MAG und MOG impliziert, dass die Myelinproteine möglicherweise über unterschiedliche Endozytose-Mechanismen aufgenommen werden. Um Clathrin-vermittelte Endozytose zu inhibieren, wurde von einer dominant-negativen Mutante des Adapterproteins 180 Gebrauch gemacht. Das in der Plasmamembran verankerte AP180 rekrutiert Clathrin zu den *Clathrin-Coated-Pits*. Überexpression der verkürzten, löslichen C-terminalen Domäne von AP180 (AP180C) führt zu einer effizienten Inhibierung der Clathrin-vermittelten Endozytose, da es Clathrin bindet, aber dessen Rekrutierung in die *Coated Pits* nicht vermitteln kann (Ford et al., 2001).

Als Positivkontrolle wurde die Aufnahme von Tfr-alexa594, ein Marker für Clathrin-

4. Ergebnisse

vermittelte Endozytose, in AP180C-Myc überexprimierenden Oli-neu Zellen analysiert. AP180C exprimierende Zellen wurden mit Hilfe eines anti-Myc-Antikörpers immunzytochemisch detektiert und mikroskopisch ausgezählt. Dabei wurden ausschließlich stark AP180C exprimierende Zellen gezählt, da nur bei diesen eine Inhibierung der Tfr-Aufnahme zu beobachten war. Eine komplette Inhibierung der Clathrin-vermittelten Endozytose kann nur erzielt werden, wenn Clathrin vollständig von AP180C gebunden wird und kann deshalb nicht in allen Zellen erwartet werden. Pro Experiment wurden > 50 Zellen gezählt, der prozentuale Anteil Tfr-endozytierender Zellen bestimmt und der Mittelwert aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten graphisch dargestellt (Abb. 4.19 A). Als Kontrolle dienten untransfizierte Oli-neu Zellen, von denen 93 \pm 2 % Tfr endozytierten. Die AP180C exprimierenden Zellen endozytierten hingegen nur zu 16 \pm 6 % Tfr und zeigten somit eine fast vollständige Hemmung der Clathrin-vermittelten Endozytose. Um das Endozytose-Verhalten der Myelinproteine nach Inhibierung der Clathrin-vermittelten Endozytose zu analysieren, wurden Oli-neu Zellen mit PLP, MAG oder MOG und AP180C kotransfiziert und einer Antikörper-Endozytose (siehe oben) unterzogen. Als Kontrolle für eine effiziente Inhibierung der Clathrin-vermittelten Endozytose, wurde während der einstündigen Endozytoseperiode Tfr-FITC zum Kulturmedium hinzugefügt. Es wurden ausschließlich AP180C exprimierende Zellen gezählt (> 50 pro Experiment), bei denen die Aufnahme von Tfr-FITC blockiert war (Abb. 4.19 B, graue Balken). Als Kontrolle dienten mit den Myelinproteinen einzeltransfizierte Oli-neu Zellen (Abb. 4.19 B, schwarze Balken). Die Anzahl endozytierender Zellen wurde prozentual errechnet und der Mittelwert aus allen Experimenten mit der Standardabweichung vom Mittelwert (SEM) graphisch dargestellt.

Durch Inhibierung der Clathrin-vermittelten Endozytose wurde die Aufnahme von PLP nur geringfügig beeinträchtigt, wohingegen die Aufnahme von MAG und MOG stark reduziert wurde. Die getrennte Analyse von L-MAG und S-MAG ergab identische Werte (nicht dargestellt).

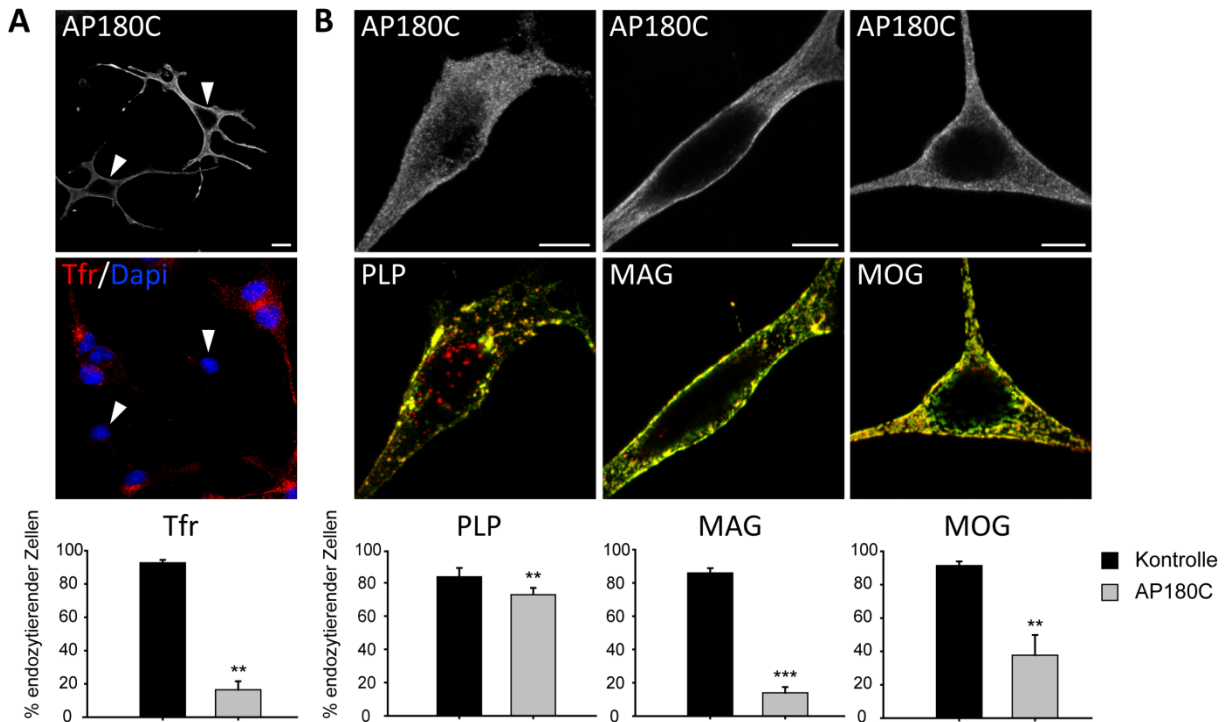


Abb. 4.19: Untersuchung der Clathrin-vermittelten Endozytose.

Um Clathrin-abhängige Endozytose zu blockieren, wurde AP180C-Myc in Oli-neu Zellen überexprimiert. AP180C exprimierende Zellen wurden durch Färbung mit anti-Myc-Antikörpern identifiziert (obere Reihe). In der unteren Reihe sind endozytierte Proteine in Rot und an der Zelloberfläche lokalisierte Proteine hingegen in Grün/Gelb zu erkennen. Die Graphen zeigen den prozentualen Anteil endozytischer Zellen (schwarze Balken, Kontrolle) und den prozentualen Anteil endozytischer Zellen, AP180C exprimierender Zellen (graue Balken). (A) Die Clathrin-abhängige Endozytose von Tfr-alexa594 (rot) ist spezifisch in AP180C exprimierenden Oli-neu Zellen blockiert (weiße Pfeile). Die Zellkerne sind durch Dapi-Färbung blau dargestellt. (B) Koexpression von AP180C-Myc (15 µg) und PLP (15 µg), MAG (10 µg) oder MOG (5 µg) in Oli-neu Zellen. Mit den Zellen wurde eine Antikörper-Endozytose durchgeführt und der Prozentsatz endozytischer Proteine ermittelt. Die Abbildung zeigt einen Stapel konfokaler Ebenen von repräsentativen Zellen. Die Endozytose von MAG und MOG ist in AP180C überexprimierenden Zellen stark reduziert, von PLP hingegen nur geringfügig. Bei 3 (PLP, MAG) bzw. 4 (MOG) unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten wurden jeweils > 50 Zellen gezählt. Die Fehlerbalken zeigen den SEM, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (gepaarter t-Test). Größenbalken, 5 µm

4.4.6 Clathrin-unabhängige Endozytose von PLP

Clathrin-unabhängige Endozytose findet an Cholesterin-reichen Domänen der Plasmamembran statt. Um Clathrin-unabhängige Endozytosemechanismen zu inhibieren, wurde das Cholesterin-bindende Reagenz Filipin benutzt, welches zu einer Reduktion des Cholesterin-Gehaltes in Membranen führt. Dazu wurden Oli-neu Zellen transient mit PLP, MAG oder MOG transfiziert und einer Antikörper-Endozytose (siehe oben) unterzogen. Während der Inkubation des Cy3-gekoppelten Sekundärantikörpers auf Eis und der anschließenden 37°C Inkubation wurden die Zellen mit 1 µg/ml Filipin behandelt. Da eine zu starke Reduktion des Cholesterin-Gehaltes aus der Plasmamembran auch zur Beeinträchtigung von Clathrin-abhängiger Endozytose führt (Kirkham and Parton, 2005),

4. Ergebnisse

wurde eine simultane Aufnahme von Tfr-FITC als Kontrolle durchgeführt. Es wurden ausschließlich Zellen analysiert, die eine Aufnahme von Tfr-FITC zeigten (Abb. 4.20). Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle. Die Anzahl endozytierender Zellen wurde prozentual errechnet und der Mittelwert aus allen Experimenten mit der Standardabweichung vom Mittelwert (SEM) graphisch dargestellt. Die Endozytose von PLP wurde durch die Behandlung mit Filipin bei ca. 86 % der Zellen inhibiert. Die Endozytose von MAG und MOG blieb hingegen unbeeinträchtigt.

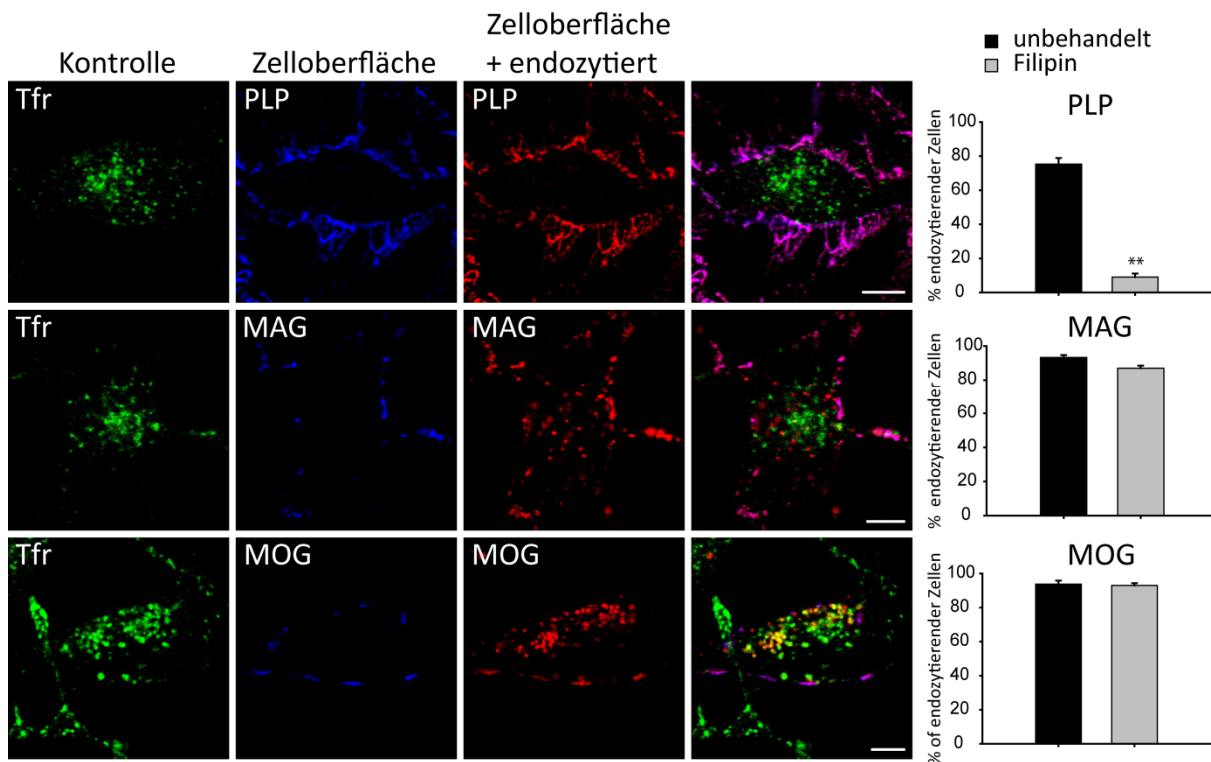


Abb. 4.20: Untersuchung der Clathrin-unabhängigen Endozytose.

Um Clathrin-unabhängige Endozytose zu blockieren, wurden mit PLP, MAG oder MOG transient transfizierte Oli-neu Zellen während der Antikörper-Endozytose mit Filipin (1 µg/ml) behandelt. Um auszuschließen, dass durch die Filipin-Behandlung auch Clathrin-abhängige Endozytose beeinträchtigt wurde, wurde Tfr-FITC (grün) mit den Myelinproteinen (rot) koendozytiert und ausschließlich Zellen analysiert, die Tfr endozytierten. An der Zelloberfläche verbliebenes PLP, MAG oder MOG wurde mit Cy5-gekoppelten Tertiärantikörpern gegengefärbt (blau). Nach Überlagerung der Bilder sind an der Zelloberfläche lokalisierte Proteine magenta und endozytierte Proteine rot (bzw. gelb bei Ko-lokalisation mit Tfr-FITC) dargestellt. Die Abbildung zeigt konfokale Ebenen von repräsentativen Zellen. Der prozentuale Anteil von PLP, MAG oder MOG endozytierenden Zellen wurde berechnet und der Mittelwert aus 3 (PLP, MAG) bzw. 5 (MOG) Experimenten graphisch dargestellt (schwarze Balken, unbehandelte Zellen; graue Balken, mit Filipin behandelte Zellen). Pro Experiment wurden > 50 Zellen gezählt. Die Endozytose von PLP wurde durch Filipin-Behandlung inhibiert, wohingegen die Endozytose von MAG und MOG unbeeinträchtigt blieb. Die Fehlerbalken zeigen den SEM, **p<0.01 (gepaarter t-Test). Größenbalken, 5 µm.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse aus Kap. 4.4, dass PLP, MAG und MOG über verschiedene Mechanismen endozytiert werden und unterschiedliche endosomale Zielkompartimente erreichen. MAG und MOG werden über einen Clathrin-abhängigen, PLP jedoch über einen Clathrin-unabhängigen Mechanismus endozytiert. PLP und MAG erreichen das LE/Lys, wohingegen MOG in das RE sortiert wird.

4.5 Endosomales Recycling von PLP, MAG und MOG in primären Oligodendrozyten

Nach der Beobachtung, dass PLP, MAG und MOG unterschiedlichen endosomalen Sortier- und Transportwegen unterliegen (Kap. 4.4), sollte analysiert werden, ob die Proteine nach ihrer Endozytose zu spezifischen oligodendroglialen Membrandomänen recyceln. Dazu wurde ein experimentelles Protokoll entworfen, bei dem zelloberflächenbiotinylierte Myelinproteine in pOI über 24 h verfolgt wurden. Innerhalb dieser 24 h sollte Endozytose und Recycling stattfinden.

Dazu wurden pOI in einem unreifen Entwicklungsstadium (4 Tage in Kultur) zelloberflächenbiotinyliert und für 0 h, 4 h und 24 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und biotinylierte Proteine wurden mit Streptavidin-FITC markiert (Abb. 4.21).

Zu Beginn sind die biotinylierten Proteine erwartungsgemäß ausschließlich an der Zelloberfläche lokalisiert (Abb. 4.21, 0 h, Pfeile). Nach 4 h bei 37°C hat sich die Zelloberflächenfärbung verflüchtigt und ein Großteil der Proteine ist in intrazellulären Kompartimenten zu detektieren (Abb. 4.21, 4 h, Pfeilspitzen). Nach 24 h bei 37°C sind kaum mehr Zellen zu beobachten, die intrazelluläres Biotin aufweisen. Stattdessen scheint innerhalb von 24 h ein Recycling der endozytierten Proteine an die Zelloberfläche in ausgedehnte, periphere Membranstrukturen stattgefunden zu haben (Abb. 4.21, 24 h, Sterne).

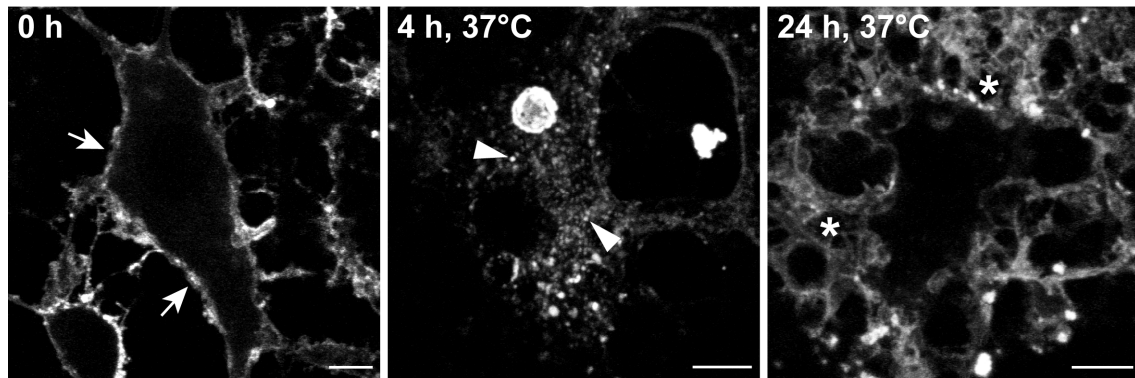


Abb. 4.21: Endozytose und Recycling von zelloberflächenbiotinylierten Proteinen.

Nach der Zelloberflächenbiotinylierung von pOI (4 Tage in Kultur) mit 0,5 mg/ml Sulfo-NHS-LC-Biotin und dreimaligem Quenchen mit 50 mM Glycin/PBS wurden die Zellen für 0, 4 h und 24 h bei 37°C in Sato/B27 Kulturmedium inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mit Streptavidin-FITC markiert. Direkt nach der Biotinylierung beschränkt sich das Streptavidin-Signal auf die Zelloberfläche (0 h, Pfeile). Nach 4 h wurden biotinylierte Proteine endozytiert (4 h, Pfeilspitzen). Innerhalb von 24 h recyceln die biotinylierten Proteine vom Zellkörper zur Zellperipherie, wo sie in MLMs lokalisieren (24 h, Sterne). Größenbalken, 5 µm.

In Kap. 4.2.2 wurde gezeigt, dass pOI *in vitro* Membrandomänen ausbilden, die in ihrer biochemischen Zusammensetzung den Myelindomänen ähneln. Das Protokoll zur Fraktionierung der Myelin-ähnlichen Membrandomänen wurde nun mit der Zelloberflächenbiotinylierung und anschließender Endozytose und Recycling kombiniert.

0 h, 4 h und 24 h nach der Zelloberflächenbiotinylierung wurden die Oligodendrozyten fraktioniert (Abb. 4.22 A) und biotinylierte Proteine aus den Fraktionen präzipitiert (Abb. 4.22 B). Syntaxin 6 wurde als Marker für intrazelluläre Membranproteine (Endosomen, Golgi) gewählt. Dessen Abwesenheit unter den präzipitierten Proteinen zeigt die Spezifität der Biotinylierung für Zelloberflächenproteine sowie des Neutravidin-*Pulldowns* für biotinylierte Proteine.

Direkt nach der Biotinylierung (Abb. 4.22 B, 0 h) beschränken sich PLP, MAG und MOG hauptsächlich auf die "schwere" Gradientenfraktion. Nach 24 h bei 37°C sind PLP und MOG jedoch verstärkt in der "leichten" Membranfraktion zu beobachten (Abb. 4.22 B, 24 h), was auf deren Recycling in biochemisch unterschiedliche, dem kompakten Myelin ähnelnde Membrandomänen hindeutet. MAG bleibt hingegen konstant mit den schweren Fraktionen assoziiert, was wiederum auf sein Recycling in unterschiedliche, dem nicht-kompakten Myelin ähnelnde Membrandomänen hindeuten könnte.

Die Verteilung der Proteine in den Gesamtlysaten (Abb. 4.22 A) ändert sich hingegen nicht so deutlich. Dies zeigt, dass keine generelle Umverteilung der Myelinproteine innerhalb von 24 h stattfindet. Zwar sind PLP und MOG zum Zeitpunkt der Biotinylierung in den

4. Ergebnisse

Gesamtlysaten bereits in den "leichten" Membrandomänen zu beobachten, offensichtlich wird jedoch diese Subpopulation von Proteinen aufgrund sterischer Behinderung durch die kompakte Natur der Membranen nicht biotinyliert. Die beschränkte Assoziation von Syntaxin 6 mit den schweren Membranen zeigt, dass intrazelluläre Membranen (Endosomen, Golgi) von der leichten Fraktion ausgeschlossen sind.

Die quantitative Auswertung der aus den Membranfraktionen präzipitierten biotinylierten Proteine (Abb. 4.22 C) zeigt, dass sich PLP und MOG innerhalb von 24 h signifikant von der "schweren" zur "leichten" Membranfraktion verschieben, während MAG in der schweren Membranfraktion verbleibt. Diese Beobachtungen (Abb. 4.21 und Abb. 4.22) lassen auf ein endosomales Recycling, zumindest von PLP und MOG, schließen.

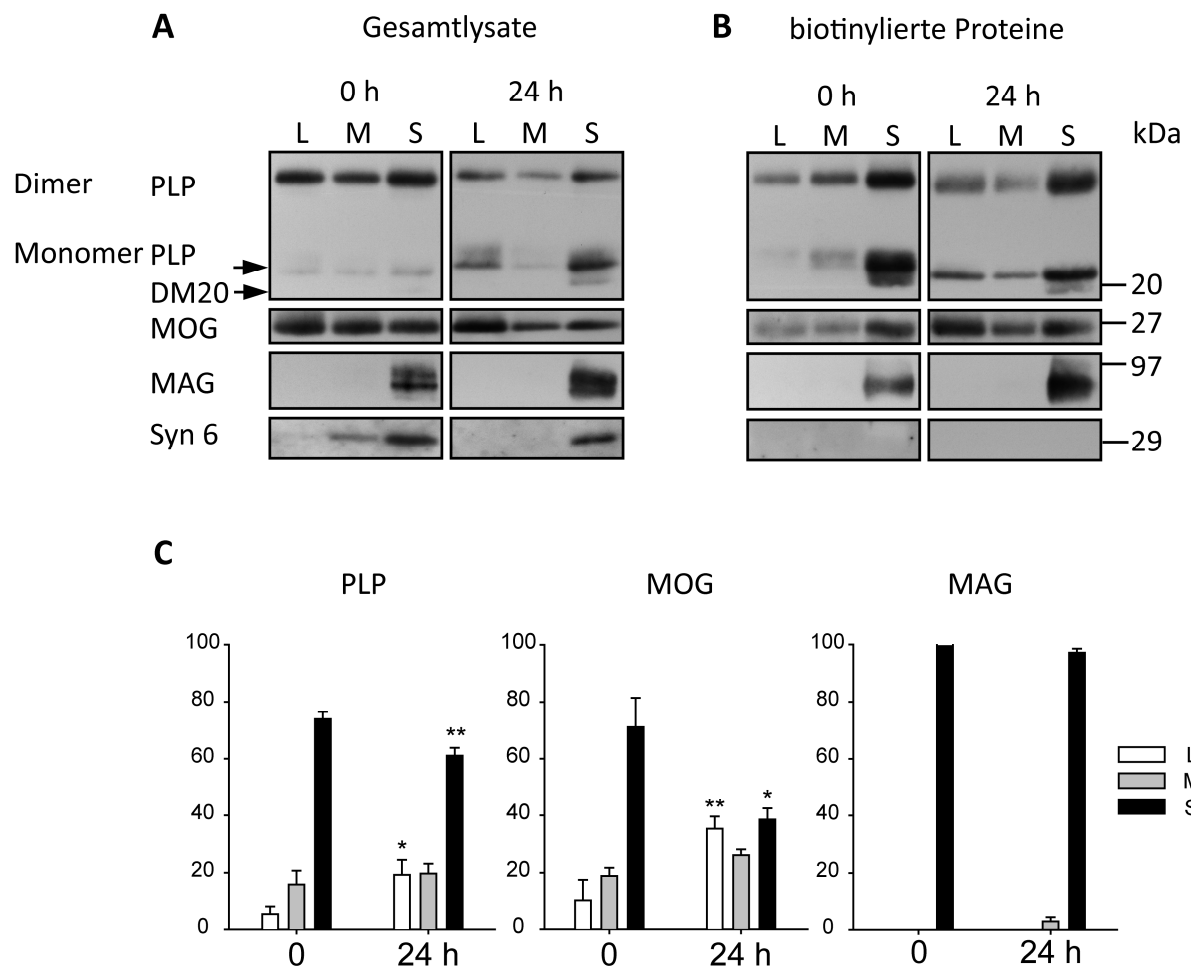


Abb. 4.22: Recycling von zelloberflächenbiotinyliertem PLP, MAG und MOG zu definierten Plasmamembrandomänen.

POI (4 Tage in Kultur) wurden mit 0,5 mg/ml Sulfo-NHS-LC-Biotin zelloberflächenbiotinyliert und mit 50 mM Glycin/PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen direkt oder nach 24 h bei 37°C einer Subfraktionierung unterzogen. Dazu wurde ein PNS hergestellt und dieser für 30 min bei 20.000 x g und 4 °C

4. Ergebnisse

zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml 0,8 M Saccharose resuspendiert und mit 1 ml 0,62 M und 200 µl 0,32 M Saccharose überschichtet. Nach einer 15 minütigen Zentrifugation bei 75.000 x g und 4°C wurden 3 Fraktionen abgesammelt: die 0,32/0,62 M Interphase (L = leichte Membranen), die 0,62/0,8 M Interphase (M = mittelschwere Membranen) und das Pellet (S = schwere Membranen). Die Fraktionen wurden gewaschen, bei 100.000 x g und 4°C pelletiert und in 500 µl RIPA-Puffer bei 4°C solubilisiert und mittels Western-Blot analysiert (A). Alternativ wurden aus den solubilisierten Fraktionen die biotinylierten Proteine mit Neutravidin-*Beads* präzipitiert und mittels Western-Blot analysiert (B). (C) Densitometrische Analyse von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Die relative Verteilung von PLP, MAG und MOG ist als prozentualer Anteil dargestellt. Fehlerbalken repräsentieren den SEM, *p<0,05, **p<0,01 (gepaarter t-Test).

5 Diskussion

5.1 *In vitro* Transportanalysen von Myelinkomponenten

Myelin ist eine architektonisch komplexe Membranstruktur, bestehend aus Subdomänen mit charakteristischer biochemischer Zusammensetzung. Für die Bildung und den Erhalt der unterschiedlichen Membrandomänen sind präzise Sortier- und Transportmechanismen erforderlich, die bisher unerforscht blieben (Krämer et al., 2001; Larocca and Rodriguez-Gabin, 2002). *In vivo* Transportanalysen sind aufgrund der komplexen dreidimensionalen Architektur der Myelinmembran nicht möglich. Eine Voraussetzung für *in vitro* Transportanalysen ist ein Kultursystem, in dem primäre Oligodendrozyten die terminale Differenzierung zu Myelin-produzierenden Zellen unterlaufen. Zwar existieren verschiedene Neuron-Glia Kokultur-Systeme (Fitzner et al., 2006; Lubetzki et al., 1993; Shaw et al., 1996; Svenningsen et al., 2003), jedoch ist in diesen die Myelinbildung sehr ineffizient. Zudem ist die selektive Manipulation oligodendroglialer Transportwege schwer durchführbar und schwer statistisch signifikant zu erheben.

Verschiedene einfache Zellkultursysteme haben gezeigt, dass es möglich und sinnvoll ist, Transportwege komplexer Systeme zu analysieren. Beispiele dafür sind PC12 Zellen als Modell für Membrantransport und die Freisetzung von Neurotransmittern in Neuronen (Martin and Grishanin, 2003) oder MDCK Zellen, die als Modell für polare Epithelien dienen (Mostov et al., 2003). Um die Komplexität des Analysesystems zunächst möglichst einfach zu gestalten, wurde im Laufe dieser Arbeit auf primäre Oligodendrozyten und die Zelllinie Oli-neu als Modellsysteme zurückgegriffen.

Sogar in Abwesenheit von Neuronen differenzieren primäre Oligodendrozyten auch in zweidimensionalen Kultursystemen spontan und bilden ausgedehnte Membransysteme mit multilamellaren Myelin-ähnlichen Strukturen (MLMs), die ultrastrukturell an kompaktes Myelin erinnern (Dubois-Dalcq et al., 1986; Schneider et al., 2005). Im Laufe dieser Arbeit lag das Interesse auf Transportanalysen der Myelinproteine PLP, MAG und MOG, die als Beispiele für die Lokalisierung im kompakten Myelin, in der periaxonalen Membran bzw. abaxonalen Membran des nicht-kompakten Myelins dienten (Arroyo and Scherer, 2000). Interessanterweise zeigten die immunzytochemischen und biochemischen Analysen von

differenzierten primären Oligodendrozyten, dass PLP, MAG und MOG vergleichbar zum Myelin, mit unterschiedlichen Membrandomänen assoziieren. In wieweit die biochemische Zusammensetzung der Membrandomänen von primären Oligodendrozyten jedoch mit denen der reifen Myelindomänen übereinstimmen ist umstritten, weshalb eine präzisere Charakterisierung z.B. unter Verwendung weiterer Markerproteine für kompaktes und nicht-kompaktes Myelin erforderlich ist.

MOG ist im Myelin vorwiegend in der abaxonalen Membran lokalisiert und wird daher als Bestandteil des nicht-kompakten Myelins betrachtet (Johns and Bernard, 1999). In der hier durchgeführten Membranfraktionierung assoziierte MOG hingegen mit Komponenten des kompakten Myelins in der "leichten" Fraktion. Betrachtet man Myelin im Querschnitt wird deutlich, dass nur ca. 5 - 20 % des Kreisumfangs der abaxonalen Lamelle Zytoplasma enthalten. Die Tatsache, dass der Rest der abaxonalen Lamelle sowohl eine *major dense line*, als auch eine *intraperiod line* mit nah benachbarten Internodien ausbildet und daher Eigenschaften des kompakten Myelins besitzt (Trapp und Kidd, 2004), könnte die Einbindung von MOG in kompakten Membranen erklären.

Obwohl Komponenten des nicht-kompakten Myelins wie z.B. MAG und OSP/Claudin, biochemisch ausschließlich mit der "schweren" Membranfraktion assoziierten, war generell die Assoziation eines Proteins mit einer einzigen Fraktion bei dieser Art Experiment nicht zu erwarten. Jedoch war das Verteilungsmuster für PLP, MAG und MOG zu dem vom Myelin vergleichbar und für jedes Protein charakteristisch. Daher agieren in dieser Art Kultursystem Sortier- und Transportmechanismen, die zu einer Bildung von definierten Membrandomänen beitragen. Folglich wurde die Membranfraktionierung als geeignete Methode angesehen, um die Umverteilung von PLP, MAG und MOG an der Plasmamembran von primären Oligodendrozyten zu studieren.

Da sich primäre Oligodendrozyten schwer manipulieren lassen, wurde für die Transportanalysen der Myelinproteine die oligodendrogliale Zelllinie Oli-neu genutzt (Jung et al., 1995). Oli-neu Zellen verhalten sich wie primäre Oligodendrozyten und sind daher für Transportanalysen von Myelinproteinen gut geeignet (Erb et al., 2003; Jung et al., 1995; Kippert et al., 2007; Trajkovic et al., 2006).

Oli-neu Zellen exprimieren kein MOG und nur sehr geringe Mengen endogenes PLP und MAG, weshalb eine Transfektion und daraus resultierende Überexpression der Proteine im

Rahmen dieser Arbeit notwendig war. Die subzelluläre Lokalisierung der Myelinproteine war nach Überexpression identisch zu der von primären Oligodendrozyten. Außerdem wurden wenn möglich, alle in Oli-neu Zellen erzielten Ergebnisse mit primären Oligodendrozyten verglichen und bestätigt. Zwar metabolisieren Oli-neu Zellen schneller, jedoch ist diese Beobachtung aufgrund der optimalen Anpassung von Zelllinien an Kulturbedingungen nicht überraschend.

Die Ergebnisse der Transportanalysen an primären Oligodendrozyten und oligodendroglialen Zelllinien liefern wichtige Prinzipien, welche letztendlich an *in vivo* Modellen getestet werden können.

5.2 Die intrazelluläre Lokalisierung von PLP in LE/Lys

5.2.1 Die Funktion von LE/Lys als Membranspeicher

Die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse demonstrieren, dass während der spontanen Differenzierung von primären Oligodendrozyten *in vitro*, eine Umverteilung des Hauptmyelinproteins PLP stattfindet. Im intermediären Entwicklungsstadium reicherten die Zellen, PLP zunehmend in perinukleär lokalisierten LE/Lys an. Mit weiterer Differenzierung und der Ausbildung von ausgedehnten, PLP enthaltenden Membranstrukturen, verteilten sich die LE/Lys bis in die distalen Membranfortsätze. Zudem nahm die Menge an PLP in perinukleär lokalisierten LE/Lys wieder ab. Desweiteren waren die LE/Lys in den wachsenden Fortsatzspitzen von Oli-neu Zellen zu beobachten. Diese Beobachtungen sowie die von (Krämer et al., 2001) und (Trajkovic et al., 2006) gezeigten Studien lassen vermuten, dass die PLP enthaltenden LE/Lys als sekretorische Organellen dienen.

Drei verschiedene, im Laufe dieser Arbeit gemachte Beobachtungen unterstützen diese Hypothese. Zum Einen zeigten lebendzellmikroskopische Analysen die Fusion von großen PLP-enthaltenden Organellen mit der Plasmamembran. Desweiteren wurde das Lysosomen-assoziierte Membranprotein 1 (LAMP1) immunzytochemisch und mittels Immuno-Elektronenmikroskopie an der Zelloberfläche von Oli-neu Zellen und primären Oligodendrozyten detektiert. Darüber hinaus wurden Exosomen im Kulturüberstand von primären Oligodendrozyten und Oli-neu Zellen entdeckt, die verstärkt PLP enthielten. Diese können nur durch Fusion von MVBs mit der Plasmamembran freigesetzt werden. Das Lysosom wurde bisher hauptsächlich bei Zellen des Immunsystems als sekretorisches

Speicherorganell beschrieben (Kap. 2.3.4; Griffiths, 2002; Stinchcombe et al., 2004). Oft wird durch die Exozytose der klassischen sekretorischen Lysosomen, lösliches Material in den extrazellulären Raum freigesetzt. Bei Oligodendrozyten hingegen bestünde die Funktion der Organellen in der Speicherung und im Transport von Membranbestandteilen. Die multilamellare bzw. -vesikuläre Ultrastruktur der PLP enthaltenden LE/Lys verdeutlicht die enorme Speicherkapazität dieser Organellen für Membranbestandteile, die für die Myelinbildung benötigt werden. Die Beobachtungen, dass ein Großteil von PLP in LE/Lys akkumuliert ohne abgebaut zu werden (Simons et al., 2002; Trajkovic et al., 2006) und dass am Abbau von PLP das Proteasom beteiligt ist (Krämer-Albers et al., 2006; McLaughlin et al., 2006) unterstützen diese Hypothese.

Eine Funktion der LE/Lys bei der Speicherung von Membrankomponenten wurde u.a. bereits für dendritische Zellen beschrieben. Hier endozytieren unreife Zellen große Mengen MHC II Moleküle und speichern diese in Lysosomen (Pierre et al., 1997), bis sie inflammatorischen Signalen ausgesetzt werden, die den Transport der MHC II Moleküle an die Plasmamembran, durch Exozytose der Lysosomen induzieren (Boes et al., 2002; Chow et al., 2002; Kleijmeer et al., 2001; Mellman and Steinman, 2001). Dendritische Zellen setzen außerdem Exosomen mit MHC II Molekülen frei, die die Immunkompetenz von Nachbarzellen modulieren. Auch Oligodendrozyten setzen Exosomen frei. Möglicherweise dienen sie in Kultur als zusätzliches Transportsystem, um überschüssige Myelinkomponenten zu beseitigen. Alternativ könnten sie jedoch auch eine Funktion bei der interzellulären Kommunikation im zentralen Nervensystem übernehmen.

PLP ist verstärkt auf den internen Lamellen bzw. Vesikeln der LE/Lys zu beobachten und wird auch über diese in Form von Exosomen in den extrazellulären Raum freigesetzt. Da in den meisten Zelltypen das in diese intraluminalen Vesikel der LE/Lys sortierte Material für den lysosomalen Abbau bestimmt ist, stellt sich die Frage, warum PLP in einer für den Proteinabbau herrschenden Umgebung stabil bleibt. Möglicherweise besitzen Oligodendrozyten spezielle LE/Lys mit geringer proteolytischer Aktivität. In dendritischen Zellen wird lysosomaler Abbau beispielsweise entwicklungsabhängig reguliert (Delamarre et al., 2005; Trombetta et al., 2003). Desweiteren könnte PLP prinzipiell schwer degradierbar sein, was seine Anreicherung in LE/Lys erklären würde. Jedoch sind nicht alle intraluminalen Membranen der LE/Lys für den Abbau bestimmt, sondern können auch mit der limitierenden

Membran der Organellen zurück fusionieren. Die Membrankomponenten können dann über tubulovesikuläre Organellen zur Plasmamembran transportiert werden (Abrami et al., 2004; Boes et al., 2002; Chow et al., 2002; Kleijmeer et al., 2001; Le Blanc et al., 2005; van Niel et al., 2006). Ob PLP über Rückfusion und tubuläre Strukturen von LE/Lys an die Zelloberfläche sortiert wird, wurde bisher nicht gezeigt. Unter *Steady State*-Bedingungen sind PLP enthaltende tubuläre Strukturen nicht zu beobachten, jedoch könnte die Ursache hierfür auch dessen transiente Lokalisierung in diesen Strukturen sein. Eigene lebendzellmikroskopische Analysen (nicht dargestellt), ließen PLP-EGFP hin und wieder in sich fortbewegenden tubulären Strukturen erkennen. Zumindest legt die multilamellare Ultrastruktur der LE/Lys in primären Oligodendrozyten nahe, dass hier eine vermehrte Rückfusion von intraluminalen Vesikeln mit der limitierenden Membran stattgefunden hat.

5.2.2 Findet Ca^{2+} -abhängige Exozytose von PLP enthaltenden LE/Lys statt?

Die klassische regulierte Exozytose wie z.B. die Freisetzung von Neurotransmittern oder die Sekretion von Hormonen verläuft nach einem Ca^{2+} -abhängigen Mechanismus, wohingegen konstitutive Exozytose für den Transport von neu synthetisierten Membranproteinen zur Plasmamembran und für die Freisetzung von Proteinen der extrazellulären Matrix verantwortlich ist. Allerdings wurde erst spät entdeckt, dass der Anstieg von intrazellulärem Ca^{2+} auch bei nicht-sekretorischen Zellen, Exozytose auslöst (Chavez et al., 1996; Coorssen et al., 1996). Dabei wurde gezeigt, dass hauptsächlich in der Nähe der Plasmamembran lokalisierte Lysosomen nach einem Ca^{2+} -abhängigen Mechanismus exozytieren (Jaiswal et al., 2002). Diese Art der Exozytose spielt z.B. beim Erhalt der Integrität der Plasmamembran eine entscheidende Rolle (Reddy et al., 2001). Interessanterweise trägt desweiteren während der Entwicklung von primären Neuronen die Ca^{2+} -regulierte Exozytose von LE/Lys an der Fortsatzspitze zum Neuritenwachstum bei (Arantes and Andrews, 2006). LE/Lys fungieren in diesem Zusammenhang als Membranspeicher, die bei Gebrauch Ca^{2+} -abhängig mobilisiert werden und Membrankomponenten zum Ausbau der Plasmamembran beisteuern. Da Oligodendrozyten das Hauptmyelinprotein PLP in LE/Lys anreichern und die Myelinbildung die regulierte Mobilisierung großer Membranmengen innerhalb kurzer Zeit erfordert, wäre auch hier ein Ca^{2+} -regulierter Mechanismus der Exozytose von LE/Lys denkbar.

Um die regulierte Exozytose der LE/Lys in Oligodendrozyten zu stimulieren, wurde der Einfluss des Ca^{2+} -Ionophors Ionomycin auf das Transportverhalten der Myelinproteine und des LE/Lys Markers LAMP1 untersucht. Lange Inkubationszeiten mit geringer Ionomycin-Konzentration schien dabei die vermehrte Bildung von PLP enthaltenden intrazellulären und extrazellulären multilamellaren, Myelin-ähnlichen Membransystemen (MLMs) zu induzieren. Auf den extrazellulären MLMs wurde mittels Immuno-Elektronenmikroskopie zudem vermehrt LAMP1 detektiert. Außerdem konnte die Freisetzung von Exosomen mit Ionomycin stimuliert werden. Ionomycin-behandelte Zellen zeigten Exosomen in der Nähe ihrer Plasmamembran (diese Arbeit) sowie eine größere Menge Exosomen im Zellkulturüberstand (Bretz 2006, Diplomarbeit).

Die Sekretion von Lysosomen bringt automatisch die Translokation des lysosomalen Proteins LAMP1 an die Plasmamembran mit sich. Diese Translokation konnte leider nicht zweifelsfrei nachgewiesen werden. Allerdings muss LAMP1 nach der Exozytose wieder zum Lysosom recycelt werden. Demnach kann LAMP1 nur vermehrt an der Zelloberfläche detektiert werden wenn die Exozytose von LAMP1 gegenüber dessen Endozytose überwiegt. Innerhalb von 1,5 Stunden Ionomycin-Behandlung fand vermutlich Endozytose statt und so war das Gleichgewicht wieder hergestellt. Kurze Inkubationszeiten mit höheren Konzentrationen Ionomycin führten hingegen zu einer verstärkten Detektion von LAMP1 an der Zelloberfläche. Allerdings ist hierbei nicht auszuschließen, dass hohe Konzentrationen Ionomycin möglicherweise auch zu einer Ruptur der Plasmamembran führten, was wiederum die Exozytose von LE/Lys als Reparaturmechanismus ausgelöst haben könnte (Reddy et al., 2001).

Ein weiterer Versuch, die stimulierte Exozytose nachzuweisen, basierte auf der Vorstellung, dass nach der Exozytose mehr MLMs zu detektieren sein sollten. Immunfluoreszenzfärbungen deuteten dies zwar an, jedoch lassen sich solche Färbungen schwer quantifizieren. Die biochemische Isolierung aufgrund ihrer Dichte zeigte leider keine eindeutige Vermehrung von Membranen mit geringer Dichte. Möglicherweise besitzen die sekretorischen Lysosomen jedoch selbst eine geringe Dichte und sind so biochemisch nicht von extrazellulären MLMs zu unterscheiden. Dafür spricht die Anwesenheit von LAMP1 in den MLMs vor und nach Ionomycin-Behandlung. Die Translokation der Lysosomen zur Plasmamembran bzw. MLMs ist damit mit dieser Methode biochemisch nicht erfassbar.

Zusammengefasst wurden durch die Behandlung von primären Oligodendrozyten mit Ionomycin keine eindeutigen und zweifelsfreien Ergebnisse erzielt. Prinzipiell ist die stimulierte Exozytose von Myelinproteinen in Oligodendrozyten schwer zu erfassen und zu quantifizieren, da sich bereits ohne Stimulus ein erheblicher Teil der Proteine an der Plasmamembran befindet. Ein möglicher Weg wäre die Nutzung der *Total Internal Reflection Fluorescent Microscopy* (TIR-FM), mit der Exozytose-Vorgänge eindeutig visualisiert und quantifiziert werden können.

5.3 Myelinproteine werden endosomal sortiert

Für die vollständige Myelinisierung aller Axone muss die Differenzierung von Oligodendrozyten-Vorläuferzellen zeitlich und räumlich koordiniert werden (Simons and Trajkovic, 2006). Dazu zählt u.a. der zielgerichtete Transport großer Mengen an Membrankomponenten in Richtung Axon zu einem definierten Zeitpunkt (Krämer et al., 2001; Pfeiffer et al., 1993). Da Oligodendrozyten viele Axone gleichzeitig myelinisieren, wäre die endosomale Speicherung eines Membranpools der zur Myelinbildung Signal-gesteuert aktiviert werden kann ein gutes Modell, um diesen Anforderungen gerecht zu werden. Es stellte sich die Frage, ob Endozytose ein gemeinsames Merkmal von Myelinproteinen ist. Daher wurden neben PLP, die Myelinproteine MAG und MOG analysiert, welche in unterschiedlichen Domänen der Myelinmembran lokalisiert sind (Arroyo and Scherer, 2000). Mit Hilfe von Zelloberflächenbiotinylierung und der Antikörper-Endozytose konnte unabhängig voneinander gezeigt werden, dass in Oligodendrozyten neben PLP auch MAG und MOG endozytiert werden und dass die Endozytose spezifisch für die Myelinproteine erfolgt.

Die Sekundärantikörper-induzierte Quervernetzung der Proteine an der Plasmamembran war nicht die Ursache für die Endozytose der Proteine, da Versuche unter Ausschluss des Sekundärantikörpers zu identischen Ergebnissen führten. Die Sekundärantikörper-vermittelte Quervernetzung führte allerdings deutlich zur Bildung von sogenannten *Patches* nicht-endozytierter Proteine an der Plasmamembran, was deren Anreicherung in *Lipid Rafts* widerspiegeln könnte. Für MAG und MOG wurde beschrieben, dass sie nach Antikörper-induzierter Quervernetzung in *Lipid Rafts* sortiert werden, was zur Aktivierung von Signalkaskaden und zu einer veränderten Morphologie von primären Oligodendrozyten führt

(Marta et al., 2005; Marta et al., 2004; Marta et al., 2003). In der Tat könnten die Zellen bei der Antikörper-Endozytose, durch Antikörper hervorgerufene Signale beeinflusst werden, jedoch zeigten die Biotinylierungs-Experimente überzeugend, dass Endozytose ohne die Anwendung von Antikörpern und spezifisch für Myelinproteine erfolgte.

Obwohl die ektopische Überexpression der Myelinproteine in Oli-neu Zellen mit großer Wahrscheinlichkeit zu ihrer Endozytose beitrug, ergaben die Versuche mit Oli-neu Zellen im Vergleich zur endogenen Expression der Myelinproteine in primären Oligodendrozyten qualitativ identische Ergebnisse. Da Zellen von immortalisierten Linien generell eine höhere metabolische Aktivität aufweisen, ist eine effizientere Endozytose in Oli-neu Zellen im Vergleich zu primären Zellen nicht überraschend und daher ist wohl auch der Umsatz der Membrankomponenten beschleunigt.

Interessanterweise wurden PLP, MAG und MOG unterschiedlich endosomal sortiert. PLP wurde Cholesterin-abhängig, MAG und MOG hingegen Clathrin-abhängig endozytiert. PLP und MAG erreichten LE/Lys, MOG hingegen Recycling-Endosomen. Die Clathrin-unabhängige Endozytose von PLP wurde auch in einer anderen Studie von (Trajkovic et al., 2006) gezeigt. Diese Arbeit zeigt außerdem, dass in Antwort auf lösliche neuronale Faktoren eine Umverteilung von PLP von LE/Lys an die Plasmamembran erfolgt. Dabei wird die Endozytose von PLP von der Aktivität der GTPase Rho reguliert und trägt möglicherweise zum Gleichgewicht von Exozytose und Endozytose während der Myelinisierung bei (Kippert et al., 2007; Trajkovic et al., 2006).

Die vorliegende Arbeit vergleicht die Endozytose von PLP, MAG und MOG. Obwohl beide Proteine, PLP und MAG zu LE/Lys sortiert werden, akkumuliert ausschließlich PLP, wohingegen die Lokalisierung von MAG in LE/Lys transient erscheint. Diese Beobachtungen deuten auf unterschiedliche Halbwertszeiten von PLP und MAG in LE/Lys hin. Möglicherweise ist PLP prinzipiell schwer degradierbar, wohingegen MAG im sauren Milieu der LE/Lys schneller abgebaut wird. Alternativ könnte auch ein schnelleres Recycling von MAG zur Plasmamembran oder zum Golgi-Apparat für seine transiente Lokalisierung in den LE/Lys verantwortlich sein. Interessanterweise wurde MAG bereits in früheren immunoelektronenmikroskopischen Studien in multivesikulären Organellen (MVBs) im Oligodendrozyten-Zellkörper sowie in den Fortsätzen detektiert und zwar ausschließlich in Entwicklungsstadien, in denen aktive Myelinbildung stattfand (Trapp et al., 1989).

MAG besitzt zwei Isoformen. L-MAG wird hauptsächlich während der Entwicklung

exprimiert, wohingegen S-MAG im adulten Nervensystem präsent ist. L-MAG besitzt zwei Tyrosin-basierte Sortiersignale, wohingegen S-MAG nur ein Tyrosin-Motiv besitzt. Es wurde vermutet, dass ausschließlich überschüssiges L-MAG endozytiert und so von der periaxonalen Membran entfernt wird (Bo et al., 1995). Hier wäre jedoch auch möglich, dass die Detektion von MAG in MVBs während aktiver Myelinisierungsphasen dessen endosomales Recycling widerspiegelte. Da nach getrennter Expression von L- bzw. S-MAG in Oli-neu Zellen, beide Isoformen identisches Endozytose- und Transportverhalten zeigten, liegt es nahe, dass ein einziges Tyrosin-Signal (bei S-MAG) für die Rekrutierung von MAG in *Clathrin-coated Pits* ausreicht.

Interessanterweise bestreiten PLP, MAG und MOG nach ektopischer Expression in polaren MDCK Zellen (*Mardin-Darby Canine Kidney*) unterschiedliche Transportwege. PLP wird spezifisch zur apikalen und MOG zur basolateralen Membrandomäne transportiert. MAG weist hingegen keine eindeutige Lokalisierung in einer bestimmten Membrandomäne auf (Kroepfl and Gardinier, 2001b; Minuk and Braun, 1996). Die gleichen Sortiersignale, welche zu einem polaren Transport von PLP und MOG in Epithelzellen führen, bestimmen höchstwahrscheinlich auch deren individuelles endosomales Schicksal in Oligodendrozyten. So assoziiert PLP in Oligodendrozyten im *trans*-Golgi-Netzwerk mit *Lipid-Rafts* (Simons et al., 2000), die vermutlich seinen Transport zur apikalen Membrandomäne in MDCK Zellen bestimmen (Ikonen and Simons, 1998). Folgerichtig wird PLP über einen Cholesterin-abhängigen Mechanismus endozytiert. MOG besitzt hingegen Di-Leucin sowie Tyrosin-basierte Sortiersignale, welche für die Sortierung des Proteins zur basolateralen Membrandomäne in MDCK Zellen verantwortlich sind (Kroepfl and Gardinier, 2001a) und vermutlich zu dessen Rekrutierung in *Clathrin-coated Pits* führen. Die nicht eindeutige Lokalisierung von MAG zu einer definierten Membrandomäne zeigt, dass MAG keine von Epithelzellen erkannte Sortiersignale besitzt. Die spezifische Assoziation mit der periaxonalen Membran erfordert möglicherweise zusätzliche, Oligodendrozyten-spezifische Sortiersignale (Kroepfl and Gardinier, 2001b).

Aber warum werden Myelinproteine solch komplexen endosomal Transportwegen ausgesetzt? Es wäre in der Tat möglich, dass Oligodendrozyten die in Kultur kein vollständig entwickeltes Myelin bilden, einen erhöhten Umsatz überschüssiger Myelinproteine besitzen. In diesem Fall würden die Myelinproteine jedoch ein und denselben degradativen

Transportweg zu den Lysosomen einschlagen, was mit der hier beobachteten Sortierung zu unterschiedlichen Zielkompartimenten im Widerspruch steht.

In letzter Zeit ermöglichten hochentwickelte *Imaging* Techniken, wie z.B. TIR-FM (Merrifield et al., 2002; Rappoport et al., 2004), *Laser Scanning* Mikroskopie und *Spinning Disc* Mikroskopie (Ehrlich et al., 2004) die Entschlüsselung der unerwarteten Vielfalt und Flexibilität des endosomalen Systems. Dabei spielen Endosomen aufgrund ihrer Organisation innerhalb der Zelle u. a. eine Schlüsselrolle bei der Sortierung von Proteinen entlang des biosynthetischen Wegs und bei Transportwegen, die für die Zellmorphogenese von Bedeutung sind. Die Komplexität des endosomalen Systems ist zudem in polaren Zellen erhöht, da diese Zellen mit einer asymmetrischen Umgebung interagieren (Perret et al., 2005).

Zusammengefasst führten die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse zu der Hypothese, dass die unterschiedlichen endosomalen Transportwege von Myelinproteinen in Oligodendrozyten, durch Sortierung und Umverteilung der Komponenten, zur Morphogenese der Myelindomänen beitragen.

5.4 Die Rolle von endosomalem Recycling bei der Bildung der Myelindomänen

Primäre Oligodendrozyten bilden in Kultur Membrandomänen, die den Myelindomänen in ihrer biochemischen Zusammensetzung ähneln. Um das Recycling von endozytierten Myelinproteinen zu diesen definierten Domänen der oligodendroglialen Plasmamembran zu untersuchen, wurden nach Zelloberflächenbiotinylierung und anschließender Inkubation der Zellen bei 37°C, die Zellmembranen subfraktioniert und die Membranfraktionen auf die Anwesenheit biotinylierter Proteine analysiert. Das Protokoll der Subfraktionierung von Myelin ist eine gut etablierte und charakterisierte Methode (Matthieu et al., 1973), welche hauptsächlich für die Trennung paranodaler Membranen vom Myelin genutzt wurde (Rios et al., 2000). Sie wurde hier eingesetzt, um die Umverteilung biotinylierter Myelinproteine zwischen den Membrandomänen von primären Oligodendrozyten nachzuweisen und zu quantifizieren.

Die quantitativ signifikante Verschiebung von PLP und MOG innerhalb der Fraktionen, zeigt eindeutig, dass die Proteine innerhalb von 24 h mit unterschiedlichen

5. Diskussion

Membrankompartimenten assoziierten. Diese Membrankompartimente sind biochemisch identisch oder sehr ähnlich mit den Domänen des Myelins. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass endosomales Recycling und Sortieren bei der Bildung der Myelindomänen eine Rolle spielen. Eine Umverteilung von MAG ist hingegen nicht zu erwarten, da MAG durchweg mit "schweren" Membranen assoziierte. Zwar wurde die Endozytose von MAG in primären Oligodendrozyten tatsächlich gezeigt, jedoch kann dessen Recycling aufgrund der ausschließlichen Assoziation mit "schweren" Membranen nur vermutet werden.

Die Verschiebung von PLP und MOG innerhalb der Fraktionen wird hier als endosomales Recycling der Proteine interpretiert, wobei nicht eindeutig bewiesen ist, inwieweit Endozytose und Recycling der biotinylierten Proteine in diesem Versuch tatsächlich stattfand. Nichtsdestotrotz gibt es indirekte Hinweise für Endozytose und Recycling. Dafür spricht erstens das morphologische Verteilungsmuster biotinylierter Proteine, welches sich direkt nach der Biotinylierung auf den Zellkörper beschränkte, nach 4 h bei 37°C in endosomalen Organellen detektierbar war und sich nach 24 h bei 37°C auf periphere MLMs verteilte. Zweitens demonstriert die Kolo-kalisierung von PLP, MAG und MOG mit endozytiertem Biotin, dass innerhalb von 4 h auch tatsächlich biotinylierte Myelinproteine endozytiert wurden.

Einen eindeutigen Beweis würde dieser Versuchsansatz unter Verwendung von abspaltbarem Biotin erbringen. Aufgrund dessen Sensitivität gegenüber dem intrazellulären Milieu der Zellen (z.B. Abspaltung in späten Endosomen) wurde dies als aussichtslos erachtet. Eine weitere Möglichkeit dieses Problem zu lösen, wäre die vollständige Hemmung von Endozytose durch Hemmstoffe. In einem solchen Experiment könnte die Umverteilung der Myelinproteine nicht erfolgen, womit bewiesen wäre, dass funktionierende Endozytose die Voraussetzung darstellt. Prinzipiell ist die Inhibierung von Endozytose jedoch nur begrenzt durchführbar. Endozytose ist ein essentieller Transportmechanismus, so dass dessen vollständige Inhibierung über mehrere Stunden wohl zum Absterben der Zellen führen würde. Auch *in vivo* Studien wären vermutlich aufgrund der starken Nebeneffekte zum Scheitern verurteilt.

Oligodendrozyten werden mit der Anforderung konfrontiert, innerhalb kurzer Zeit mehrere Axonsegmente simultan zu myelinisieren. Die Kinetik der Protein- und Lipidsynthese ist oft zu langsam, um solch eine rapide Vergrößerung der Membranfläche zu gewährleisten (Lecuit

and Pilot, 2003; Lecuit and Wieschaus, 2000; Truschel et al., 2002; Wirtz and Dobbs, 1990). Daher müssen intrazelluläre Membranreservoirs griffbereit sein, um das Wachstum der Plasmamembran zu unterstützen. Die im Laufe dieser Arbeit erzielten Ergebnisse weisen daraufhin, dass die rapide Mobilisierung sowie die lokale Umgestaltung von Membranen in Oligodendrozyten möglicherweise durch die regulierte Endozytose und Exozytose von endosomalen Membranreservoirs gewährleistet wird. Neueste Studien betonen die Bedeutung von endosomalem Recycling für die Morphogenese von Geweben (Lecuit and Pilot, 2003). Dazu zählen unter anderem die Biogenese der Membrandomänen in polaren Epithelien (Perret et al., 2005), das Neuritenwachstum (Alberts and Galli, 2003) und das axonale Targeting (Wisco et al., 2003) sowie das rapide Ausbreiten von Lamellipodien in migrierenden Zellen (Bretscher and Aguado-Velasco, 1998).

Interessanterweise lässt sich die Regulation des Transports von Myelinproteinen in Oligodendrozyten mit den Veränderungen im Membrantransport während der Entwicklung von polaren Geweben gut vergleichen (Mostov et al., 2003). Während der Tubulogenese depolarisieren Epithelzellen nach außen hin, entwickeln jedoch zur apikalen und basolateralen Membrandomäne äquivalente, intrazelluläre Kompartimente. Dabei leiten die Zellen bei Verlust ihrer Plasmamembrandomänen den gerichteten Transport in diese intrazellulären Kompartimente um, wodurch die Sortierung von Proteinen erhalten bleibt. Die Polarisierung der Plasmamembran beinhaltet hingegen das erneute Umleiten der Membranen von intrazellulären Reservoirs zur apikalen bzw. basolateralen Plasmamembrandomäne (Low et al., 2000).

Auch wenn prinzipiell nicht ausgeschlossen wird, dass der direkte Transport von Myelinkomponenten vom Golgi-Apparat an der Myelinbildung beteiligt ist, unterstützen die hier erzielten Ergebnisse das Konzept, dass endosomales Recycling an der Morphogenese von kompakten, periaxonalen, abaxonalen und paranodalen Domänen der reifen Myelinmembran beteiligt ist. Endosomales Recycling von Myelinproteinen ist möglicherweise die Grundvoraussetzung für die lokale Umgestaltung von Membranregionen während der simultanen Myelinisierung mehrerer Axonsegmente. Myelinisierende Oligodendrozyten dienen daher als perfektes Modell, wie Zellen die Umgestaltung ihrer Membranen als Reaktion auf ihre Umwelt kontrollieren.

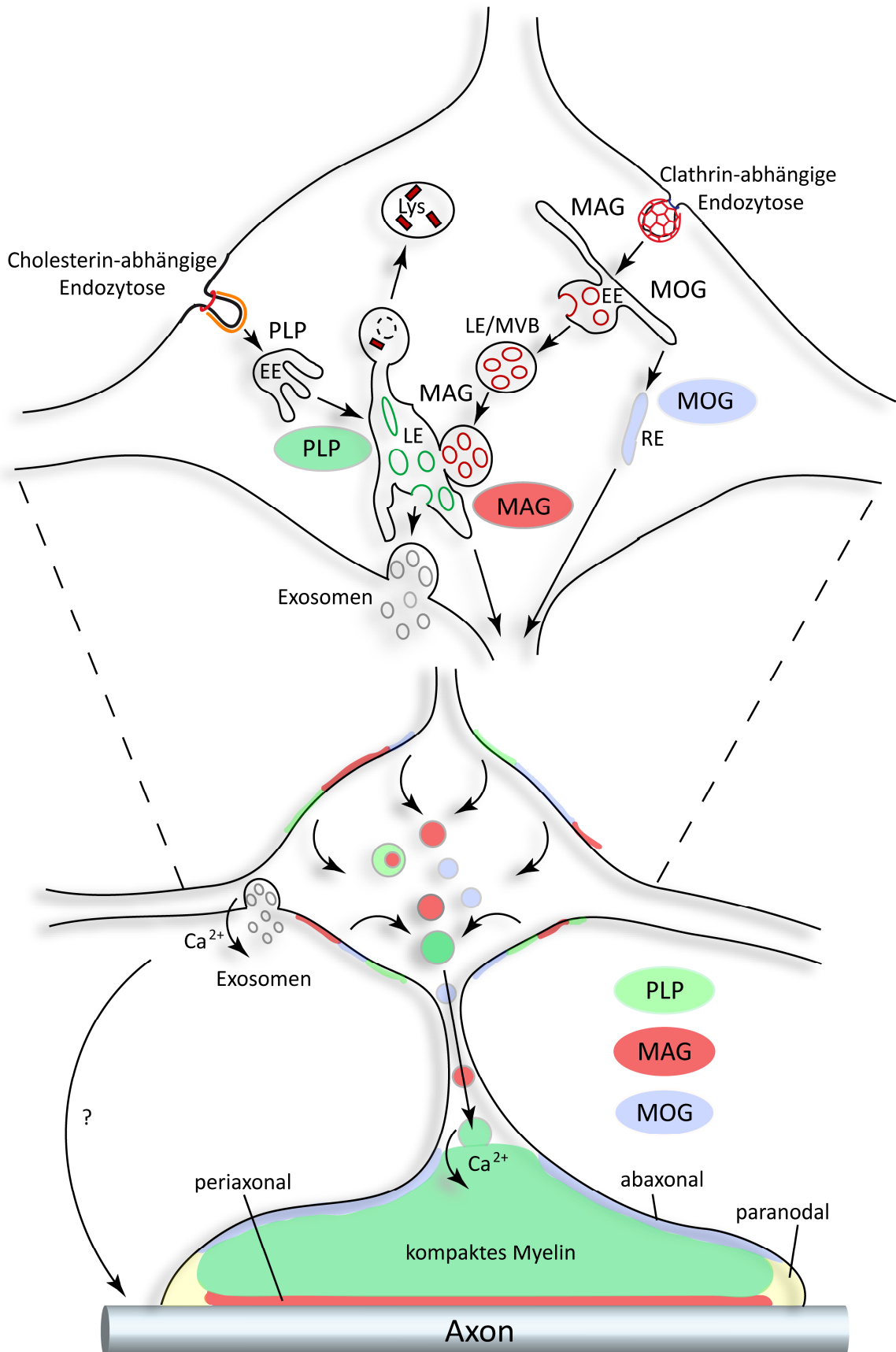


Abb. 5.1: Schematische Darstellung zentraler Aussagen der Arbeit.

EE, frühes Endosom; LE, spätes Endosom; Lys, Lysosom RE, Recycling-Endosom; MAG, Myelin-assoziiertes Glykoprotein; MOG, Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein, MVB, multivesikuläres Endosom; PLP, Proteolipid Protein.

6 Zusammenfassung

Das Myelin des zentralen Nervensystems ist eine ausgedehnte spezialisierte Membran, bestehend aus Domänen mit charakteristischer Protein- und Lipidzusammensetzung. Zum Aufbau dieser Domänen sind präzise Transport- und Sortiermechanismen der Myelinkomponenten erforderlich, die bisher weitestgehend unentschlüsselt blieben. Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Exo- und Endozytosemechanismen der Myelinproteine PLP, MAG und MOG, die als Beispiele für die Lokalisierung im kompakten Myelin, der periaxonalen Membran und der abaxonalen Membran des nicht-kompakten Myelins dienten. Als Modellsysteme wurden primäre Oligodendrozyten und Oli-neu Zellen verwendet.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch in primären Oligodendrozyten in Kultur, Transportwege und Sortiermechanismen existieren, die zur Ausbildung von definierten Membrandomänen, ähnlich wie im Myelin führen. Es wurde demonstriert, dass das in späten Endosomen/Lysosomen angereicherte Hauptmyelinprotein PLP (Krämer et al., 2001; Trajkovic et al., 2006) über deren Exozytose wieder an die Plasmamembran transportiert oder in Form von Exosomen in den extrazellulären Raum freigesetzt wird. Zudem wurden Hinweise erbracht, dass die Exozytose der PLP enthaltenden späten Endosomen/Lysosomen nach einem Ca^{2+} -abhängigen Mechanismus verläuft. Interessanterweise ist die endosomale Sortierung ein gemeinsames Merkmal der Myelinproteine. So wird PLP über einen Clathrin-unabhängigen, MAG und MOG hingegen über einen Clathrin-abhängigen Weg endozytiert. Dabei werden die Proteine zu unterschiedlichen endosomalen Zielkompartimenten sortiert. PLP und MAG erreichen die späten Endosomen/Lysosomen, MOG hingegen die Recycling-Endosomen. Desweiteren wird vermutet, dass PLP, MAG und MOG zu unterschiedlichen oligodendroglialen Membrandomänen recyceln, welche charakteristische biochemische Eigenschaften der Myelindomänen besitzen.

Die Ergebnisse legen nahe, dass endosomales Recycling an der Umgestaltung der oligodendroglialen Plasmamembran beteiligt ist, was zur Ausbildung von Membrandomänen führt, die den Myelindomänen ähneln.

7 Referenzen

- Abrami, L., M. Lindsay, R.G. Parton, S.H. Leppla, and F.G. van der Goot. 2004. Membrane insertion of anthrax protective antigen and cytoplasmic delivery of lethal factor occur at different stages of the endocytic pathway. *J Cell Biol.* 166:645-51.
- Ainger, K., D. Avossa, A.S. Diana, C. Barry, E. Barbarese, and J.H. Carson. 1997. Transport and localization elements in myelin basic protein mRNA. *J Cell Biol.* 138:1077-87.
- Alberts, P., and T. Galli. 2003. The cell outgrowth secretory endosome (COSE): a specialized compartment involved in neuronal morphogenesis. *Biol Cell.* 95:419-24.
- Arantes, R.M., and N.W. Andrews. 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 S.S. Scherer. 2000. On the molecular architecture of myelinated fibers. *Histochem Cell Biol.* 113:1-18.
- Barbarese, E., C. Brumwell, S. Kwon, H. Cui, and J.H. Carson. 1999. RNA on the road to myelin. *J Neurocytol.* 28:263-70.
- Barman, S., and D.P. Nayak. 2000. Analysis of the transmembrane domain of influenza virus neuraminidase, a type II transmembrane glycoprotein, for apical sorting and raft association. *J Virol.* 74:6538-45.
- Barres, B.A., and M.C. Raff. 1999. Axonal control of oligodendrocyte development. *J Cell Biol.* 147:1123-8.
- Baumann, N., and D. Pham-Dinh. 2001. Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiol Rev.* 81:871-927.
- Benting, J.H., A.G. Rietveld, and K. Simons. 1999. N-Glycans mediate the apical sorting of a GPI-anchored, raft-associated protein in Madin-Darby canine kidney cells. *J Cell Biol.* 146:313-20.
- Bo, L., R.H. Quarles, N. Fujita, Z. Bartoszewicz, S. Sato, and B.D. Trapp. 1995. Endocytic depletion of L-MAG from CNS myelin in quaking mice. *J Cell Biol.* 131:1811-20.
- Boes, M., J. Cerny, R. Massol, M. Op den Brouw, T. Kirchhausen, J. Chen, and H.L. Ploegh. 2002. T-cell engagement of dendritic cells rapidly rearranges MHC class II transport. *Nature.* 418:983-8.
- Bosio, A., E. Binczek, and W. Stoffel. 1996. Functional breakdown of the lipid bilayer of the myelin membrane in central and peripheral nervous system by disrupted galactocerebroside synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:13280-5.
- Boucrot, E., and T. Kirchhausen. 2007. Endosomal recycling controls plasma membrane area during mitosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104:7939-44.
- Braun, P.E., J. Lee, and M. Gravel. 2004. 2',3'-Cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase: structure, biology, and function. In *Myelin Biology and Disorders*. Vol. 1. R.A. Lazzarini, editor. Elsevier Academic Press, San Diego.499–522.
- Bretscher, M.S., and C. Aguado-Velasco. 1998. Membrane traffic during cell locomotion. *Curr Opin Cell Biol.* 10:537-41.
- Brown, D.A., and E. London. 1998. Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 14:111-36.
- Brunner, C., H. Lassmann, T.V. Waehneltd, J.M. Matthieu, and C. Linington. 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.

7. Referenzen

- Charles, P., M.P. Hernandez, B. Stankoff, M.S. Aigrot, C. Colin, G. Rougon, B. Zalc, and C. Lubetzki. 2000. Negative regulation of central nervous system myelination by polysialylated-neural cell adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:7585-90.
- Chavez, R.A., S.G. Miller, and H.P. Moore. 1996. A biosynthetic regulated secretory pathway in constitutive secretory cells. *J Cell Biol.* 133:1177-91.
- Chow, A., D. Toomre, W. Garrett, and I. Mellman. 2002. Dendritic cell maturation triggers retrograde MHC class II transport from lysosomes to the plasma membrane. *Nature.* 418:988-94.
- Coetzee, T., N. Fujita, J. Dupree, R. Shi, A. Blight, K. Suzuki, K. Suzuki, and B. Popko. 1996. Myelination in the absence of galactocerebroside and sulfatide: normal structure with abnormal function and regional instability. *Cell.* 86:209-19.
- Coman, I., G. Barbin, P. Charles, B. Zalc, and C. Lubetzki. 2005. Axonal signals in central nervous system myelination, demyelination and remyelination. *J Neurol Sci.* 233:67-71.
- Coorsen, J.R., H. Schmitt, and W. Almers. 1996. Ca²⁺ triggers massive exocytosis in Chinese hamster ovary cells. *Embo J.* 15:3787-91.
- Dashiell, S.M., S.L. Tanner, H.C. Pant, and R.H. Quarles. 2002. Myelin-associated glycoprotein modulates expression and phosphorylation of neuronal cytoskeletal elements and their associated kinases. *J Neurochem.* 81:1263-72.
- Delamarre, L., M. Pack, H. Chang, I. Mellman, and E.S. Trombetta. 2005. Differential lysosomal proteolysis in antigen-presenting cells determines antigen fate. *Science.* 307:1630-4.
- Delarasse, C., P. Daubas, L.T. Mars, C. Vizler, T. Litzenburger, A. Iglesias, J. Bauer, B. Della Gaspera, A. Schubart, L. Decker, D. Dimitri, G. Roussel, A. Dierich, S. Amor, A. Dautigny, R. Liblau, and D. Pham-Dinh. 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.
- Dell'Angelica, E.C., C. Mullins, S. Caplan, and J.S. Bonifacino. 2000. Lysosome-related organelles. *Faseb J.* 14:1265-78.
- Demerens, C., B. Stankoff, M. Logak, P. Anglade, B. Allinquant, F. Couraud, B. Zalc, and C. Lubetzki. 1996. Induction of myelination in the central nervous system by electrical activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:9887-92.
- Denzer, K., M.J. Kleijmeer, H.F. Heijnen, W. Stoorvogel, and H.J. Geuze. 2000. Exosome: from internal vesicle of the multivesicular body to intercellular signaling device. *J Cell Sci.* 113 Pt 19:3365-74.
- Domeniconi, M., Z. Cao, T. Spencer, R. Sivasankaran, K. Wang, E. Nikulina, N. Kimura, H. Cai, K. Deng, Y. Gao, Z. He, and M. Filbin. 2002. Myelin-associated glycoprotein interacts with the Nogo66 receptor to inhibit neurite outgrowth. *Neuron.* 35:283-90.
- Dubois-Dalcq, M., T. Behar, L. Hudson, and R.A. Lazzarini. 1986. Emergence of three myelin proteins in oligodendrocytes cultured without neurons. *J Cell Biol.* 102:384-92.
- Dudu, V., P. Pantazis, and M. Gonzalez-Gaitan. 2004. Membrane traffic during embryonic development: epithelial formation, cell fate decisions and differentiation. *Curr Opin Cell Biol.* 16:407-14.
- Duncan, I.D. 2005. The PLP mutants from mouse to man. *J Neurol Sci.* 228:204-5.
- Edgar, J.M., and J. Garbern. 2004. The myelinated axon is dependent on the myelinating cell for support and maintenance: molecules involved. *J Neurosci Res.* 76:593-8.

7. Referenzen

- Ehrlich, M., W. Boll, A. Van Oijen, R. Hariharan, K. Chandran, M.L. Nibert, and T. Kirchhausen. 2004. Endocytosis by random initiation and stabilization of clathrin-coated pits. *Cell*. 118:591-605.
- Erb, M., B. Flueck, F. Kern, B. Erne, A.J. Steck, and N. Schaeren-Wiemers. 2006. Unraveling the differential expression of the two isoforms of myelin-associated glycoprotein in a mouse expressing GFP-tagged S-MAG specifically regulated and targeted into the different myelin compartments. *Mol Cell Neurosci*. 31:613-27.
- Erb, M., A.J. Steck, K.A. Nave, and N. Schaeren-Wiemers. 2003. Differential expression of L- and S-MAG upon cAMP stimulated differentiation in oligodendroglial cells. *J Neurosci Res*. 71:326-37.
- Evans, P.R., and D.J. Owen. 2002. Endocytosis and vesicle trafficking. *Curr Opin Struct Biol*. 12:814-21.
- Farina, K.L., and R.H. Singer. 2002. The nuclear connection in RNA transport and localization. *Trends Cell Biol*. 12:466-72.
- Fevrier, B., and G. Raposo. 2004. Exosomes: endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages. *Curr Opin Cell Biol*. 16:415-21.
- Fitzner, D., A. Schneider, A. Kippert, W. Mobius, K.I. Willig, S.W. Hell, G. Bunt, K. Gaus, and M. Simons. 2006. Myelin basic protein-dependent plasma membrane reorganization in the formation of myelin. *Embo J*. 25:5037-48.
- Folsch, H., H. Ohno, J.S. Bonifacino, and I. Mellman. 1999. A novel clathrin adaptor complex mediates basolateral targeting in polarized epithelial cells. *Cell*. 99:189-98.
- Ford, M.G., B.M. Pearce, M.K. Higgins, Y. Vallis, D.J. Owen, A. Gibson, C.R. Hopkins, P.R. Evans, and H.T. McMahon. 2001. Simultaneous binding of PtdIns(4,5)P₂ and clathrin by AP180 in the nucleation of clathrin lattices on membranes. *Science*. 291:1051-5.
- 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., D.A. Yool, G.J. Moore, I.B. Wilds, M.W. Faulk, M. Klugmann, K.A. Nave, E.A. Siermans, M.S. van der Knaap, T.D. Bird, M.E. Shy, J.A. Kamholz, and I.R. Griffiths. 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.
- Gardinier, M.V., P. Amiguet, C. Linington, and J.M. Matthieu. 1992. Myelin/oligodendrocyte glycoprotein is a unique member of the immunoglobulin superfamily. *J Neurosci Res*. 33:177-87.
- Gencic, S., and L.D. Hudson. 1990. Conservative amino acid substitution in the myelin proteolipid protein of jimpysd mice. *J Neurosci*. 10:117-24.
- Genoud, S., C. Lappe-Siefke, S. Goebbels, F. Radtke, M. Aguet, S.S. Scherer, U. Suter, K.A. Nave, and N. Mantei. 2002. Notch1 control of oligodendrocyte differentiation in the spinal cord. *J Cell Biol*. 158:709-18.
- Gow, A., V.L. Friedrich, Jr., and R.A. Lazzarini. 1994. Many naturally occurring mutations of myelin proteolipid protein impair its intracellular transport. *J Neurosci Res*. 37:574-83.
- Gow, A., and R.A. Lazzarini. 1996. A cellular mechanism governing the severity of Pelizaeus-Merzbacher disease. *Nat Genet*. 13:422-8.
- Gow, A., C.M. Southwood, and R.A. Lazzarini. 1998. Disrupted proteolipid protein trafficking results in oligodendrocyte apoptosis in an animal model of Pelizaeus-Merzbacher disease. *J Cell Biol*. 140:925-34.

7. Referenzen

- Gow, A., C.M. Southwood, J.S. Li, M. Pariali, G.P. Riordan, S.E. Brodie, J. Danias, J.M. Bronstein, B. Kachar, and R.A. Lazzarini. 1999. CNS myelin and sertoli cell tight junction strands are absent in Osp/claudin-11 null mice. *Cell*. 99:649-59.
- Greco, V., M. Hannus, and S. Eaton. 2001. Argosomes: a potential vehicle for the spread of morphogens through epithelia. *Cell*. 106:633-45.
- Griffiths, G. 2002. What's special about secretory lysosomes? *Semin Cell Dev Biol*. 13:279-84.
- Griffiths, I., M. Klugmann, T. Anderson, C. Thomson, D. Vouyiouklis, and K.A. Nave. 1998a. Current concepts of PLP and its role in the nervous system. *Microsc Res Tech*. 41:344-58.
- Griffiths, I., M. Klugmann, T. Anderson, D. Yool, C. Thomson, M.H. Schwab, A. Schneider, F. Zimmermann, M. McCulloch, N. Nadon, and K.A. Nave. 1998b. Axonal swellings and degeneration in mice lacking the major proteolipid of myelin. *Science*. 280:1610-3.
- Gruenberg, J. 2001. The endocytic pathway: a mosaic of domains. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2:721-30.
- Hu, Q.D., B.T. Ang, M. Karsak, W.P. Hu, X.Y. Cui, T. Duka, Y. Takeda, W. Chia, N. Sankar, Y.K. Ng, E.A. Ling, T. Maciag, D. Small, R. Trifonova, R. Kopan, H. Okano, M. Nakafuku, S. Chiba, H. Hirai, J.C. Aster, M. Schachner, C.J. Pallen, K. Watanabe, and Z.C. Xiao. 2003. F3/contactin acts as a functional ligand for Notch during oligodendrocyte maturation. *Cell*. 115:163-75.
- Ikonen, E. 2001. Roles of lipid rafts in membrane transport. *Curr Opin Cell Biol*. 13:470-7.
- Ikonen, E., and K. Simons. 1998. Protein and lipid sorting from the trans-Golgi network to the plasma membrane in polarized cells. *Semin Cell Dev Biol*. 9:503-9.
- Ishibashi, T., K.A. Dakin, B. Stevens, P.R. Lee, S.V. Kozlov, C.L. Stewart, and R.D. Fields. 2006. Astrocytes promote myelination in response to electrical impulses. *Neuron*. 49:823-32.
- Jaiswal, J.K., N.W. Andrews, and S.M. Simon. 2002. Membrane proximal lysosomes are the major vesicles responsible for calcium-dependent exocytosis in nonsecretory cells. *J Cell Biol*. 159:625-35.
- Johns, T.G., and C.C. Bernard. 1999. The structure and function of myelin oligodendrocyte glycoprotein. *J Neurochem*. 72:1-9.
- Johnson, P.W., W. Abramow-Newerly, B. Seilheimer, R. Sadoul, M.B. Tropak, M. Arquint, R.J. Dunn, M. Schachner, and J.C. Roder. 1989. Recombinant myelin-associated glycoprotein confers neural adhesion and neurite outgrowth function. *Neuron*. 3:377-85.
- Jung, M., E. Krämer, M. Grzenkowski, K. Tang, W. Blakemore, A. Aguzzi, K. Khazaie, K. Chlichlia, G. von Blankenfeld, H. Kettenmann, and et al. 1995. Lines of murine oligodendroglial precursor cells immortalized by an activated neu tyrosine kinase show distinct degrees of interaction with axons in vitro and in vivo. *Eur J Neurosci*. 7:1245-65.
- Kagawa, T., K. Ikenaka, Y. Inoue, S. Kuriyama, T. Tsujii, J. Nakao, K. Nakajima, J. Aruga, H. Okano, and K. Mikoshiba. 1994. Glial cell degeneration and hypomyelination caused by overexpression of myelin proteolipid protein gene. *Neuron*. 13:427-42.
- Keller, S., M.P. Sanderson, A. Stoeck, and P. Altevogt. 2006. Exosomes: From biogenesis and secretion to biological function. *Immunol Lett*.
- Kim, T., and S.E. Pfeiffer. 1999. Myelin glycosphingolipid/cholesterol-enriched microdomains selectively sequester the non-compact myelin proteins CNP and MOG. *J Neurocytol*. 28:281-93.

7. Referenzen

- Kippert, A., K. Trajkovic, L. Rajendran, J. Ries, and M. Simons. 2007. Rho regulates membrane transport in the endocytic pathway to control plasma membrane specialization in oligodendroglial cells. *J Neurosci.* 27:3560-70.
- Kirkham, M., and R.G. Parton. 2005. Clathrin-independent endocytosis: new insights into caveolae and non-caveolar lipid raft carriers. *Biochim Biophys Acta.* 1746:349-63.
- Kleijmeer, M., G. Ramm, D. Schuurhuis, J. Griffith, M. Rescigno, P. Ricciardi-Castagnoli, A.Y. Rudensky, F. Ossendorp, C.J. Melief, W. Stoorvogel, and H.J. Geuze. 2001. Reorganization of multivesicular bodies regulates MHC class II antigen presentation by dendritic cells. *J Cell Biol.* 155:53-63.
- Klein, C., E.M. Krämer, A.M. Cardine, B. Schraven, R. Brandt, and J. Trotter. 2002. Process outgrowth of oligodendrocytes is promoted by interaction of fyn kinase with the cytoskeletal protein tau. *J Neurosci.* 22:698-707.
- Krämer-Albers, E.M., K. Gehrig-Burger, C. Thiele, J. Trotter, and K.A. Nave. 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.
- Krämer, E.M., T. Koch, A. Niehaus, and J. Trotter. 1997. Oligodendrocytes direct glycosyl phosphatidylinositol-anchored proteins to the myelin sheath in glycosphingolipid-rich complexes. *J Biol Chem.* 272:8937-45.
- Krämer, E.M., A. Schardt, and K.A. Nave. 2001. Membrane traffic in myelinating oligodendrocytes. *Microsc Res Tech.* 52:656-71.
- Kroepfl, J.F., and M.V. Gardinier. 2001a. Identification of a basolateral membrane targeting signal within the cytoplasmic domain of myelin/oligodendrocyte glycoprotein. *J Neurochem.* 77:1301-9.
- Kroepfl, J.F., and M.V. Gardinier. 2001b. Mutually exclusive apicobasolateral sorting of two oligodendroglial membrane proteins, proteolipid protein and myelin/oligodendrocyte glycoprotein, in Madin-Darby canine kidney cells. *J Neurosci Res.* 66:1140-8.
- Larocca, J.N., and A.G. Rodriguez-Gabin. 2002. Myelin biogenesis: vesicle transport in oligodendrocytes. *Neurochem Res.* 27:1313-29.
- Le Blanc, I., P.P. Luyet, V. Pons, C. Ferguson, N. Emans, A. Petiot, N. Mayran, N. Demareux, J. Faure, R. Sadoul, R.G. Parton, and J. Gruenberg. 2005. Endosome-to-cytosol transport of viral nucleocapsids. *Nat Cell Biol.* 7:653-64.
- Lebar, R., C. Vincent, and E. Fischer-le Boubennec. 1979. Studies on autoimmune encephalomyelitis in the guinea pig--III. A comparative study of two autoantigens of central nervous system myelin. *J Neurochem.* 32:1451-60.
- Lecuit, T., and F. Pilot. 2003. Developmental control of cell morphogenesis: a focus on membrane growth. *Nat Cell Biol.* 5:103-8.
- Lecuit, T., and E. Wieschaus. 2000. Polarized insertion of new membrane from a cytoplasmic reservoir during cleavage of the Drosophila embryo. *J Cell Biol.* 150:849-60.
- Lee, J., M. Gravel, R. Zhang, P. Thibault, and P.E. Braun. 2005. Process outgrowth in oligodendrocytes is mediated by CNP, a novel microtubule assembly myelin protein. *J Cell Biol.* 170:661-73.
- Lees, M.B., and Brostoff, S.W. (1984). Proteins of Myelin. In "Myelin" (P. Morell, ed), pp. 197-224. Plenum Press, New York.
- Lisanti, M.P., E. Rodriguez-Boulan, and A.R. Saltiel. 1990. Emerging functional roles for the glycosyl-phosphatidylinositol membrane protein anchor. *J Membr Biol.* 117:1-10.

7. Referenzen

- Liu, B.P., A. Fournier, T. GrandPre, and S.M. Strittmatter. 2002. Myelin-associated glycoprotein as a functional ligand for the Nogo-66 receptor. *Science*. 297:1190-3.
- Low, S.H., M. Miura, P.A. Roche, A.C. Valdez, K.E. Mostov, and T. Weimbs. 2000. Intracellular redirection of plasma membrane trafficking after loss of epithelial cell polarity. *Mol Biol Cell*. 11:3045-60.
- Lubetzki, C., C. Demerens, P. Anglade, H. Villarroya, A. Frankfurter, V.M. Lee, and B. Zalc. 1993. Even in culture, oligodendrocytes myelinate solely axons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90:6820-4.
- Macklin, W.B., M.V. Gardinier, K.D. King, and K. Kampf. 1987. An AG---GG transition at a splice site in the myelin proteolipid protein gene in jimpy mice results in the removal of an exon. *FEBS Lett*. 223:417-21.
- Maldonado-Baez, L., and B. Wendland. 2006. Endocytic adaptors: recruiters, coordinators and regulators. *Trends Cell Biol*. 16:505-13.
- Marta, C.B., M.B. Montano, C.M. Taylor, A.L. Taylor, R. Bansal, and S.E. Pfeiffer. 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., C.M. Taylor, S. Cheng, R.H. Quarles, R. Bansal, and S.E. Pfeiffer. 2004. Myelin associated glycoprotein cross-linking triggers its partitioning into lipid rafts, specific signaling events and cytoskeletal rearrangements in oligodendrocytes. *Neuron Glia Biol*. 1:35-46.
- Marta, C.B., C.M. Taylor, T. Coetzee, T. Kim, S. Winkler, R. Bansal, and S.E. Pfeiffer. 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.
- Martin, T.F., and R.N. Grishanin. 2003. PC12 cells as a model for studies of regulated secretion in neuronal and endocrine cells. *Methods Cell Biol*. 71:267-86.
- Matsuda, Y., A. Okitsu, S. Sato, H. Koito, and H. Yamamoto. 1996. Soluble myelin-associated glycoprotein-immunoglobulin G1 chimera protein promotes neurite outgrowth from mouse cerebellar neurons. *Neurosci Lett*. 205:87-90.
- Matter, K., and I. Mellman. 1994. Mechanisms of cell polarity: sorting and transport in epithelial cells. *Curr Opin Cell Biol*. 6:545-54.
- Matthieu, J.M., R.H. Quarles, R.O. Brady, and F. Webster Hde. 1973. Variation of proteins, enzyme markers and gangliosides in myelin subfractions. *Biochim Biophys Acta*. 329:305-17.
- Maxfield, F.R., and T.E. McGraw. 2004. Endocytic recycling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 5:121-32.
- McLaughlin, M., J.A. Barrie, S. Karim, P. Montague, J.M. Edgar, D. Kirkham, C.E. Thomson, and I.R. Griffiths. 2006. Processing of PLP in a model of Pelizaeus-Merzbacher disease/SPG2 due to the rumpshaker mutation. *Glia*. 53:715-22.
- Mellman, I., and R.M. Steinman. 2001. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell*. 106:255-8.
- Mellman, I., and G. Warren. 2000. The road taken: past and future foundations of membrane traffic. *Cell*. 100:99-112.
- Merrifield, C.J., M.E. Feldman, L. Wan, and W. Almers. 2002. Imaging actin and dynamin recruitment during invagination of single clathrin-coated pits. *Nat Cell Biol*. 4:691-8.
- Mi, S., R.H. Miller, X. Lee, M.L. Scott, S. Shulag-Morskaya, Z. Shao, J. Chang, G. Thill, M. Levesque, M. Zhang, C. Hession, D. Sah, B. Trapp, Z. He, V. Jung, J.M. McCoy, and R.B. Pepinsky. 2005. LINGO-1 negatively regulates myelination by oligodendrocytes. *Nat Neurosci*. 8:745-51.

7. Referenzen

- Michailov, G.V., M.W. Sereda, B.G. Brinkmann, T.M. Fischer, B. Haug, C. Birchmeier, L. Role, C. Lai, M.H. Schwab, and K.A. Nave. 2004. Axonal neuregulin-1 regulates myelin sheath thickness. *Science*. 304:700-3.
- Miller, R.H. 2002. Regulation of oligodendrocyte development in the vertebrate CNS. *Prog Neurobiol*. 67:451-67.
- Minuk, J., and P.E. Braun. 1996. Differential intracellular sorting of the myelin-associated glycoprotein isoforms. *J Neurosci Res*. 44:411-20.
- Morell P., Quarles, R. H., and Norton, W. T. (1994). Molecular, Cellular, and Medical Aspects. In "Basic Neurochemistry" (Siegel, G. J., et al.), pp. 117-143. Raven Press, New York.
- Morell P., and Quarles, R. H. (1999). Myelin Formation, Structure and Biochemistry. In "Basic Neurochemistry" (Siegel, G. J., et al.), pp. 69-93. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia.
- Morita, K., H. Sasaki, K. Fujimoto, M. Furuse, and S. Tsukita. 1999. Claudin-11/OSP-based tight junctions of myelin sheaths in brain and Sertoli cells in testis. *J Cell Biol*. 145:579-88.
- Mostov, K., G. Apodaca, B. Aroeti, and C. Okamoto. 1992. Plasma membrane protein sorting in polarized epithelial cells. *J Cell Biol*. 116:577-83.
- Mostov, K., T. Su, and M. ter Beest. 2003. Polarized epithelial membrane traffic: conservation and plasticity. *Nat Cell Biol*. 5:287-93.
- Mostov, K.E., M. Verges, and Y. Altschuler. 2000. Membrane traffic in polarized epithelial cells. *Curr Opin Cell Biol*. 12:483-90.
- Nave, K.A., F.E. Bloom, and R.J. Milner. 1987. A single nucleotide difference in the gene for myelin proteolipid protein defines the jimpy mutation in mouse. *J Neurochem*. 49:1873-7.
- Norton, W.T., and S.E. Poduslo. 1973. Myelination in rat brain: method of myelin isolation. *J Neurochem*. 21:749-57.
- Norton, W. T., and Cammer, W. (1984). Isolation and Characterization of Myelin. In "Myelin" (Morell, P.), pp 147-195. Plenum Press, New York.
- Osterhout, D.J., A. Wolven, R.M. Wolf, M.D. Resh, and M.V. Chao. 1999. Morphological differentiation of oligodendrocytes requires activation of Fyn tyrosine kinase. *J Cell Biol*. 145:1209-18.
- Pelkmans, L. 2005. Secrets of caveolae- and lipid raft-mediated endocytosis revealed by mammalian viruses. *Biochim Biophys Acta*. 1746:295-304.
- Perret, E., A. Lakkaraju, S. Deborde, R. Schreiner, and E. Rodriguez-Boulan. 2005. Evolving endosomes: how many varieties and why? *Curr Opin Cell Biol*. 17:423-34.
- Pfeiffer, S.E., A.E. Warrington, and R. Bansal. 1993. The oligodendrocyte and its many cellular processes. *Trends Cell Biol*. 3:191-7.
- Pierre, P., S.J. Turley, E. Gatti, M. Hull, J. Meltzer, A. Mirza, K. Inaba, R.M. Steinman, and I. Mellman. 1997. Developmental regulation of MHC class II transport in mouse dendritic cells. *Nature*. 388:787-92.
- Poliak, S., and E. Peles. 2003. The local differentiation of myelinated axons at nodes of Ranvier. *Nat Rev Neurosci*. 4:968-80.
- Polo, S., and P.P. Di Fiore. 2006. Endocytosis conducts the cell signaling orchestra. *Cell*. 124:897-900.
- Privat, A., C. Jacque, J.M. Bourre, P. Dupouey, and N. Baumann. 1979. Absence of the major dense line in myelin of the mutant mouse "shiverer". *Neurosci Lett*. 12:107-12.
- Quarles, R.H. 2007. Myelin-associated glycoprotein (MAG): past, present and beyond. *J Neurochem*. 100:1431-48.

7. Referenzen

- Rappoport, J.Z., S.M. Simon, and A. Benmerah. 2004. Understanding living clathrin-coated pits. *Traffic*. 5:327-37.
- Readhead, C., B. Popko, N. Takahashi, H.D. Shine, R.A. Saavedra, R.L. Sidman, and L. Hood. 1987. Expression of a myelin basic protein gene in transgenic shiverer mice: correction of the dysmyelinating phenotype. *Cell*. 48:703-12.
- Readhead, C., A. Schneider, I. Griffiths, and K.A. Nave. 1994. Premature arrest of myelin formation in transgenic mice with increased proteolipid protein gene dosage. *Neuron*. 12:583-95.
- Reddy, A., E.V. Caler, and N.W. Andrews. 2001. Plasma membrane repair is mediated by Ca(2+)-regulated exocytosis of lysosomes. *Cell*. 106:157-69.
- Rios, J.C., C.V. Melendez-Vasquez, S. Einheber, M. Lustig, M. Grumet, J. Hemperly, E. Peles, and J.L. Salzer. 2000. Contactin-associated protein (Caspr) and contactin form a complex that is targeted to the paranodal junctions during myelination. *J Neurosci*. 20:8354-64.
- Rodriguez-Boulán, E., and A. Gonzalez. 1999. Glycans in post-Golgi apical targeting: sorting signals or structural props? *Trends Cell Biol*. 9:291-4.
- Salzer, J.L. 2003. Polarized domains of myelinated axons. *Neuron*. 40:297-318.
- Savage, M.D., Mattson, G., Desai, S., Nielander, G.W., Morgensen, S., & Conklin, E.J. (1992) Avidin-Biotin Chemistry: A handbook. Pierce Chemical Company.
- Scherer, S.S., P.E. Braun, J. Grinspan, E. Collarini, D.Y. Wang, and J. Kamholz. 1994. Differential regulation of the 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase gene during oligodendrocyte development. *Neuron*. 12:1363-75.
- Schneider, A., H. Lander, G. Schulz, H. Wolburg, K.A. Nave, J.B. Schulz, and M. Simons. 2005. Palmitoylation is a sorting determinant for transport to the myelin membrane. *J Cell Sci*. 118:2415-23.
- Shaw, C.E., R. Milner, A.S. Compston, and C. ffrench-Constant. 1996. Analysis of integrin expression on oligodendrocytes during axo-glial interaction by using rat-mouse xenocultures. *J Neurosci*. 16:1163-72.
- Sherman, D.L., and P.J. Brophy. 2005. Mechanisms of axon ensheathment and myelin growth. *Nat Rev Neurosci*. 6:683-90.
- Shimizu-Okabe, C., Y. Matsuda, H. Koito, and S. Yoshida. 2001. L-isoform but not S-isoform of myelin associated glycoprotein promotes neurite outgrowth of mouse cerebellar neurons. *Neurosci Lett*. 311:203-5.
- Simons, K., and E. Ikonen. 1997. Functional rafts in cell membranes. *Nature*. 387:569-72.
- Simons, K., and D. Toomre. 2000. Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 1:31-9.
- Simons, M., E.M. Krämer, P. Macchi, S. Rathke-Hartlieb, J. Trotter, K.A. Nave, and J.B. Schulz. 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., E.M. Krämer, C. Thiele, W. Stoffel, and J. Trotter. 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 K. Trajkovic. 2006. Neuron-glia communication in the control of oligodendrocyte function and myelin biogenesis. *J Cell Sci*. 119:4381-9.
- Southwood, C.M., J. Garbern, W. Jiang, and A. Gow. 2002. The unfolded protein response modulates disease severity in Pelizaeus-Merzbacher disease. *Neuron*. 36:585-96.

7. Referenzen

- Sperber, B.R., E.A. Boyle-Walsh, M.J. Engleka, P. Gadue, A.C. Peterson, P.L. Stein, S.S. Scherer, and F.A. McMorris. 2001. A unique role for Fyn in CNS myelination. *J Neurosci.* 21:2039-47.
- Stan, R.V. 2005. Structure of caveolae. *Biochim Biophys Acta.* 1746:334-48.
- Sternberger, N.H., R.H. Quarles, Y. Itoyama, and H.D. Webster. 1979. Myelin-associated glycoprotein demonstrated immunocytochemically in myelin and myelin-forming cells of developing rat. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 76:1510-4.
- Stevens, B., S. Porta, L.L. Haak, V. Gallo, and R.D. Fields. 2002. Adenosine: a neuron-glial transmitter promoting myelination in the CNS in response to action potentials. *Neuron.* 36:855-68.
- Stinchcombe, J., G. Bossi, and G.M. Griffiths. 2004. Linking albinism and immunity: the secrets of secretory lysosomes. *Science.* 305:55-9.
- Stinchcombe, J.C., and G.M. Griffiths. 1999. Regulated secretion from hemopoietic cells. *J Cell Biol.* 147:1-6.
- Svenningsen, A.F., W.S. Shan, D.R. Colman, and L. Pedraza. 2003. Rapid method for culturing embryonic neuron-glial cell cocultures. *J Neurosci Res.* 72:565-73.
- Tait, S., F. Gunn-Moore, J.M. Collinson, J. Huang, C. Lubetzki, L. Pedraza, D.L. Sherman, D.R. Colman, and P.J. Brophy. 2000. An oligodendrocyte cell adhesion molecule at the site of assembly of the paranodal axo-glial junction. *J Cell Biol.* 150:657-66.
- Taylor, C.M., T. Coetzee, and S.E. Pfeiffer. 2002. Detergent-insoluble glycosphingolipid/cholesterol microdomains of the myelin membrane. *J Neurochem.* 81:993-1004.
- Taylor et al., (2004). The Transport, Assembly, and Function of Myelin Lipids. In "Myelin" (Lazzarini, R.), pp. 57-88. Elsevier Academic Press, San Diego.
- Thery, C., L. Zitvogel, and S. Amigorena. 2002. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol.* 2:569-79.
- Trajkovic, K., A.S. Dhaunchak, J.T. Goncalves, D. Wenzel, A. Schneider, G. Bunt, K.A. Nave, and M. Simons. 2006. Neuron to glia signaling triggers myelin membrane exocytosis from endosomal storage sites. *J Cell Biol.* 172:937-48.
- Trapp, B.D., S.B. Andrews, C. Cootauco, and R. Quarles. 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., L. Bernier, S.B. Andrews, and D.R. Colman. 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.
- Trapp, B., and Kidd, G. (2004). Structure of the Myelinated Axon. In "Myelin" (Lazzarini, R.), pp. 3-27. Elsevier Academic Press, San Diego.
- Trombetta, E.S., M. Ebersold, W. Garrett, M. Pypaert, and I. Mellman. 2003. Activation of lysosomal function during dendritic cell maturation. *Science.* 299:1400-3.
- Truschel, S.T., E. Wang, W.G. Ruiz, S.M. Leung, R. Rojas, J. Lavelle, M. Zeidel, D. Stoffer, and G. Apodaca. 2002. Stretch-regulated exocytosis/endocytosis in bladder umbrella cells. *Mol Biol Cell.* 13:830-46.
- Turnley, A.M., and P.F. Bartlett. 1998. MAG and MOG enhance neurite outgrowth of embryonic mouse spinal cord neurons. *Neuroreport.* 9:1987-90.
- Umemori, H., S. Sato, T. Yagi, S. Aizawa, and T. Yamamoto. 1994. Initial events of myelination involve Fyn tyrosine kinase signalling. *Nature.* 367:572-6.

7. Referenzen

- Valadi, H., K. Ekstrom, A. Bossios, M. Sjostrand, J.J. Lee, and J.O. Lotvall. 2007. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol.*
- van Meer, G. 1989. Lipid traffic in animal cells. *Annu Rev Cell Biol.* 5:247-75.
- van Niel, G., I. Porto-Carreiro, S. Simoes, and G. Raposo. 2006. Exosomes: a common pathway for a specialized function. *J Biochem (Tokyo).* 140:13-21.
- Wang, K.C., V. Koprivica, J.A. Kim, R. Sivasankaran, Y. Guo, R.L. Neve, and Z. He. 2002. Oligodendrocyte-myelin glycoprotein is a Nogo receptor ligand that inhibits neurite outgrowth. *Nature.* 417:941-4.
- Wang, S., A.D. Sdrulla, G. diSibio, G. Bush, D. Nofziger, C. Hicks, G. Weinmaster, and B.A. Barres. 1998. Notch receptor activation inhibits oligodendrocyte differentiation. *Neuron.* 21:63-75.
- Weimbs, T., Low, S.H., Chapin, S.J., and Mostov, K.E. (1997). Apical targeting in polarized epithelial cells: There's more afloat than rafts. *Trends Cell Biol.* 7, 393-399
- Wendeler, M., Kolter, T., Sandhoff, K. (2000). Pathology of Glycosphingolipid Metabolism: The Molecular and Cellular Basis of Neurodegenerative Disease. *The Neuroscientist.* 6, 285-296.
- Wirtz, H.R., and L.G. Dobbs. 1990. Calcium mobilization and exocytosis after one mechanical stretch of lung epithelial cells. *Science.* 250:1266-9.
- Wisco, D., E.D. Anderson, M.C. Chang, C. Norden, T. Boiko, H. Folsch, and B. Winckler. 2003. Uncovering multiple axonal targeting pathways in hippocampal neurons. *J Cell Biol.* 162:1317-28.
- Yin, X., J. Peterson, M. Gravel, P.E. Braun, and B.D. Trapp. 1997. CNP overexpression induces aberrant oligodendrocyte membranes and inhibits MBP accumulation and myelin compaction. *J Neurosci Res.* 50:238-47.

8 Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

µg	M ikro g ramm
µl	M ikro l iter
µM	m ikro m olar

A

AK	A ntikörper
----	--------------------

B

BSA	b ovine s erum a lbumine (Rinderserumalbumin)
bzw.	b eziehungs w eise

C

CCP	C lathrin-coated p it
CNP	2,3' – C yclic N ucleotide 3' P hosphodiesterase
C-terminus	(COOH)-Carboxyterminus

D

DAPI	D iamidin p henylindol
dbcAMP	d ibutyl r yl cyclic a denosine m onophosphate
Dil	1,1'- d ioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate
DMEM	D ulbecco`s m odified e agle m edium
DNA	d eoxyribonucleic a cid
dNTP	D esoxyribonukletid t riphosphat
DTT	D ithiothreitol

E

E	e mbryonal
ECL	e nhanced c hemiluminescence
EE	e arly e ndosome
EDTA	E thylendiamintetraessigsäure (-acid)
EGTA	E thylenglykol-bis-(2-aminoethylethyl)- t etraessigsäure (-acid)
EM	E lektronen m ikroskopie

F

FCS	f etale c alf s erum (fötales Kälberserum)
-----	---

8. Anhang

FITC	F luorescein I sothiocyanat
G	
g	G ramm
g	Erdbeschleunigung g =9,81 N
GFP	G reen F luorescent P rotein
H	
h	h our
HBSS	H ANKs b uffered s alt s olution
HCl	Salzsäure (H ydro c hlorid)
HEPES	4-(2- H ydroxy e thyl)- p iperazin-1- e thansulfonsäure
HRP	h orse r eddish p eroxidase (Meerrettichperoxidase)
HS	h orse s erum (Pferdeserum)
I	
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IPL	intra p eriod l ine
K	
kb	K ilobasen
kDa	K ilodalton
L	
LAMP1	Lysosome- A ssociated M embrane P rotein 1
LE/Lys	late e ndosomes/ l ysosomes
LIF	L eukemia I nhibitory F actor
LRO	lysosome-related o rganelle
LSM	laser s canning m icroscopy
M	
MDCK	M ardin D arby canine kidney
MDL	major d ense line
M	m olar
MBP	M yelin B asic P rotein
MAG	M yelin- A ssociated G lycoprotein
MDL	major d ense line
min	m inute
ml	M illiliter

8. Anhang

MLM	m yel i n l i ke m embrane
mM	m ill i molar
MOG	M yel i n O ligodendrocyte G lycoprotein
MP	M ilch p ulver
MVB	m ulti v esicular b ody
MW	m olecular w eight (Molekulargewicht)
N	
NF 155	N eurofascin 155
ng	N anogramm
NRG	N euregulin
N-Terminus	(NH2) -Aminotermi n us
O	
OSP	O ligodendrocyte- S pecific P rotein
P	
P	p ostnatal
PAGE	P olyacrylamid g ele e lektrophorese
PBS	p hosphate- b uffered s aline
PCR	P olymerase chain reaction
PFA	P araformaldehyd
pH	p otentia H ydrogenii
PLL	p oly- L Lysin
PLP	P roteolipid P rotein
PMD	P elizaeus M erzbacher D isease
PNS	p ost n uclear supernatant
PNS	p eripheres N ervensystem
pOI	p rimäre O ligodendrozyten
PVDF	Polyvenylidendifluoridmembranen
R	
RE	R ecycling- E ndosom
RT	R aum t emperatur
S	
SDS	s odium d odecyl s ulfate
sec	s econd

8. Anhang

SEM	standard error of the mean
SE	sorting endosome
spez.	spezifisch
Syn	Syntaxin

T

Taq	T hermophilus a quaticus
TBE	T ris/ B orat/ E DTA
TBS	T ris- b uffered s aline
TEMED	N,N,N',N'- T etramethylethylendi a min
Tfr	T ransferrin
TfR	T ransferrin- R ezeptor
TGN	t rans- G olgi N etzwerk
Tris	T ris(hydroxymethyl)-aminomethan

U

U	u nit
U	U mdrehungen
u.	und
u. a.	u nter a nderem
UV	u ltraviolett
w/v	w eight per v olume (Gewicht pro Volumen)

Z

ZNS	z entrales N ervensystem
-----	--

8.2 Abbildungsverzeichnis

<i>Abb. 2.1: Schematische Darstellung eines myelinisierenden Oligodendrozyten.</i>	4
<i>Abb. 2.2: Ultrastruktur des Myelins und schematische Darstellung ausgewählter Myelinproteine und ihrer Membrantopologie.</i>	6
<i>Abb. 2.3: Schematische Darstellung des endosomalen Systems.</i>	15
<i>Abb. 3.1: Reaktionsschema von EZ-Link®Sulfo-NHS-SS-LC-Biotin mit primären Aminogruppen.</i>	35
<i>Abb. 3.2: Schematische Darstellung der Antikörper-Endozytose.</i>	37
<i>Abb. 4.1: Doppelimmunfluoreszenz von pOl mit Antikörpern gegen die Myelinproteine PLP, MAG und MOG.</i>	48
<i>Abb. 4.2: Subfraktionierung von Myelin und oligodendroglialen Zellmembranen.</i>	50
<i>Abb. 4.3: Kolokalisierung von PLP mit LAMP1 in LE/Lys und an der Zelloberfläche.</i>	52
<i>Abb. 4.4: Kolokalisierung von PLP und LAMP1 in wachsenden Membranfortsätzen.</i>	54
<i>Abb. 4.5: Lebendzellmikroskopie von PLP-EGFP nach dbcAMP-Behandlung von Oli-neu Zellen.</i>	55
<i>Abb. 4.6: Zelloberflächenfärbung von LAMP1 nach dbcAMP-Behandlung von Oli-neu Zellen.</i>	56
<i>Abb. 4.7: Elektronenmikroskopische Analysen von Ionomycin-behandelten pOl.</i>	59
<i>Abb. 4.8: Immunzytochemische Analysen von PLP, MAG und MOG nach Ionomycin-Behandlung.</i>	61
<i>Abb. 4.9: Zelloberflächenfärbung von PLP und LAMP1 nach Ionomycin-Behandlung von pOl.</i>	63
<i>Abb. 4.10: Präparation von MLMs nach Ionomycin-Behandlung.</i>	65
<i>Abb. 4.11: Präparation von Exosomen aus dem Kulturüberstand von pOl.</i>	66
<i>Abb. 4.12: Triplefärbungen von primären Oligodendrozyten mit PLP, MAG oder MOG, dem LE/Lys Marker LAMP1 und dem RE Marker Tfr.</i>	68
<i>Abb. 4.13: Endozytose von zelloberflächenbiotinylierten Myelinproteinen.</i>	70
<i>Abb. 4.14: Endozytose von zelloberflächenbiotinyliertem PLP, MAG und MOG in pOl.</i>	72
<i>Abb. 4.15: Antikörper-Endozytose von Myelinproteinen.</i>	74
<i>Abb. 4.16: Antikörper-Endozytose ohne Sekundärantikörper-induzierte Quervernetzung der Proteine an der Zelloberfläche.</i>	75
<i>Abb. 4.17: Kolokalisierung endozytierter Myelinproteine mit endosomalen Markern.</i>	77
<i>Abb. 4.18: Ko-Endozytose von PLP und MAG.</i>	79
<i>Abb. 4.19: Untersuchung der Clathrin-vermittelten Endozytose.</i>	81
<i>Abb. 4.20: Untersuchung der Clathrin-unabhängigen Endozytose.</i>	82
<i>Abb. 4.21: Endozytose und Recycling von zelloberflächenbiotinylierten Proteinen.</i>	84
<i>Abb. 4.22: Recycling von zelloberflächenbiotinyliertem PLP, MAG und MOG zu definierten Plasmamembrandomänen.</i>	85
<i>Abb. 5.1: Schematische Darstellung zentraler Aussagen der Arbeit.</i>	99

8.3 Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 3.1: Verwendete Materialien, Software, Chemikalien, Enzyme und Kits</i>	<i>19</i>
<i>Tabelle 3.2: Verwendete Puffer und Nährmedien</i>	<i>21</i>
<i>Tabelle 3.3: Primärantikörper</i>	<i>24</i>
<i>Tabelle 3.4: Sekundärantikörper</i>	<i>25</i>
<i>Tabelle 3.5: Fluoreszierende Marker</i>	<i>26</i>
<i>Tabelle 3.6: Plasmide</i>	<i>26</i>
<i>Tabelle 3.7: Kulturträger und entsprechend ausplattierte Zellzahl der Mischkulturen</i>	<i>27</i>
<i>Tabelle 3.8: Kulturträger und ausplattierte Zellzahl primärer Oligodendrozyten</i>	<i>28</i>
<i>Tabelle 3.9: Pipettierschema Fugene® 6 und Lipofectamine™ 2000</i>	<i>30</i>
<i>Tabelle 3.10: Pipettierschema SDS-Gele</i>	<i>41</i>
<i>Tabelle 3.11: Pipettierschema für den PCR-Ansatz</i>	<i>45</i>
<i>Tabelle 3.12: Einstellungen der PCR-Maschine</i>	<i>45</i>

