

Expression und Funktion der Lyn Kinase in Oligodendrozyten

Dissertation
Zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften

Am Fachbereich Biologie
Der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

von Diplom-Biologin Iris Bobenhausen
geb. am 29.01.1975, in Bremen

Mainz, 2007

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Neuronen und Gliazellen des zentralen Nervensystems	1
1.2	Entwicklung von Oligodendrozyten im zentralen Nervensystem	3
1.2.1	Bildung von Oligodendrozyten	3
1.2.2	Migration und Überleben von Oligodendrozyten	3
1.2.3	Proliferation von Oligodendrozyten	4
1.2.4	Differenzierung von Oligodendrozyten	5
1.2.5	Myelinisierung von Oligodendrozyten	5
1.2.6	Oligodendrozyten Vorläuferzellen im adulten ZNS	7
1.2.7	Entwicklungsbedingte Protein Expression in Oligodendrozyten	8
1.3	Glycosphingolipid-reiche Mikrodomänen der Plasmamembran (<i>rafts</i>)	9
1.4	Src-Kinasen	10
1.4.1	Expression und Aufbau der Src-Kinase	10
1.4.2	Aktivierung der Src-Kinase	14
1.5	Src-Kinase: Lyn	17
1.5.1	Aufbau und Aktivierung der Lyn Kinase	17
1.5.2	Lyn-defiziente Mäuse	18
1.5.3	Funktionen der Lyn Kinase	19
1.5.4	Lyn Kinase in Oligodendrozyten	21
1.6	AMPA Rezeptor in Neuronen und Gliazellen	23
1.7	Zielsetzung dieser Arbeit	25
2	Material	26
2.1	Tiere	26
2.2	Geräte, Verbrauchsmaterialien und Reagenzien	26
2.3	Lösungen, Puffer und Medien	28
2.4	Antikörper	29
2.4.1	Polyklonale Antikörper	29
2.4.2	Monoklonale Antikörper	30
2.4.3	Sekundäre Antikörper	30
2.5	Primer Sequenzen, Plasmide und Software	31
3	Methoden	32
3.1	Zellbiologische und histologische Methoden	32

3.1.1	Präparation primärer Oligodendrozyten	32
3.1.2	Zelllinie Oli- <i>neu</i>	33
3.1.3	Gehirn-Schnitte	33
3.1.4	Zeitabhängige Prüfung von Protein-Expressionen	34
3.1.5	Glutamat Rezeptor B Aktivierung	34
3.1.6	Transfektion der Lyn Konstrukte in Oli- <i>neu</i> Zellen und primären Oligodendrozyten	35
3.1.7	Analyse der transfizierten Oli- <i>neu</i> Zellen und primären Oligodendrozyten	36
3.2	Biochemische Methoden	37
3.2.1	Proteinkonzentrationsbestimmung	37
3.2.2	Gelelektrophorese	37
3.2.3	Western Blot	38
3.2.4	Radioaktive Markierung	38
3.2.5	Immunpräzipitation	38
3.2.6	Kinase Aktivitäts-Prüfung (radioaktiv)	39
3.2.7	Immunfluoreszenzfärbung	39
3.2.8	Myelin Isolierung	40
3.2.9	Isolierung von Mikrodomänen der Plasmamembran (<i>rafts</i>)	41
3.3	Molekularbiologische Methoden	41
3.3.1	PCR	43
3.3.2	Ligation	43
3.3.3	Transformation	45
3.3.4	Mini- und Maxi-Präparation	45
3.4	Statistik	46
4	Ergebnisse	47
4.1	Expression der Src-Kinase Lyn in Zellen des murinen Gehirns	47
4.1.1	Lyn Kinase Expression in Zellen des Gehirns und im Myelin	47
4.1.2	Lyn Kinase Expression in Oligodendrozyten und im Myelin verschiedener Entwicklungsstadien	49
4.1.3	Lyn Kinase Expression in murinen Gehirnen <i>in vivo</i>	53
4.1.4	Lyn Kinase Expression in der Zelllinie Oli- <i>neu</i>	56
4.1.5	Lyn Kinase Expression in Mikrodomänen (<i>rafts</i>) von Oligodendrozyten und Myelin	59
4.2	Aktivität und Funktion der Src-Kinase Lyn	61
4.2.1	Transfektion von Lyn Konstrukten in Oligodendrozyten	62
4.3	Assoziation und Funktion der Src-Kinase Lyn	81
4.3.1	Co-Immunpräzipitation der Src-Kinase Lyn zur Klärung möglicher Bindungspartner	81
4.3.2	Glutamat Behandlung von Oligodendrozyten zur Aktivierung des AMPA-Rezeptors	84
5	Diskussion	89

5.1	Expression und Aktivität der Lyn Kinase in Oligodendrozyten	90
5.1.1	Die Lyn Expression und Aktivität nimmt mit Fortentwicklung der Oligodendrozyten und des Myelins ab	90
5.1.2	Lyn wird in der Plasmamembran in Mikrodomänen (<i>rafts</i>) exprimiert	91
5.2	Transfektion von Oligodendrozyten mit <i>Lyn</i>-Mutanten	92
5.2.1	Translation und Aktivität der <i>Lyn-GFP</i> Mutanten in Oligodendrozyten	92
5.2.2	Lyn Aktivität hemmt die Bildung zytoskelett-gestützter Ausläufer	93
5.2.3	Lyn Aktivität hemmt die Differenzierung und Ausläuferbildung	95
5.3	Lyn Kinase und AMPA Rezeptor sind assoziiert	97
5.3.1	Die Lyn Kinase ist mit der GluRB/C Untereinheit des AMPA Rezeptors assoziiert	97
5.3.2	Stimulierung des Glutamat Rezeptors aktiviert die Lyn Kinase	98
5.3.3	Der AMPA Rezeptor inhibiert die Zelldifferenzierung	98
5.4	Die Lyn Expression in der Zelllinie Oli-<i>neu</i> verläuft zyklisch	100
5.5	Hypothese 1: Die Lyn Kinase reguliert die zeitliche Entwicklung von Oligodendrozyten	102
5.6	Hypothese 2: Die Lyn Kinase reguliert den Fortbestand von Oligodendrozyten Vorläuferzellen im adulten Gehirn	104
5.7	Hypothese 3: Die Lyn Kinase spielt eine Rolle in der Neuron-Glia Synapsenbildung	105
5.8	Überblick und Ausblick	107
6	Zusammenfassung	110
7	Literatur	111
8	Abkürzungsverzeichnis	125

1 Einleitung

Die Bildung, Aufrechterhaltung und die Funktionalität von Zellen und komplexen Geweben Bedarf einer präzisen Regulation von Ereignissen wie Migration, Proliferation, Differenzierung und Apoptose von Zellen. Hierfür sind extrazelluläre Botenstoffe in Zusammenspiel mit intrazellulären Signalkaskaden und die Regulierung der Gen-Expression notwendig. Die Src-Kinasen, die extrazelluläre Signale über Rezeptoren empfangen und intrazellulär weiterleiten, spielen in vielen Signalkaskaden eine zentrale Rolle. Die Erforschung der Src-Kinase Lyn in Oligodendrozyten, den myelinisierenden Zellen des ZNS, sollte deshalb einen tieferen Einblick in die Regulierung der Zell-Entwicklung geben. Die folgenden Kapitel sollen einen Überblick über die Oligodendrozyten Entwicklung geben, sowie Aufbau und Funktion der Src Kinase und der Lyn Kinase im Besonderen vermitteln. Da Mikrodomänen der Plasmamembran (*rafts*) häufig eine Rolle in Signal-Kaskaden spielen werden diese kurz vorgestellt. Der AMPA-Rezeptor gewann im Laufe dieses Projektes immer mehr an Bedeutung und wird deshalb ebenfalls in einem Kapitel behandelt. Abschließend ist die Zielsetzung dieser Arbeit formuliert.

1.1 Neuronen und Gliazellen des zentralen Nervensystems

Das zentrale Nervensystem (ZNS) der Wirbeltiere umfasst das Gehirn und das Rückenmark. Neuronen bilden im zentralen Nervensystem über Synapsen ein komplexes Netzwerk und sind für die Weiterleitung von Nervenimpulsen verantwortlich. Neben den Neuronen gibt es im ZNS Gliazellen (Abb.1). Mikroglia sind Zellen des Immunsystems und mesenchymalen Ursprungs, wohingegen Makroglia, wie auch die Neurone, ektodermalen Ursprungs sind. Makroglia sind Astrozyten, die z.B. die Blut-Hirn-Schranke bilden und Neuron-Neuron Synapsen umschließen, um den extrazellulären pH-Haushalt zu regulieren. Weitere makrogliale Zellen sind Ependymzellen, die die Gehirn-Ventrikel auskleiden und Oligodendrozyten, die myelinisierenden Zellen des ZNS. (Fields & Stevens-Graham 2002, Morest & Silver 2003).

Oligodendrozyten, von der Vorläuferzelle bis hin zur differenzierten, myelinisierenden Zelle, durchlaufen viele Stadien, wie Proliferation, Migration, Differenzierung und Myelinisierung. Diese Vorgänge beinhalten unterschiedlichste Signalwege, welche den Zellzyklus beeinflussen, Zytoskelett-Veränderungen, sowie die Synthese und

den gerichteten Transport von Myelin Komponenten. Hauptaufgabe der Oligodendrozyten ist die Myelinisierung von Axonen und die dadurch verbundene elektrische Isolierung. Hierdurch wird der Widerstand der Axonmembran in periodischen Abständen erhöht und die saltatorische Erregungsweiterleitung ermöglicht. Die Entwicklung der Myelinscheide und die dadurch entstandene schnelle Signalweiterleitung bei möglichst geringem räumlichen und energetischen Aufwand, ist eine der wichtigsten Errungenschaften des Vertebratengehirns (Hartline & Colman 2007). Im peripheren Nervensystem übernimmt diese Aufgabe die Schwann'sche Zelle (Jessen & Mirsky 2002).

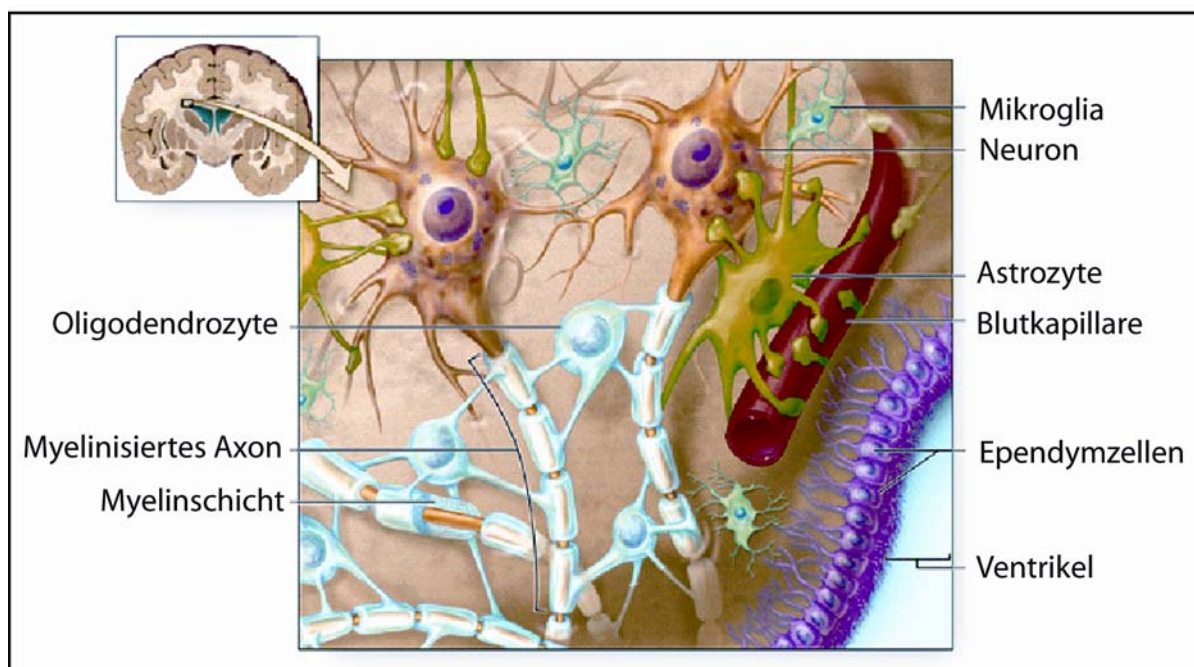


Abbildung 1: Zellen des zentralen Nervensystems

Links: Oligodendrozyten sind die myelinisierenden Zellen des zentralen Nervensystems, wobei eine Zelle mehrere Myelinscheiden bilden kann. Die myelinisierten Axone besitzen in regelmäßigen Abständen Myelinscheiden zur saltatorischen Erregungsweiterleitung. Die Myelinscheide besteht aus mehreren Myelinschichten, die sich um das Axon wickeln und dieses elektrisch isolieren. **Rechts:** Mikroglia sind Zellen des Immunsystems. Neurone leiten über ihre Axone Nervenimpulse weiter und bilden dabei über Synapsen ein weitverzweigtes Netzwerk. Astrozyten bilden an den Blutkapillaren die Blut-Hirn-Schranke und regulieren den extrazellulären pH-Haushalt. Ependymzellen kleiden den Ventrikel aus, der mit der Cerebrospinalflüssigkeit gefüllt ist. (Zeichnung übersetzt aus www.rienstraclinic.com)

1.2 Entwicklung von Oligodendrozyten im zentralen Nervensystem

1.2.1 Bildung von Oligodendrozyten

Neurone und Makro-Gliazellen (Astrozyten, Oligodendrozyten und Zellen des Ependym) entstehen aus dem Neuroepithelium, welches sich über die Neuralplatte und das Neuralrohr zum Gehirn entwickelt. Es handelt sich dabei um ektodermale Zellen, die sich während der Neurulation vom Ektoderm der Embryo Oberfläche entfernen, um das zentrale Nervensystem zu bilden (Baron et al 2005, Morest & Silver 2003).

Im sich entwickelnden Rückenmark bilden Signalproteine wie Shh (sonic hedgehog) oder BMP (bone morphogen proteins) dorso-ventrale Gradienten, die für die räumliche und zeitliche Expression von Transkriptionsfaktoren und anderen Genen verantwortlich sind und somit die Entwicklung von Neuronen, Oligodendrozyten und Astrozyten aus dem Neuroepithelium regulieren. Olig2 (oligodendrocyte transcription factor), ein Transkriptionsfaktor, der vom Shh Gradienten reguliert wird, ist für die Entwicklung von Motoneuronen und Oligodendrozyten in der pMN (motoneuron-precursor domain) des Rückenmarks verantwortlich, Sox 9 fördert die Bildung von Oligodendrozyten und Astrozyten. Weitere Transkriptionsfaktoren wie z.B. Olig1, Sox10 und Notch sind ebenfalls für die Bildung der Oligodendrozyten wichtig, spielen aber, neben weiteren Faktoren, auch noch in der späteren Entwicklung eine Rolle. Ähnliche Mechanismen müssen auch in anderen Regionen des Gehirns vorhanden sein, da Radialzellen in der Hirnrinde hauptsächlich Neurone bilden, wohingegen im *Striatum* neben Interneuronen hauptsächlich Oligodendrozyten gebildet werden (Colognato & French-Constant 2004, Gotz & Sommer 2005, Le Bras et al 2005).

Während die Oligodendrozyten Vorläuferzellen in der Embryonal-Phase hauptsächlich aus der Ventrikularzone in Gehirnregionen wie das *Telencephalon* und das *Cortex cerebellaris* migrieren, erhöht sich postnatal der Anteil dorsal einwandernder und regional entstehender Vorläuferzellen (Gotz & Sommer 2005).

1.2.2 Migration und Überleben von Oligodendrozyten

Nach der Bildung der Vorläuferzellen aus dem Neuroepithelium migrieren die neuronalen und glialen Vorläuferzellen entlang bestimmter Pfade um die subventrikuläre Zone zu verlassen. Hierbei gibt es gemeinsame, aber auch unterschiedliche Substrate, die die Migration beeinflussen, wie Netrin1, PDGF

(platelet derived growth factor), Sema3F und HGF (hepatocyte growth factor) (Colognato & French-Constant 2004, Yan & Rivkees 2002). Der AMPA-Rezeptor (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionate receptor) beeinflusst in Oligodendrozyten die Migration, sowie auch das Protein NG2 (neuron glial antigen 2) (Mallon et al 2002, Stegmüller et al 2003, Trotter 2005). Die glialen Vorläuferzellen migrieren durch das Gehirn zu ihren Zielgebieten und teilweise bis zum optischen Nerv. Dort können sie in Oligodendrozyten differenzieren. *In vitro* differenzieren diese Zellen je nach Serum Zugabe in Astrozyten Typ 2 oder Oligodendrozyten. Aus diesem Grund werden die Vorläuferzellen auch O-2A Zellen genannt (Raff et al 1983). Die Anzahl der Oligodendrozyten im optischen Nerv, wie auch in anderen Regionen des Gehirns, hängt von der Anzahl der Vorläuferzellen ab, die zum optischen Nerv migrieren, der Proliferationsrate und –dauer bevor die Zellen differenzieren und der Menge an Zellen, die einem programmierten Zelltod erliegen. Die Überlebensrate hängt von Zytokinen ab, wie PDGF, IGF-1 (insulin-like growth factor), NT3 (neurotrophin-3) und CNF (ciliary neurotrophic factor), um die die Vorläuferzellen konkurrieren (Raff et al 1998). Sowohl für die Migration, als auch für das Überleben der Zellen sind Integrine besonders wichtig. Bei der Migration spielt der Integrin α V β 1/Fibronectin Komplex eine Rolle, wohingegen für die Überlebensrate α 6 β 1/Laminin von Bedeutung ist (Baron et al 2005). Während der Differenzierung sind Signale der Axone wesentlich, so dass die Anzahl der Oligodendrozyten, die diese Axone myelinisieren mit der Anzahl der Axone übereinstimmen (Raff et al 1998).

1.2.3 Proliferation von Oligodendrozyten

Die Proliferation der Vorläuferzellen hängt ebenfalls von extrazellulären Signalen ab. PDGF, GGF (glial growth factor), FGF (fibroblast growth factor), IGF, CNF, NT3 und viele andere Faktoren fördern die Proliferation von Oligodendrozyten (Baron et al 2005, Raff et al 1998, Shi et al 1998). Für die Proliferation ist entscheidend, dass der Zellzyklus aus der G1-Phase in die S-Phase übergeht um die nächste Zellteilung einzuleiten. Inhibierend wirken hier z.B. die Stimulation des AMPA Rezeptors und die Blockade von K⁺ Kanälen (Gallo & Ghiani 2000, Ghiani et al 1999a, Ghiani et al 1999b, Nguyen et al 2006).

1.2.4 Differenzierung von Oligodendrozyten

Während die ersten Oligodendrozyten Vorläuferzellen im optischen Nerv der Ratte am Tag E16 (Embryonaltag 16) zu finden sind, beginnt die Differenzierung der ersten Oligodendrozyten erst am Tag der Geburt. Es gibt jedoch weiterhin Vorläuferzellen, die auch postnatal proliferieren. Die meisten Vorläuferzellen differenzieren erst ab Tag P6 (Postnataler Tag 6) (Hu et al 2004). Das Ende der Proliferation und der Beginn der Differenzierung hängt nicht von PDGF ab, auch dessen Rezeptoren werden weiterhin exprimiert. Ein intrinsischer Mechanismus scheint zu einem bestimmten Zeitpunkt die Differenzierung einzuleiten. Das Schilddrüsenhormon TH (thyroid hormone) spielt in der Überleitung zum Differenzierungsmodus eine Rolle, während die cdk (cyclin-dependent kinases) Inhibitoren p27/Kip1 für den zeitlichen Ablauf wichtig sind (Casaccia-Bonnel et al 1997, Raff et al 1998, Tang et al 2000, Tokumoto et al 2001). Während Notch im Rückenmark die Bildung von Oligodendrozyten fördert, hemmt der Notch-Rezeptor die Differenzierung der Oligodendrozyten Vorläuferzellen im optischen Nerv durch Bindung des Liganden Jagged 1 und könnte hierdurch die zeitliche Abfolge von Proliferation und Differenzierung mitbestimmen. Nach Herunterregulierung der Jagged 1 Expression, bindet der Notch Rezeptor F3 und fördert nun, durch den Wechsel der Liganden, die Differenzierung und Myelinisierung (Hu et al 2004, Wang et al 1998). Hierbei sind auch die beiden Integrine $\alpha V\beta 3$ und $\alpha 6\beta 1$ und ihre Liganden Fibronektin und Laminin beteiligt (Baron et al 2005). Die Aktivierung des AMPA Rezeptors durch Glutamat und die Blockade von K^+ -Kanälen inhibiert die Proliferation und Differenzierung der Oligodendrozyten Vorläuferzellen (Gallo et al 1996, Ghiani et al 1999b). Mit Beginn der Differenzierung verliert der Oligodendrozyt die Fähigkeit zu migrieren und zu proliferieren (McDonald & Belegu 2006) (Abb.2).

1.2.5 Myelinisierung von Oligodendrozyten

In Mäusen beginnt die Myelinisierung mit der Geburt und dauert bis 45-60 Tage nach der Geburt an. Jeder Oligodendrozyt kann bis zu 60 verschiedene Axon-Segmente myelinisieren, wobei nur Axone von mindestens $1\mu m$ Durchmesser myelinisiert werden (McDonald & Belegu 2006). Myelinisierung ist ein komplexer Prozess, indem Axone und Oligodendrozyten im ZNS in Kontakt treten und interagieren müssen, gefolgt von der Produktion und dem gerichteten Transport von Myelin-Komponenten zu der Myelinisierungsstelle. Die Oligodendrozyten beginnen die Axone zu umwinden

und formen so nach mehreren Umhüllungen eine multilamellare Myelinschicht. Aus diesen Membranstapeln wird das Zytoplasma, bis auf schmale zytoplasmatische Kanäle, verdrängt und so das Myelin kompaktiert. Jede Myelinscheide bildet an seinen lateralen Enden Membran-Schlaufen, die Reste von Zytoplasma enthalten, und Paranodien genannt werden. Die Paranodien bilden spezielle Kontaktstellen mit dem Axon. Auf axonaler Seite liegen dazwischen Bereiche die nicht myelinisiert sind, die Ranvier'schen Schnürringe. Hier konzentrieren sich auf axonaler Seite die Natriumkanäle, die eine Depolarisierung der Axonmembran erlauben und dadurch die saltatorische Erregungsweiterleitung ermöglichen (Baumann & Pham-Dinh 2001, Boiko & Winckler 2006, Sherman & Brophy 2005). Die Kaliumkanäle sind juxtaparanodal angeordnet (Arroyo & Scherer 2000). Während der Myelinisierung entstehen also unterschiedliche Protein- und Lipid-Verteilungen in Subdomänen des Axons und des Myelins. Diese sind für die glia-axonale Kommunikation während der Bildung und Aufrechterhaltung der Myelinscheide wichtig.

Die Trockenmasse des Myelins besteht zu 70-85% aus Lipiden. Die kompakte Myelinmembran setzt sich hauptsächlich aus Glykosphingolipiden, insbesondere Galaktocerebrosiden und Sulfatiden, sowie den Proteinen PLP, DM20 und MBP (myelin basic protein) zusammen. Im nicht kompakten Myelin, dass neben den Paranodien auch die abaxonale und periaxonale Schlaufe, sowie die zytoplasmatischen Kanäle beinhaltet, sind Proteine wie CNP (2',3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase), MAG (myelin-associated glycoprotein), MOG (myelin-oligodendrocyte glycoprotein) und Cx-32 (Connexin-32) lokalisiert. OSP (oligodendrocyte specific protein, Claudin-11) befindet sich genau zwischen kompakten und nicht kompakten Myelin und bildet eine Barriere zwischen den beiden Domänen. Den Kontakt zwischen Paranodien und Axon bildet ein Komplex, der das Zell-Adhäsion Protein Neurofascin, sowie Contactin und Caspr (contactin-associated protein) beinhaltet (Dyer 2002, Kramer et al 2001, Menon et al 2003). Neben Membran-gebundenen Proteinen haben auch diffusionsfähige Proteine wie NGF (nerve growth factor) und BDNF (brain-derived neurotrophic factor) eine wichtige Rolle bei der Neuron-Glia Kommunikation, sowie elektrische Stimulation durch Aktionspotentiale (Boiko & Winckler 2006, Demerens et al 1996, Sherman & Brophy 2005). Desweiteren können auch Astrozyten die Myelinisierung unterstützen, z.B. durch die Abgabe von LIF (leukemia inhibitory factor) (Ishibashi et al 2006).

Welch wichtige Rolle Myelin im ZNS einnimmt wird deutlich, wenn man bedenkt welche Krankheiten entstehen, wenn es zu einer Hypo-, Dys- oder Demyelinisierung kommt. Störungen der Myelinisierung in der fötalen und jungen infantilen Entwicklung kann zur Pelizeus-Merzbacher-Krankheit führen, Demyelinisierungen zu Leukodystrophien oder Multiplen Sklerose (Baumann & Pham-Dinh 2001).

1.2.6 Oligodendrozyten Vorläuferzellen im adulten ZNS

Oligodendrozyten Vorläuferzellen verbleiben auch im adulten Gehirn und verharren in ihrem undifferenzierten Zustand (Karram et al 2005, Reynolds & Hardy 1997). Bei Zellen des optischen Nervs wurde festgestellt, dass sie viel langsamer als die Oligodendrozyten Vorläuferzellen des sich entwickelnden Gehirns proliferieren (Wolswijk & Noble 1989). Unter Zugabe von PDGF proliferieren die adulten Vorläuferzellen einmal alle drei bis vier Tage im Gegensatz zu den perinatalen Oligodendrozyten, die sich alle 24 Stunden teilen. PDGF, GGF2 und cAMP (cyclic-adenosin-monophosphate) zusammen erhöhen die Proliferationsrate jedoch auf einen annähernd 24 Stunden Zyklus. Dies legt die Vermutung nahe, dass im Falle einer Demyelinisierung die freigelegten Axone GGF2 freisetzen und dies, zusammen mit dem PDGF der Astrozyten, zu einer erhöhten Proliferation von Oligodendrozyten Vorläuferzellen führt, die für die Remyelinisierung zur Verfügung stehen (Polito & Reynolds 2005, Shi et al 1998). Die Stimulierung dieser Vorläuferzellen zu proliferieren, zu migrieren, Kontakt zum Axon aufzunehmen, zu differenzieren und zu remyelinisieren könnten Mechanismen beinhalten, die der Stimulierung perinataler Vorläuferzellen ähnlich sind. Die Freigabe von Neurotransmittern, wie Glutamat, durch Axone beeinflussen die Migration, Proliferation und Differenzierung von Oligodendrozyte im perinatalen und adulten Gehirn (Butt 2006). Ein Mangel an Remyelinisierung, wie sie z.B. bei der Multiplen Sklerose zu sehen ist, könnte dadurch zustande kommen, dass entweder nicht genug Oligodendrozyten Vorläuferzellen zu der Läsion rekrutiert werden oder diese nicht in der Lage sind zu differenzieren (Nguyen et al 2006).

Eine weitere Funktion von Oligodendrozyten Vorläuferzellen im adulten ZNS könnte die Bildung von Glia-Neuron Synapsen sein. Die Vorläuferzellen, die durch den entwicklungsspezifischen Protein Marker NG2 detektiert werden (Abb.2), sind sowohl in der weißen als auch in der grauen Substanz vorhanden. Stimulierung von Axonen und die Abgabe von Glutamat führt in manchen Oligodendrozyten Vorläuferzellen

des sich entwickelnden und adulten *Hippocampus* und *Cerebellum* zu einer Stimulierung des AMPA Rezeptors und einer Erhöhung des Ca^{2+} Levels in der Zelle. Freisetzung von Glutamat erfolgt auch durch nicht myelinisierte Axone (Bergles et al 2000, Kukley et al 2007, Ziskin et al 2007). Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen Synapsen zwischen Ausläufern von Neuronen und Oligodendrozyten Vorläuferzellen (Bergles et al 2000, Lin et al 2005). Die Oligodendrozyten Vorläuferzellen besitzen K^+ - und Na^+ -Kanäle und sind in der Lage unreife Aktionspotentiale zu initiieren. Ob die NG2-positiven Zellen in der grauen Substanz, im Gegensatz zu denen der weißen Substanz, teilweise GFAP (glial fibrillary acidic protein) und TOAD-64 (turned on after division), ein astroglialer bzw. neuronaler Marker, exprimieren, ist umstritten (Butt et al 2005, Chittajallu et al 2004, Nishiyama et al 2005). Diese Unterschiede weisen darauf hin, dass NG2-positiven Zellen im adulten Gehirn heterogen sind und teilweise, besonders in Bereichen der grauen Substanz, nicht oder nicht nur für Remyelinisierungen bereit stehen, sondern auch andere Aufgaben, wie die Bildung von Synapsen, besitzen (Chittajallu et al 2004). Hierdurch stellt sich die Frage, ob ein Teil der NG2-positiven Zellen überhaupt zu Oligodendrozyten gezählt werden sollten oder ob diese eine eigene Untergruppe der Gliazellen bilden. Aus diesem Grund werden sie auch Synantozysten genannt. Neben Kontakten zu Neuronen bestehen auch Kontakte zu Astrozyten, Oligodendrozyten und zum Myelin. Die genaue Funktion ist noch nicht geklärt (Butt et al 2005).

1.2.7 Entwicklungsbedingte Protein Expression in Oligodendrozyten

Während der Entwicklung und Differenzierung von Oligodendrozyten werden unterschiedliche entwicklungsspezifische Oligodendrozyten Marker exprimiert, die anhand von Antikörpern detektiert werden können. Des Weiteren können die Zellen phänotypisch unterschiedlichen Reifegraden zugeordnet werden (Abb.2). Die Oligodendrozyten Vorläuferzellen, auch O-2A Zellen, haben ein bipolares Aussehen und exprimieren unter anderem den PDGF-Rezeptor, NG2 und GD3 (ganglioside-induced differentiation-associated-protein) (Eisenbarth et al 1979, Niehaus et al 1999, Pringle et al 1992, Reynolds & Wilkin 1988). Die multipolaren Prä-Oligodendrozyten beginnen mit der Expression von Sulfatid (erkannt durch den O4 Antikörper), DM20 und CNP, später kommen noch Galactocerebroside (erkannt durch den O1 Antikörper) und MAG hinzu (Dubois-Dalcq et al 1986, Matthieu et al 1975, Sommer & Schachner 1981). Vollständig differenzierte Oligodendrozyten exprimieren

Myelin-Proteine wie PLP, MBP, MAG und MOG. *In vivo* handelt es sich um myelinisierende Zellen, *in vitro* sieht man Myelin-Verdickungen an den Enden der Ausläufer (Dubois-Dalcq et al 1986, Scolding et al 1989).

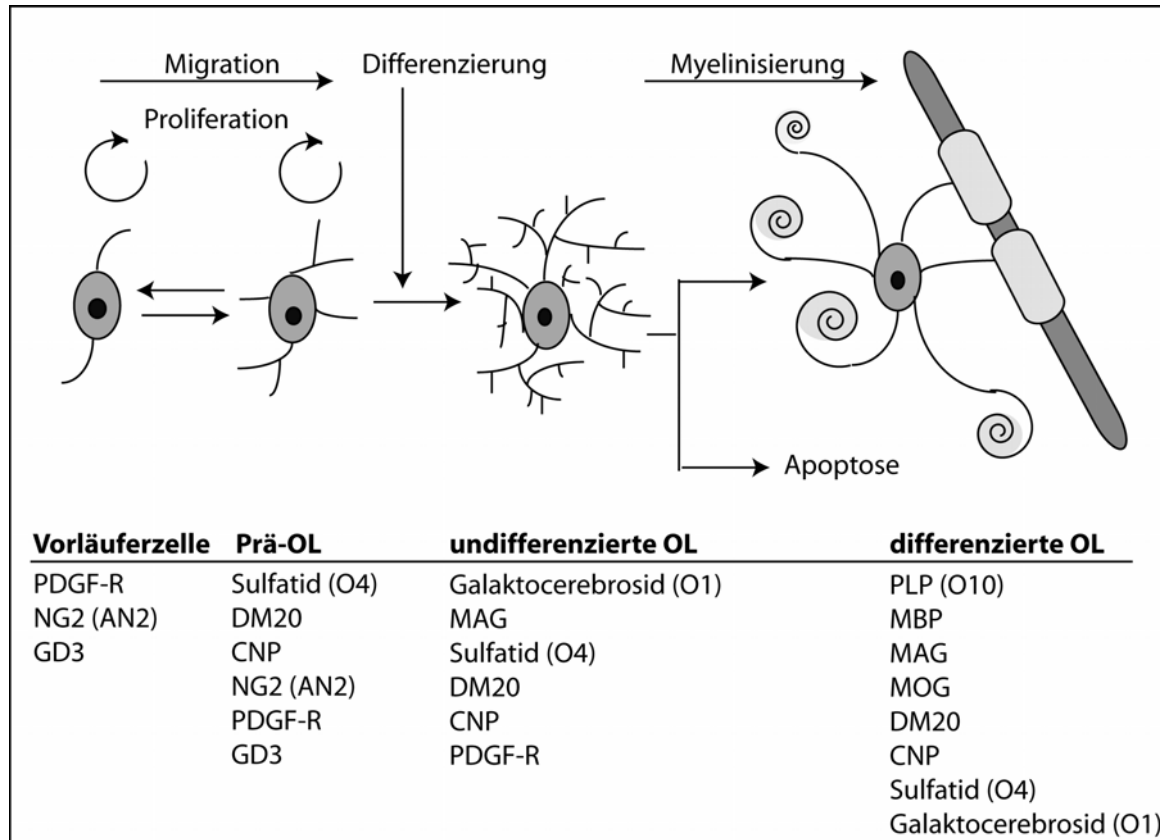


Abbildung 2: Entwicklungsphasen der Oligodendrozyten

Oligodendrozyten Vorläuferzellen proliferieren und migrieren. Zell- und Entwicklungsspezifische Marker sind PDGF-R, NG2 und GD3. In Prä-Oligodendrozyten (Prä-OL) werden zusätzlich Sulfatid, DM20 und CNP exprimiert. Schließlich ist die Migration und Proliferation beendet und die Differenzierung setzt ein. Marker für das Stadium der undifferenzierten Oligodendrozyte (OL) sind Galaktocerebrosid, MAG, Sulfatid, DM20, CNP und PDGF-R. Abhängig von Überlebensfaktoren wie Zytokinen gehen die Zellen entweder in die Apoptose oder differenzieren vollständig zu myelinisierenden Oligodendrozyten (differenzierte OL). *In vivo* myelinisieren sie Axone, *in vitro* bilden sie Myelin-Verdickungen. Sie exprimieren nun zusätzlich PLP, MBP und MOG, dafür wird kein PDGF-R mehr exprimiert. Zeichnung abgeleitet (Baron et al 2005, Baumann & Pham-Dinh 2001).

1.3 Glycosphingolipid-reiche Mikrodomänen der Plasmamembran (rafts)

Rafts sind dynamische Komplexe aus Glykosphingolipiden und Cholesterin in der Plasmamembran. Sie sind bei 4°C in bestimmten Detergenzien, wie Tx100, unlöslich und können aufgrund ihrer geringen Dichte über eine Sukrose-Dichte Zentrifugation isoliert werden (Simons & Ikonen 1997). Durch ihre Lipid-Zusammensetzung und

deren gesättigten Kohlenwasserstoff-Ketten können Proteine spezifisch in die *rafts* ein- oder ausgeschlossen werden (Rajendran & Simons 2005). Durch die selektive Zusammenführung bestimmter Proteine können diese besser miteinander interagieren, was zeigt, dass *rafts* eine wichtige Rolle als Signaltransduktions-Plattformen einnehmen (Simons & Toomre 2000). Typische Protein Familien, die die Lipid Zusammensetzung der *rafts* bevorzugen sind GPI-verankerte Proteine (Chatterjee et al 2001) und Src (sarcoma viral oncogene homolog) -Kinasen (Simons & Toomre 2000).

In Oligodendrozyten spielen *rafts* eine wichtige Rolle im Membrantransport, da grosse Mengen an Myelin-Bestandteilen zu der myelinisierenden Stelle transportiert werden müssen. Myelin Proteine wie MAG und PLP können jedoch nur in *rafts* detektiert werden, die mit dem Detergenz CHAPS isoliert wurden und nicht in Tx100-isolierten *rafts* (Lee 2001, Simons et al 2000). Weitere Proteine in *rafts* der Oligodendrozyten, sind NCAM120 (neural cell adhesion molecule), F3, Fyn und Lyn (Kramer et al 1997), sowie MBP und CNP (DeBruin et al 2005), Integrin $\alpha 6 \beta 1$ und der PDGF-Rezeptor (Decker & French-Constant 2004). Dabei müssen nicht alle Proteine in denselben *rafts* vorhanden sein. Es konnten *rafts* mit leicht unterschiedlicher Sukrose-Dichte aus Myelin isoliert werden, die aufgrund ihrer Proteinzusammensetzungen in verschiedenen Signal-Kaskaden eine Rolle spielen könnten (Arvanitis et al 2005).

1.4 Src-Kinasen

1.4.1 Expression und Aufbau der Src-Kinase

Src (sarcoma viral oncogene homolog)-Kinasen sind Nicht-Rezeptor-Phosphotyrosin-Kinasen, die aus den neun Mitgliedern Src, Fyn, Lyn, Lck, Hck, Fgr, Blk, Yrk und Yes bestehen (Brown & Cooper 1996). Src-Kinasen spielen in vielen Signaltransduktionswegen eine Rolle und können Proliferation, Differenzierung, Migration, Apoptose und andere Vorgänge in Zellen beeinflussen (Hibbs & Dunn 1997) (Superti-Furga & Courtneidge 1995). Ihre Expression ist in Tabelle 1 wiedergegeben (Thomas & Brugge 1997).

Tabelle 1: Expression der Src-Kinase (Thomas & Brugge 1997)

Src	Ubiquitär; zwei Neuron-spezifische Isoformen
Fyn	Ubiquitär; T-zell-spezifische Isoform (FynT)
Yes	Ubiquitär
Yrk	Ubiquitär
Lyn	ZNS, B-Zellen, myeloide Zellen; zwei alternative „Splice“-Formen
Hck	myeloide Zellen; zwei verschiedene Translations-Anfänge
Fgr	myeloide Zellen, B-Zellen
Blk	B-Zellen
Lck	T-Zellen, natürliche Killer-Zellen, ZNS

Alle Mitglieder dieser Familie haben eine molekulare Masse von 52-62kD und besitzen sechs funktionale Domänen. N-terminal liegt die Src Homologie Domäne 4 (SH4), daran schließt sich die „unique“ Domäne an, dann kommen die Protein-Binde-Domänen SH3 und SH2 (Brown & Cooper 1996). Diese Domänen findet man in vielen Proteinen, wie Phosphatasen, Zytoskelett-Proteinen, Transkriptions-Faktoren (Mayer & Baltimore 1993). Es schließt sich eine katalytische Domäne SH1 an und c-terminal ein regulatorischer Schwanz (Brown & Cooper 1996) (siehe Abb.3A).

Src-Homologie Domäne 4 (SH4): Diese Domäne besitzt Fettsäure Modifikationen, die die Kinase an der cytosolischen Seite der Plasmamembran verankert. Zum Einen handelt es sich dabei um eine Myristoylierung des Glycins an Position 2, dass bei jeder Src-Kinase zu finden ist (Brown & Cooper 1996) und zum Anderen kann es zusätzlich zu einer Palmytoylierung eines Cysteins in den ersten 10 Aminosäuren der Src-Kinase kommen. Alle Src-Kinasen, außer Src selbst und Blk, haben die Möglichkeit der zusätzlichen Palmytoylierung (Koegl et al 1994). Dies führt dazu, dass die Src-Kinasen nicht nur an der Membran binden können, sondern in Glykosphingolipid-reichen Domänen (1.3) angereichert werden, wo sie in physiologischer Nähe zu möglichen Assoziationspartnern stehen (Robbins et al 1995).

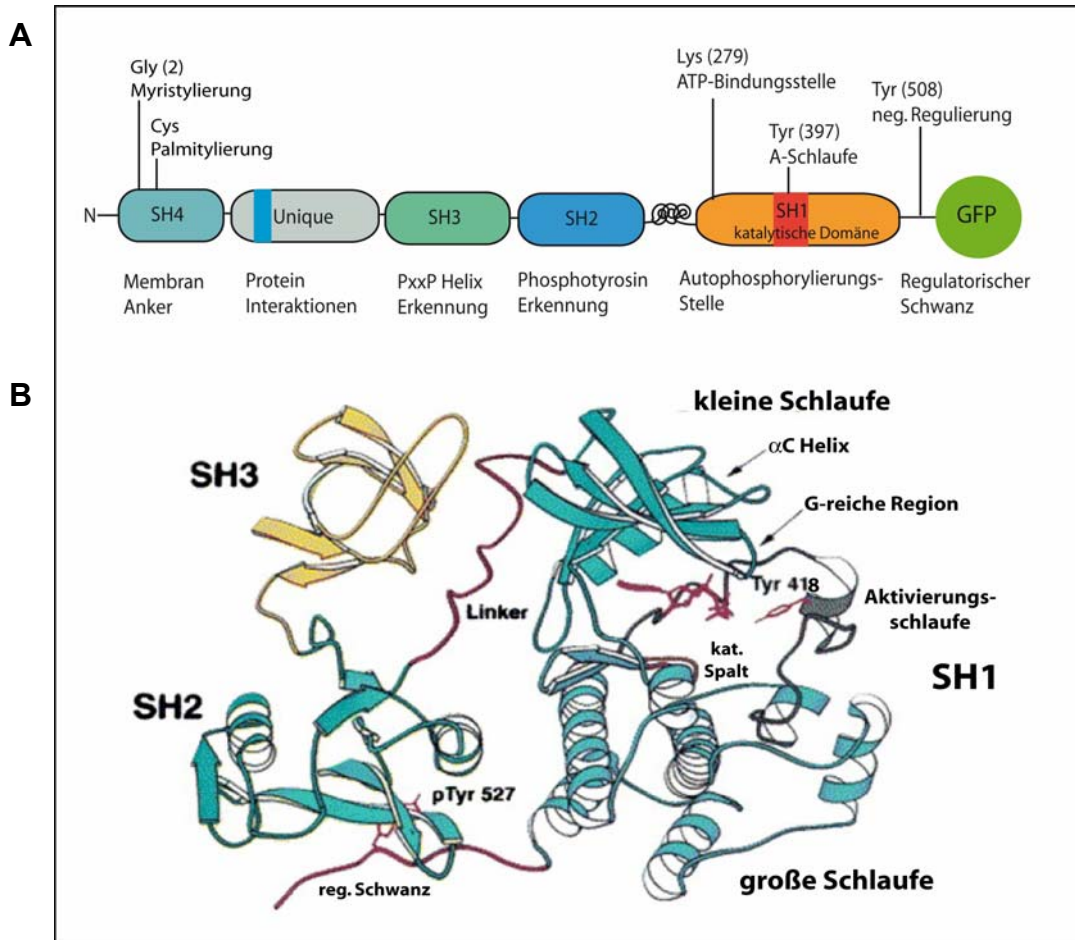


Abbildung 3: Sekundär- und Tertiärstruktur der Src-Kinase

A: Sekundärstruktur der Src-Kinase, Zeichnung abgeleitet von (Kovarova et al 2001), von links nach rechts: N-terminal liegt die SH4 Domäne zur Verankerung des Proteins in der Plasmamembran via Myristoylierung und Palmytylierung, die Unique Domäne, die SH3- und SH2 Domänen sind Protein-Binde-Domänen. Die SH1 Domäne ist die katalytische Domäne mit der ATP Bindestelle und der A-Schleife zur Autophosphorylierung. C-terminal liegt der regulatorische Schwanz. **B:** Tertiärstruktur der Src-Kinase (Roskoski 2004), SH4 und Unique Domäne sind nicht deutlich gezeigt, die SH3 Domäne besitzt β -Stränge, die SH2-Domäne bildet mit β -Strang und α -Helix eine Tasche zur Bindung des Phosphotyrosins. Die katalytische Domäne SH1 besteht aus einer kleinen und großen Schleife in deren Mitte die Aktivierungsschleife liegt sowie der katalytische Spalt (kat. Spalt). Der regulatorische Schwanz (reg. Schwanz) bindet in der inaktiven Form (wie hier gezeigt) mit dem pTyr527 an die SH2-Domäne.

„Unique“ Domäne: Diese Domäne ist für jede Src-Kinase spezifisch. Es wird angenommen, dass sie spezifische Interaktionen mit Proteinen eingeht (Thomas & Brugge 1997). Für die meisten Src-Kinasen ist die Funktion dieser Domäne unklar (Boggon & Eck 2004), von der Src-Kinase Lck weiß man jedoch, dass sie eine Bindungsstelle für die T-Zell Rezeptoren CD4 (co-receptor domain) und CD8a besitzt (Rudd et al 1988). Die Src-Kinase selbst besitzt in dieser Domäne die Bindestelle für PKC (Protein Kinase C), Ser-12 und Ser-48, die während der PKC Aktivierung phosphoryliert sind (Tatosyan & Mizenina 2000).

SH3-Domäne: Diese Domäne ist eine Protein-Protein-Bindedomäne. Sie ist sowohl für intra- als auch für intermolekulare Interaktionen wichtig. Sie reguliert die katalytische Aktivität der Kinase (siehe 1.4.2.), die Lokalisation und die Rekrutierung von Substraten (Thomas & Brugge 1997). Die SH3-Domäne bindet kurze Prolin-reiche Domänen. Das wichtigste Sequenzmuster der Liganden ist PXXP, allerdings sind umliegende Lysin- und Arginin-Reste ebenfalls für die Stabilität und Affinität der Bindung von Bedeutung (Rickles et al 1995). Die SH3 Domäne besteht aus fünf antiparallelen β -Strängen und zwei Schleifen, die die PXXP-Bindungsstelle einfassen. Die Bindungsstelle nimmt dadurch eine helikale Struktur ein, wodurch Liganden sowohl in N- als auch in C-terminaler Orientierung binden können (Boggon & Eck 2004) (Abb.3B). Viele Proteine mit einer SH3-Domäne sind mit dem Zytoskelett assoziiert (Weng et al 1994).

SH2-Domäne: Dies ist die zweite Domäne, die für Protein Interaktionen der Src-Kinase verantwortlich ist. Außerdem spielt auch sie eine Rolle in der Regulation der Kinase-Aktivität (siehe 1.4.2.). In der SH2-Domäne ist ein β -Strang beidseitig von einer Helix umgeben, die zwei Taschen bilden (Abb.3B). Die eine Tasche der SH2-Domäne bindet mit Arginin-175 an ein Phosphotyrosin des Liganden, die andere Tasche bindet an eine 3-5 aminosäurelange Sequenz des Liganden, die c-terminal vom Phosphotyrosin liegt (Roskoski 2004, Songyang et al 1995, Tatosyan & Mizenina 2000). Die Bindung mit der höchsten Affinität ist pY-EEI, wobei polare und elektrostatische Interaktionen Glutamat an Position pY+1 und pY+2 bevorzugen, allerdings sind auch Interaktionen mit ähnlichen Sequenzen möglich (Boggon & Eck 2004).

SH1-Domäne (katalytische Domäne): Sie besteht aus einer n-terminalen kleinen Schlaufe und einer c-terminalen größeren Schlaufe (Abb.3B). Sie ist für die Aktivität der Kinase und die Substrat Spezifität von Bedeutung. Die Phosphorylierungs-Sequenz des Substrats ist EEEIYG/EEFD, kann jedoch leicht abweichen (Tatosyan & Mizenina 2000). Die kleinere Schlaufe bindet und orientiert ATP und besteht hauptsächlich aus einem antiparallelen β -Strang. Die größere Schlaufe bindet teilweise ebenfalls ATP und außerdem das Protein-Substrat. Es besteht hauptsächlich aus einer α -Helix (Roskoski 2004). Der katalytische Spalt liegt zwischen den beiden Schleifen und kann je nach Lage der Schleifen eine offene oder geschlossene Konformation einnehmen. Die Autophosphorylierungsstelle in der Aktivierungsschleufe ist teil des Spaltes und der großen Schlaufe (Ozkirimli & Post

2006) (Abb.3B). Die Autophosphorylierung des Tyrosins an Position 418 (im Kontext IEDNEYTAR) führt zu einer Stabilisierung des aktiven Zustandes der Kinase in der offenen Konformation (siehe 1.4.2) (Superti-Furga & Courtneidge 1995) (Abb.4).

Regulatorischer Schwanz: Der c-terminal liegende regulatorische Schwanz ist 19 Aminosäuren lang und reguliert die Src-kinase Aktivität. Ein Tyrosin an Position 527 kann durch Phosphorylierung einen Konformationswechsel herbeiführen, der zur Inaktivierung der Src-Kinase führt (Tatosyan & Mizenina 2000) (Abb.4).

1.4.2 Aktivierung der Src-Kinase

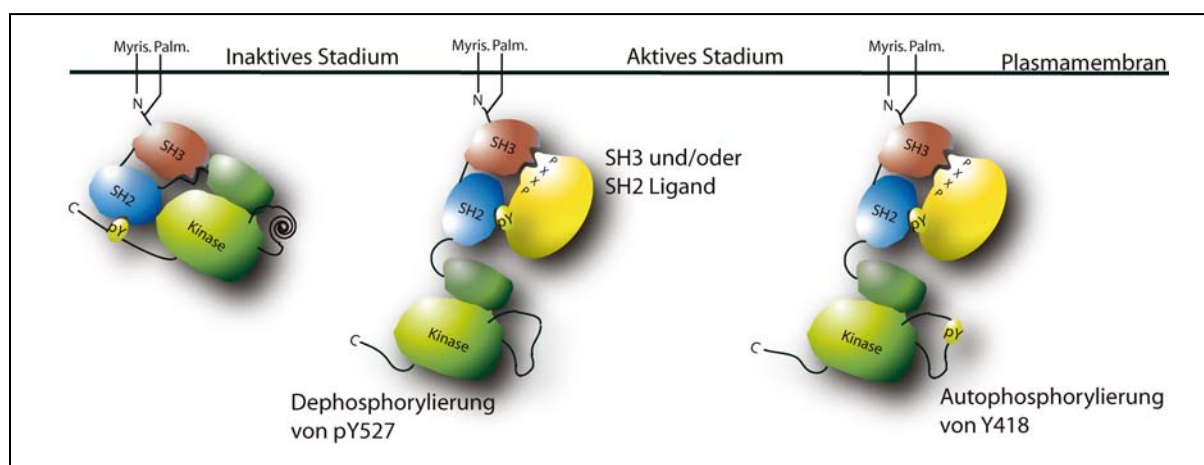


Abbildung 4: Aktivierung der Src-Kinase

Im inaktiven Stadium bindet das pY527 des c-terminalen regulatorischen Schwanzes an die SH2-Domäne. Hierdurch kommt es zu einer geschlossenen Konformation. Wird pY527 dephosphoryliert und/oder Liganden der SH3 und/oder SH2-Domäne binden, öffnet sich diese Konformation. Es kommt zu einer Autophosphorylierung des Y418. Dies stabilisiert die offene Konformation. Zeichnung abgeleitet von (Roskoski 2004).

Hochauflösende Kristall-Struktur-Analysen haben gezeigt, welche Konformation Src-Kinasen im inaktiven und aktiven Zustand einnehmen und wie intramolekulare Interaktionen zwischen der SH2- und SH3-Domäne den inaktiven Zustand stabilisieren (Xu et al 1997).

Die SH2- und SH3-Domänen liegen dem katalytischen Spalt gegenüber und unterdrücken die Aktivierung der Kinase, indem sie mit Aminosäuren der katalytischen Domäne interagieren. Des weiteren bindet die SH3-Domäne an die Linkerregion zwischen SH2- und SH1-Domäne (Thomas & Brugge 1997). Dieses Motiv ist nicht das bevorzugte PXXP-Motiv, hat aber eine links gedrehte polyproline Helix. Die SH2-Domäne bindet das phosphorylierte Tyrosin an Position 527 des regulatorischen Schwanzes. Hierdurch hat die Kinase eine geschlossene Konformation und ist somit inaktiv (Abb.4).

Dephosphorylierung des Tyrosins an Position 527 führt zu einem Konformationswechsel und zur Aktivierung der Kinase (Brown & Cooper 1996). Die hohe Affinität von Substraten kann zur Zerstörung der intramolekularen Bindungen von SH2-, SH3- und SH1-Domäne führen und somit ebenfalls zur Aktivierung der Src-Kinase beitragen. Die Autophosphorylierung von Y418 ist für die Aktivierung von besonderer Bedeutung (Thomas & Brugge 1997). Das Maximum an katalytischer Aktivität ist erreicht, wenn die Kontakte zwischen SH2-, SH3- und SH1-Domäne vollständig gelöst sind, das Tyr418 in der Aktivierungsschleife phosphoryliert und das Tyr527 des regulatorischen Schwanzes dephosphoryliert (Ozkirimli & Post 2006) (Abb.4). Durch den Konformationswechsel öffnet sich die Kinase und kann nun Substrate binden und katalytisch aktiv werden.

Tabelle 2: Aminosäure-Interaktionen der katalytischen Domäne: Aktivierung/Deaktivierung der Src-Kinase (Ozkirimli & Post 2006)

Aminosäure	Lokalisation	Interaktionspartner Aktives Stadium	Interaktionspartner Nicht-aktives Stadium
K295	Kleine Schleife	E310	D404, ATP
E310	α C Helix	K295	R409, Y382
D386	Katalytische Schleife	----	Y418
D404	Metall-Ionen-Bindestelle	Mg ²⁺	Mg ²⁺ , K295
R409	Aktivierungsschleife	Y418	E310
Y418	Aktivierungsschleife	R409, R385	D386
ATP	Katalytischer Spalt	----	K295

Die kleine und große Schleife der katalytischen Domäne können unterschiedliche Orientierungen einnehmen, die zu einer Öffnung oder zur Schließung des katalytischen Spaltes führen (Abb.5A/B und D/E). In der kleinen Schleife befindet sich eine α C-Helix, die durch rotieren zur Öffnung des Spaltes beitragen kann.

Im aktiven Zustand ist die α C-Helix zur ATP-Bindungsstelle gedreht, da E310 mit K295 interagiert. In der großen Schleife ist die Phosphorylierung des Y418, die zur Aktivierungsschleife gehört, wichtig (Roskoski 2004). Die Aktivierungsschleife bildet im phosphorylierten Zustand eine gestreckte Struktur, die den katalytischen Spalt öffnet und Substraten den Zugang ermöglicht. Hierbei interagiert das pY418 mit R385 und R409 (Abb.5F). Nun kann ATP binden und Phosphat auf das Substrat transferiert werden. K295 bindet das α - und β - Phosphat des ATPs. D386 orientiert die Tyrosyl-Gruppe des Substrates, so dass ein Transfer stattfinden kann. D404 ist

Teil der Aktivierungs-Schleife und bindet Mg^{2+} und K295, welche wiederum den Transfer des γ -Phosphats am ATP koordinieren (Ozkirimli & Post 2006) (Tabelle 2). Die Rotation der α C-Helix nach außen führt zu einer Interaktion von E310 mit R409 und Y382 und zur Inaktivierung (Abb.5C). Y418 ist nun im unphosphorylierten Zustand, so dass die Schleife kompakter ist und zwei kurze α -Helices bildet, die den Spalt blockieren. Dabei geht Y418 eine Wasserstoffbrücken-Bindung mit D386 im katalytischen Spalt ein. Die Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung des Y418 führt zu der größten Konformationsänderung im Enzym und ist deshalb von besonderer Bedeutung (Tabelle 2) (Ozkirimli & Post 2006).

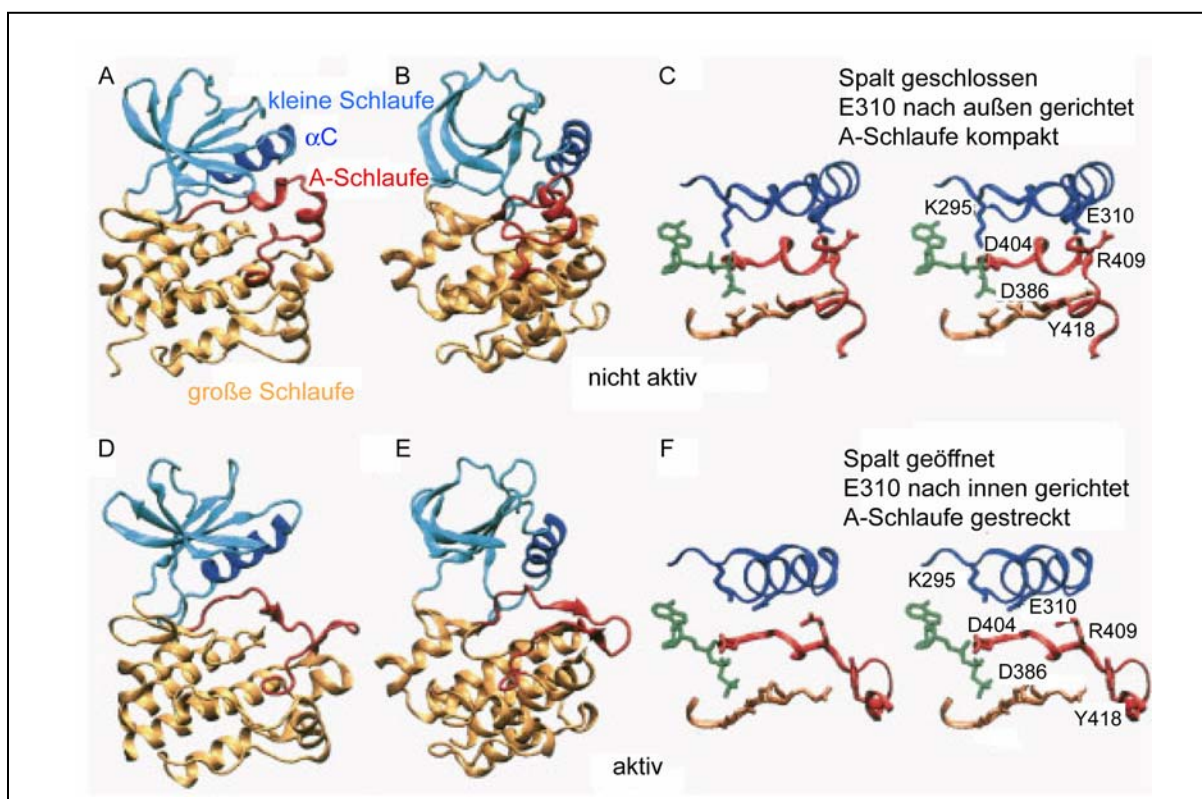


Abbildung 5: Aktivierung der Kinase Domäne (Ozkirimli & Post 2006)

Vergleich der katalytischen Domänen Struktur der Src-Kinase in der nicht-aktiven (A-C) und aktiven (D-F) Konformation. Die SH3 und SH2 Domäne ist hier nicht gezeigt. B und E sind im Vergleich zu A und D um 90° rotiert. Die kleine Schleife ist in der Abbildung blau, die große Schleife ist gelb und die α C Schleife (α C) ist dunkelblau. Die Aktivierungsschleife (A-Schleife) ist rot und ist im inaktiven Zustand kompakt und verhindert Substrat-Bindungen und im aktiven Zustand gestreckt. C und F zeigen den katalytischen Spalt und deren Aminosäure-Interaktionen. ATP ist in grün dargestellt.

Kinase eine untergeordnete Rolle zu spielen. In B-Zellen, wie auch in Oligodendrozyten, kann die Phosphorylierung des Y508 der Lyn Kinase kaum detektiert werden, auch dann nicht, wenn keine Lyn Kinase Aktivität messbar ist (Colognato et al 2004, Thomas & Brugge 1997). Der Verlust der Csk-Kinase in B-Zellen führt jedoch zur Aktivierung von Lyn. Die Balance von Tyrosin Phosphatase und Csk-Kinase scheint hier von Bedeutung. Außerdem sind andere intramolekulare Mechanismen für die Aktivierung wichtig, wie Liganden mit hoher Affinität oder die Phosphorylierung von Tyrosin 397 (siehe 1.4.2) (Thomas & Brugge 1997).

1.5.2 Lyn-defiziente Mäuse

Lyn-defiziente Mäuse entwickeln Autoimmunkrankheiten, die aufgrund von Autoantikörpern im Serum, als auch Ablagerungen von Immunkomplexen in der Niere charakterisiert werden können (Hibbs & Dunn 1997). Die B-Zellen haben eine erhöhte Ligation von B-Zell-Rezeptoren (BCR). Dies führt zu einer Aktivierung der Lyn Kinase, die dann ihrerseits eine negativ-regulierende Funktion einnimmt und die Immun-Antwort hemmt. Außerdem ist die Anzahl von B-Zellen reduziert (Xu et al 2005). Die Fc ϵ -Rezeptor Signal-Kaskade in Mastzellen ist beeinträchtigt, was zu einer gestörten allergischen Reaktion führt, deren Symptome an die Autoimmun-Krankheit Lupus erythematosus erinnern (Enyedy et al 2001, Hibbs & Dunn 1997). Die Fc γ -Rezeptor-abhängige Phagozytose in Makrophagen ist verzögert (Crowley et al 1997).

Im zentralen Nervensystem Lyn-defizienter Mäuse kann kein drastischer Phänotyp in der Myelinisierung erkannt werden, im Gegensatz zu Fyn-defizienten Mäusen, die eine reduzierte Anzahl von Oligodendrozyten besitzen und an Hypomyelinisierung leiden. Das Myelin von Lyn-defizienten Mäusen ist nicht beeinflusst (Sperber et al 2001) und es zeigen sich auch sonst keine morphologischen Veränderungen des ZNS. Allerdings ist die spontane Bewegungsaktivität der Lyn-defizienten Mäuse unterdrückt. Dies ist darauf zurückzuführen, dass PKC (Protein Kinase C) eine hohe Aktivität aufweist, da keine negative Regulation durch die Lyn Kinase stattfinden kann. Dies führt zu einer verstärkten Aktivierung des NMDA-Rezeptors (N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor), der neben Lernen und Gedächtnis auch eine wichtige Rolle in der Motorik spielt (Umemori et al 2003). Außerdem spielt die Lyn Kinase eine Rolle bei der EAE (experimental allergic encephalomyelitis). EAE ist eine demyelinisierende Autoimmun-Erkrankung in Mäusen, die in Symptomen und

Pathologie Ähnlichkeiten mit Multipler Sklerose aufweist. In Lyn-defizienten Mäusen erreicht die Krankheit schneller einen erhöhten Schweregrad aufgrund einer reduzierten Produktion von Zytokinen (Du & Sriram 2002).

1.5.3 Funktionen der Lyn Kinase

Die Lyn Kinase wird sowohl von Zellen des zentralen Nervensystems, als auch des Immunsystems exprimiert (Tabelle 1) (Thomas & Brugge 1997).

1.5.3.1 Funktionen im Immunsystem

Die Lyn Kinase ist in den Zellen des Immunsystems unter anderem mit dem B-Zell-Rezeptor (Cambier & Jensen 1994), als auch mit Fc-Rezeptoren, wie dem Fc ϵ -Rezeptor (Eiseman & Bolen 1992), dem Fc γ -Rezeptor (Bewarder et al 1996) und dem Fc μ -Rezeptor (Rabinowich et al 1996), mit unterschiedlichen CD-Rezeptoren und mehreren Zytokin-Rezeptoren assoziiert (Hibbs & Dunn 1997). Vielfach spielen *rafts* als Signaltransduktionsplattformen eine wichtige Rolle (Gupta & DeFranco 2003, Holowka et al 2000, Kovarova et al 2001). Die Signal-Kaskaden, die bisher am Besten untersucht wurden, sind die des B-Zell-Rezeptors in B-Lymphozyten und des Fc ϵ -Rezeptors in Mastzellen.

B-Zell-Rezeptor: Die Aktivierung der Lyn Kinase nach B-Zell-Rezeptor Stimulierung beeinflusst zahlreiche Signal-Kaskaden, in der die Lyn Kinase eine Schlüsselfunktion übernimmt. So werden, je nach Stärke des B-Zell-Rezeptor Signals dem Entwicklungsstadium der B-Lymphozyten und der Co-Rezeptoren, wie CD19/CD22, die Reifung der Zellen, Apoptose, Adhesion und Zellteilung beeinflusst. Hierbei kann die Lyn Kinase sowohl aktivierende als auch hemmende Funktionen übernehmen (Brown & Cooper 1996, Gauld & Cambier 2004, Hibbs & Dunn 1997, Spaargaren et al 2003). Die Lyn Kinase kann somit in einer Zelle in mehreren Signaltransduktionswegen involviert sein, die sogar konträr wirken können.

Fc ϵ -Rezeptor: Die Aktivierung dieses Rezeptors führt zu einer Kaskade intrazellulärer biochemischer Ereignisse, die zur Sekretion von pharmakologischen Agenzien, wie Zytokinen, Chemokinen und Leukotrienen und zur erhöhten Transkription von Zytokinen führt. Dies spielt eine wichtige Rolle bei immunologischen, anaphylaktischen Reaktionen der Makrophagen (Kovarova et al 2001, Tkaczyk & Gilfillan 2001, Tolar et al 2004). Die Aktivierung des Fc ϵ -Rezeptors führt zu einer Aktivierung der Lyn Kinase, wodurch weitere Proteine aktiviert werden, wie z.B. die Syk Kinase. Sowohl die β -, als auch die γ -Untereinheiten des Fc ϵ -Rezeptors werden

phosphoryliert und können dann ihrerseits Substrate binden. (Hibbs & Dunn 1997, Honda et al 2000, Tolar et al 2004).

1.5.3.2 Funktionen im Nervensystem

Die Lyn Kinase Expression im ZNS wurde erstmals 1992 beschrieben (Umemori et al 1992). Im ZNS wird die Lyn Kinase in vielen verschiedenen Gehirnabschnitten exprimiert, wie z.B. im Prosencephalon, Telencephalon und im Cerebellum (Chen et al 1996). Die Expression der Lyn Kinase wurde im zentralen Nervensystem in Mikroglia (Katsura et al 2006), Oligodendrozyten (Kramer et al 1999) und Neuronen (Hayashi et al 1999) nachgewiesen.

In Neuronen sind 1-2% der Lyn Kinasen mit dem AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoaxole-propionate)-Rezeptor assoziiert, der zu den Glutamat-Rezeptoren des ZNS gehört (Hayashi et al 1999). Er besteht aus vier Untereinheiten, GluRA, -B, -C und -D und bildet einen Liganden-gesteuerten Kationenkanal (Palmer et al 2005) (1.6). Jede Untereinheit besteht aus vier Transmembran Domänen. Die GluRB Untereinheit ist mit einer intrazellulären Region zwischen vierter Transmembran-Domäne und C-Terminus mit der SH3-Domäne der Lyn Kinase dauerhaft assoziiert. Diese Assoziation führt zu einer schnellen Lyn Kinase Aktivierung nach Stimulierung des AMPA Rezeptors, die unabhängig vom Kationenkanal des Rezeptors ist (Hayashi et al 1999). Als Folge der Aktivierung von Lyn wird die MAPK-Kaskade (mitogen-activated protein kinase) aktiviert, sowie der PI3K (phosphoinositide-3-kinase) Signaltransduktionsweg. Dadurch wird die Transkription der BDNF mRNA erhöht, als auch BDNF Protein in den synaptischen Spalt ausgeschüttet (Abb.7) (Hayashi et al 1999, Wu et al 2004). BDNF beeinflusst die synaptische Plastizität (Thoenen 1995), außerdem wirkt BDNF gegen Glutamat-abhängige Exzitotoxizität indem es an den TrkB-Rezeptor (tyrosin kinase B receptor) bindet (Jiang et al 2003, Wu et al 2004).

Die Lyn Kinase ist außerdem in der Post-Synapse mit PSD-95 (postsynaptic density) assoziiert, dass seinerseits zu einem großen Prozentsatz mit dem NMDA-Rezeptor (n-methyl-d-aspartate receptor) assoziiert ist. Lyn könnte also auch an der Regulation des NMDA-Rezeptors beteiligt sein (Kalia & Salter 2003).

Die Lyn Kinase spielt außerhalb von Neuronen eine Rolle bei der PDGF-Rezeptor-abhängigen Migration von Glioblastoma-Zellen. Glioblastoma sind maligne Tumoren des Gehirns, die sich aus Gliazellen entwickelt haben. Lyn Kinase Aktivität ist in

diesen Tumoren im Gegensatz zu normalen Gewebe signifikant erhöht (Ding et al 2003, Stettner et al 2005).

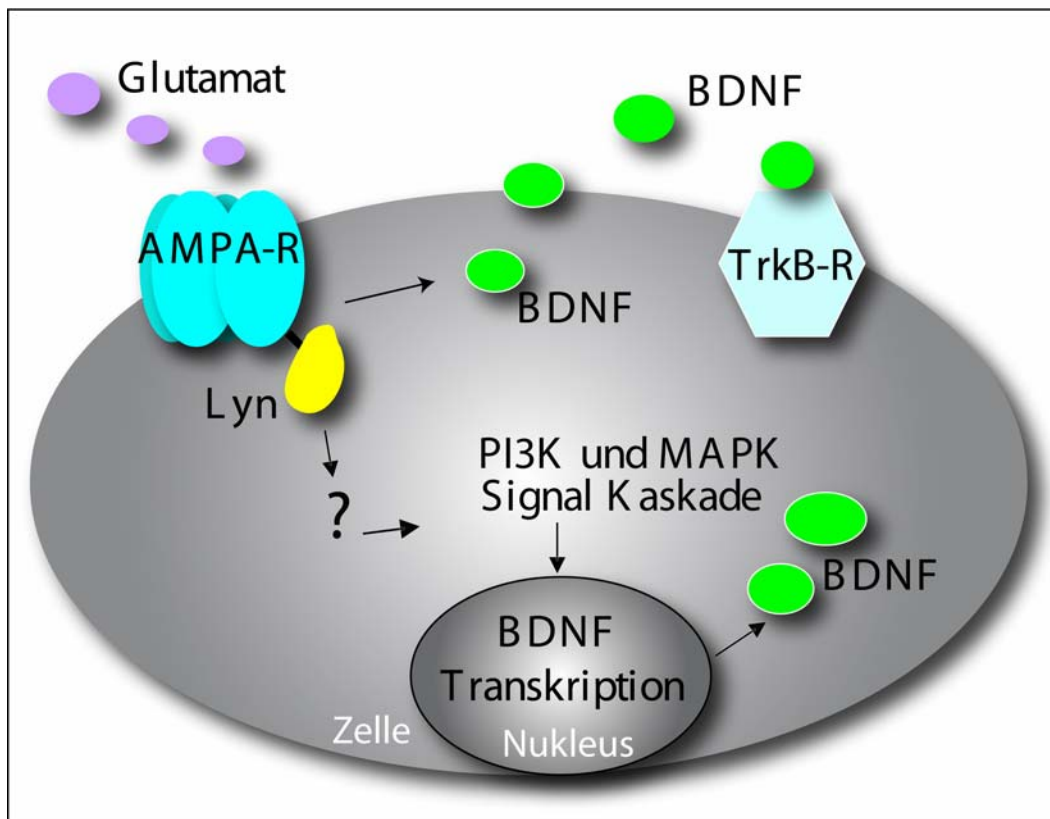


Abbildung 7: Die Lyn Kinase abhängige Aktivierung der MAPK und PI3K Signal Kaskaden

Die Stimulierung des AMPA Rezeptors mit Glutamat in Neuronen führt zu einer Erhöhung der BDNF Transkription, sowie zur Freisetzung von BDNF Protein in den synaptischen Spalt. BDNF führt dann zur Aktivierung des TrkB Rezeptors. Zeichnung nach Artikeln von (Hayashi et al 1999, Wu et al 2004).

1.5.4 Lyn Kinase in Oligodendrozyten

Die Lyn Kinase wird, wie auch die Fyn Kinase, in murinen Oligodendrozyten exprimiert. Sie sind, gemeinsam mit NCAM (120kD) und F3, in den *rafts* der Oligodendrozyten und im Myelin lokalisiert, allerdings kann eine stabile Assoziation nur zwischen der Fyn Kinase, F3 und NCAM 120 festgestellt werden. Neben der Lokalisation von Fyn und Lyn in *rafts*, ist auch eine Lokalisation in Bereichen detektierbar, die sich außerhalb der *rafts* befinden. Die Expression der Lyn Kinase ist hauptsächlich im Myelin junger Mäuse nachweisbar und nimmt im Myelin von 12-Tage alten Mäusen (P12) stark ab. Die Aktivität der beiden Src-Kinasen ist, abhängig von der Entwicklung der Oligodendrozyten, reguliert. Die Aktivität ist sowohl bei der

Lyn, als auch bei der Fyn Kinase während der Initiierung der Myelinisierung in den Zellen am stärksten (bei der Lyn Kinase: P9-P12) (Kramer et al 1999).

Für beide Src-Kinasen ist in Oligodendrozyten eine Assoziation mit Integrinen beschrieben, die die Proliferation bzw. Überlebensrate durch Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren regulieren (Colognato et al 2004). Oligodendrozyten exprimieren $\alpha V\beta 1$, $\alpha V\beta 3$, $\alpha V\beta 5$ und $\alpha 6\beta 1$ -Integrine (French-Constant & Colognato 2004). Lyn Kinase ist mit $\alpha V\beta 3$ -Integrin assoziiert und in die PDGF-stimulierte Proliferation von Oligodendrozyten Vorläuferzellen involviert. Eine Aufgabe in der Migration konnte nicht festgestellt werden. Eine Assoziation der Lyn Kinase und dem PDGF-Rezeptor war nach Stimulierung mit PDGF und/oder Wachstum der Zellen auf Fibronektin, dem Liganden des $\alpha V\beta 3$ -Integrins, am stabilsten. Fibronektin ist ein extrazelluläres Glykoprotein und dient als Adhäsionsmolekül für Zellen. Fibronektin konnte auch die Assoziation zwischen Lyn Kinase und $\alpha V\beta 3$ -Integrin verstärken. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Aktivität der Lyn Kinase in Oligodendrozyten hauptsächlich über die Phosphorylierung/ Dephosphorylierung des Tyrosin (Y397) in der Autophosphorylierungsschleife reguliert wird und nicht durch den Phosphorylierungszustand des Tyrosin (Y508) am regulatorischen Schwanz (Colognato et al 2004). In differenzierteren Oligodendrozyten ist die Fyn Kinase mit $\alpha 6\beta 1$ -Integrin assoziiert und beeinflusst die Überlebensrate und die Differenzierung. Ligand des $\alpha 6\beta 1$ -Integrin ist Laminin2, ein extrazelluläres Glykoprotein, das auf Axonen exprimiert wird. Die Differenzierung der Oligodendrozyten konnte durch die Reduktion der Fyn Kinase Expression in den Zellen gehemmt werden, jedoch nicht durch die Reduktion der Lyn Kinase Expression (Colognato et al 2004) (Abb.8).

Src-Kinasen in Oligodendrozyten sind außerdem in die Signaltransduktionswege des IGF-I-Rezeptors (Insulin-like-growth Factor I) involviert, der Glutamat-abhängige Apoptose in Oligodendrozyten über die PI3K-Signal-Kaskade verhindert und die Regeneration von Oligodendrozyten fördert. IGF-I-Rezeptor Aktivierung fördert in EAE (experimental allergic encephalomyelitis) die Regeneration des Myelins. Durch Inhibierung der Src-Kinase Familie in Oligodendrozyten kann der Signaltransduktionsweg des IGF-I-Rezeptors unterbrochen werden, indem das Protein Akt nicht aktiviert wird. Dies führte zu einer Erhöhung der Apoptose in Oligodendrozyten (Cui et al 2005).

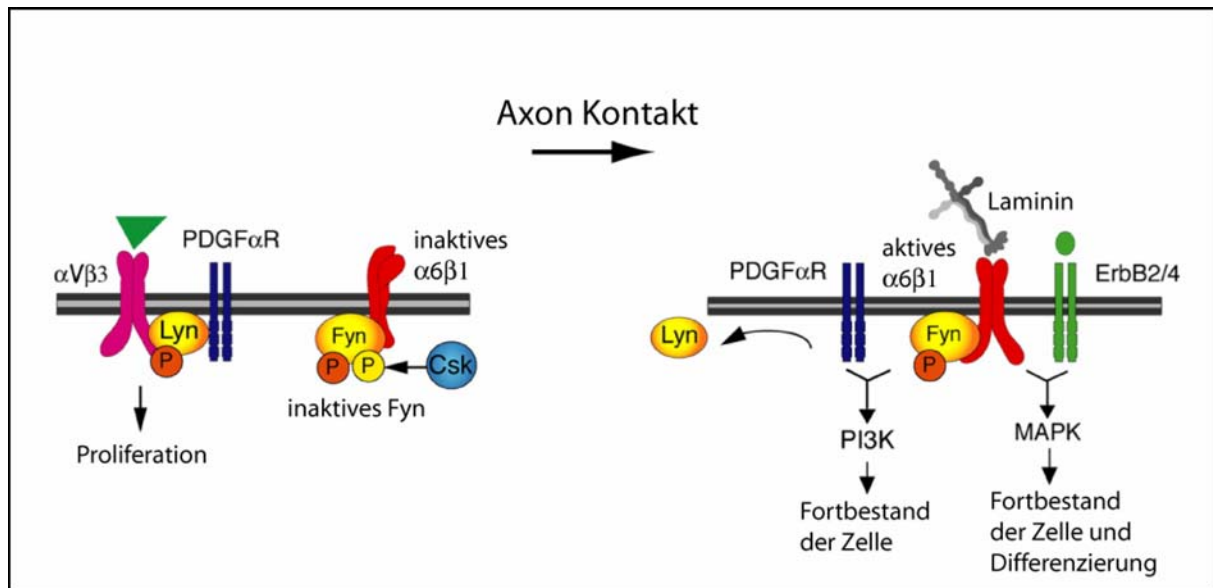


Abbildung 8: Regulation der Src-Kinasen Lyn und Fyn durch Integrine während der Oligodendrozyten Entwicklung (übersetzte Zeichnung von (Colognato et al 2004)).

Lyn ist mit dem PDGF-Rezeptor- $\alpha V\beta 3$ -Integrin Komplex assoziiert und wird durch $\alpha V\beta 3$ -Integrin aktiviert. Hierdurch wird die Proliferation gefördert. Fyn verbleibt in einem inaktiven Stadium. Nach axonalem Kontakt (Laminin), dissoziiert Lyn aus dem Komplex und Csk wird herunterreguliert. Fyn befindet sich im Komplex mit dem $\alpha 6\beta 1$ -Integrin und wird aktiviert. Das aktive Fyn aktiviert dann, abhängig vom PDGF-Rezeptor bzw. dem ErbB2/4-Rezeptor die PI3K bzw. MAPK Kaskaden. Dies führt zum Fortbestand, also einer erhöhten Überlebensrate, der Oligodendrozyten, zur Differenzierung und Bildung von Myelin (Colognato et al 2004).

1.6 AMPA Rezeptor in Neuronen und Gliazellen

In Neuronen ist bereits bekannt, dass die Lyn Kinase mit dem AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoaxole-propionate)-Rezeptor assoziiert ist (Hayashi et al 1999). Unsere Untersuchungen der Lyn Kinase in Oligodendrozyten führten dazu, dass der AMPA-Rezeptor immer mehr in den Fokus unserer Experimente gelang. Aus diesem Grund soll der AMPA-Rezeptor hier kurz vorgestellt werden.

Der AMPA-Rezeptor gehört neben dem NMDA-Rezeptor und dem Kainat-Rezeptor zu den ionotropen Glutamat-Rezeptoren des ZNS (Hayashi et al 1999) und ist mit seinem Liganden-gesteuerten Kationenkanal einer der wichtigsten excitatorischen Neurotransmitter im zentralen Nervensystem. Er besteht aus vier Untereinheiten, Glutamat-Rezeptor (GluR) A, -B, -C und -D (Mayer 2006). Der Kationenkanal ist für Na^+ und Ca^{2+} durchlässig und der Ionen-Einstrom bewirkt eine excitatorische postsynaptische Erregungsweiterleitung (Mayer 2005, Mayer & Armstrong 2004). Der Einstrom von Ca^{2+} kann außerdem sekundäre Botenstoffe aktivieren (Michaelis 1998). Die Untereinheiten besitzen vier hydrophobe Domänen, die an der Membran assoziiert sind. Die erste, dritte und vierte Domäne durchspannen die Membran,

wohingegen die zweite Domäne eine Schlaufe innerhalb der Membran formt und so einen Teil des Kationen-Kanals bildet. Der N-Terminus und die Schlaufe zwischen dritter und vierter Domäne sind extrazellulär und besitzen die Bindungssequenzen für Agonisten, wie Glutamat und AMPA, und allosterische Modulatoren, wie Aniracetam. Der C-Terminus liegt intrazellulär und interagiert mit Proteinen, wie GRIP (glutamate receptor interacting protein) oder der Lyn Kinase (Braithwaite et al 2000, Gouaux 2004, Kew & Kemp 2005). Die Untereinheiten besitzen zwei Regionen in denen alternatives Splicing vorkommt, wodurch das C-terminale Ende eine unterschiedliche Länge aufweist, bzw. im extrazellulären Bereich flip oder flop Varianten zu finden sind. Hierdurch ist die Desensitisierung modifiziert (Stensbol et al 2002). Die GluRB Untereinheit kann zusätzlich ein RNA-Editing von Glutamin zu Arginin an Position 607 haben, die eine verringerte Permeabilität des Ionenkanals für Ca^{2+} mit sich bringt (Palmer et al 2005).

Während der AMPA Rezeptor in Neuronen für die exzitatorische Erregungsweiterleitung in Synapsen bekannt ist, wurde die Expression dieses Rezeptor auch in Gliazellen (Astrozyten, Oligodendrozyten, Mikroglia) festgestellt und ist für die Neuron-Glia Kommunikation wichtig (Gallo & Ghiani 2000, Steinhauser & Gallo 1996). In undifferenzierten Oligodendrozyten wird der AMPA-Rezeptor exprimiert (Bergles et al 2000, Borges & Kettenmann 1995, Gallo et al 1996). Dessen Stimulierung mit Glutamat hemmt die Proliferation und Differenzierung der Zellen. Diese Inhibierung erfolgt über eine Na^+ abhängige Blockade von K^+ -Kanälen (Gallo et al 1996, Yuan et al 1998). Der AMPA-Rezeptor ist in einem Komplex mit NG2 und GRIP1 nachweisbar (Stegmuller et al 2003) und scheint hier in der Migration eine Rolle zu spielen (Trotter 2005). Im Komplex mit PLP und Integrin αV beeinflusst der AMPA Rezeptor ebenfalls die Migration, indem die Adhäsion der Zellen nach Stimulierung des Rezeptors reduziert ist (Gudz et al 2006). Je nach Konzentration, kann Glutamat allerdings auch exzitotoxisch wirken, indem die Ca^{2+} Konzentration der Zelle ein kritisches Level erreicht. Dies kann bei mehreren neurodegenerativen Krankheiten eine Rolle spielen (Matute et al 2006).

Neben dem AMPA-Rezeptor, werden auch der NMDA-Rezeptor und Kainat-Rezeptor in Oligodendrozyten und im Myelin exprimiert (Karadottir et al 2005, Micu et al 2006).

1.7 Zielsetzung dieser Arbeit

Die Bildung, Aufrechterhaltung und Funktionalität von Zellen und komplexen Geweben Bedarf einer präzisen Regulation von Ereignissen wie Migration, Proliferation, Differenzierung und Apoptose von Zellen.

Es ist bekannt, dass die Lyn Kinase in Oligodendrozyten exprimiert wird, teilweise innerhalb von *rafts* in der Plasmamembran verankert ist und die Expression und Aktivität hauptsächlich im Myelin junger Mäuse zu detektieren ist. Die Lyn Kinase bildet mit dem PDGF-Rezeptor und Integrin $\alpha V\beta 3$ einen gemeinsamen Komplex, der in der Regulation der Proliferation von Bedeutung ist (Cognato et al 2004, Kramer et al 1999).

Da Src-Kinasen jedoch in vielen unterschiedlichen Signalwegen eine Rolle spielen, sollte die Lyn Kinase in Oligodendrozyten weitergehend untersucht werden.

Die zeitliche Expression der Lyn Kinase wurde *in vitro* und *in vivo* in Oligodendrozyten und im Myelin untersucht. Diese Charakterisierung der Lyn Expression sollte Aufschluss darüber geben, in welchem Entwicklungsstadium der Oligodendrozyten Lyn eine funktionelle Rolle übernehmen könnte.

Die Manipulation der Aktivität der Lyn Kinase in Oligodendrozyten durch Transfektion aktiver und inaktiver Konstrukte, sollte einen weiteren Beitrag zur Aufklärung der Funktion geben.

Außerdem wurden Co-Immunpräzipitationen durchgeführt, um mögliche Bindungspartner der Lyn Kinase aufzuzeigen und die Signalkaskade konkret anhand von interagierenden Proteinen nachzuweisen.

Die Aktivierung des assoziierten Rezeptors mit einem Agonisten sollte weiteren Einblick in die Aktivierung und Funktion der Lyn Kinase geben.

2 Material

2.1 Tiere

Es wurden Mäuse der Zuchtlinie NMRI (Naval Medical Research Institute) für die Präparation der primären Oligodendrozyten, sowie für die Myelin-Präparation und die Gehirnschnitte verwendet. Die Mäuse wurden zu Beginn des Projekts aus dem Tierstall der Universität Heidelberg und ab April 2003 aus dem Tierstall der Universität Mainz bezogen.

2.2 Geräte, Verbrauchsmaterialien und Reagenzien

Acros	β -Mercaptoethanol, MgSO_4
AMAXA Biosystems	AMAXA Elektroporationssystem NukleofektorII, Basic Nukleofektor-Kit „Primary neurons“
Amersham Biosciences	Hybond-P-PVDF-Membran (Porengröße 0,45 μm), Hyperfilm ECL; Protein-A-Sepharose TM CL-48, ATP ³² , S ³⁵ -Cystein, -Methionin, Photometer Ultrospec 2100 pro
Applichem	Ampicillin
Beckmann	Optima TM MAX-E Ultrazentrifuge (Rotor TLA-55, TLS55), Optima L-70 Ultrazentrifuge (Rotor SW40Ti, YA20/1)
Biochrom	Pferdeserum (<i>horse serum</i>)
Biometra	PCR-Gerät Thermocycler T3
Bio-Rad Laboratories GmbH	Bio-Rad Protein Assay Farbstoff-Konzentrat, Elektroporator Gene Pulser Xcell
Calbiochem	Moviol 4-88 <i>Reagent</i>
Fisher Scientific	HCl (37%)
Fermentas	CIPase, CIP-Puffer
Fluka	Paraformaldehyd; Na_2SO_4
Heraeus	Biofuge fresco (Rotor: 75003328), Biofuge 17RS (Rotor: 1387), Megafuge 1.0R (Rotor: 2704)
Invitrogen	Agarose, <i>Bench Mark Prestained</i> , BME, DMEM, Gentamycin, HBSS, <i>Bench Mark Unstained</i> , L-Glutamin, Trypsin, L-Glutamat, RPMI1640, Penicillin, Streptomycin
Invitrogen NuPAGE	Acrylamid-Gele (4-12%)
Leika	Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop Leica® (Typ: DMRE), Fluoreszenzmikroskop Leica®-DMLB, Inverses Mikroskop

	Leika®-DMIL, Vibratom VT1000S
Linaris	Meerschweinchen-Komplement
Menzel	Deckgläser
Merck Biosciences	α -D-Glucose; Borsäure; EDTA; Bromphenolblau; Essigsäure, Trichloressigsäure (TCA)
Millipore	<i>Bottle-Top</i> -Filter (150ml, 500ml)
National diagnostics	30% Acrylamid / Bisacrylamid-Lösung
New England Biolabs	MgSO ₄ , BamHI Restriktionsenzym, BamHI-Puffer, Sall Restriktionsenzym, NEBIII Puffer
Nunc	Plastikware (Zellkultur), Napfplatten (24 Vertiefungen)
Pierce	Super Signal® West Pico Luminol / <i>Enhancer Solution</i> , Protein-Assay
Promega	Nuklease-freies H ₂ O, pGEMt Puffer, Maxi-Präparationskit, Mini-Präparationskit, PCR-Aufreinigungs-Kit, Gel-Aufreinigungs-Kit, Ligase, Ligase-Puffer
Roche	Dnase I, dNTP's
Roth	CaCl ₂ , Ethanol, Glycin, Hepes-Puffer, MgCl ₂ , Methanol, NaOH, Sukrose, KCl, Glycerin; KH ₂ PO ₄ ; NaCl; Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O; NaHCO ₃ ; Magnesiumacetat; Hepes; SDS; Isopropanol; Tween20; TCA, Chloroform, MnCl ₂ x4H ₂ O, Tris, Glycin, 1,4-Dithiothreit (DTT), Agar-Agar, Trypton, Hefe-Extrakt
Sarstedt	Einmalplastikwaren, Zellschaber; Reaktionsröhren (15ml, 50ml); Zellkulturschalen
Serva	TEMED; Phenolrot; Ammoniumperoxiddisulfat, BSA, SDS, NaF
Sigma	Laborzentrifuge 3K20 (Rotor 12159-H), Phosphoimager Eraser Raytest
Sigma Aldrich	Digitonin, Insulin, Jodacetamid, Leupeptin, Poly-L-Lysin, Progesteron, Putrescin, L-Thyroxin; Triton-X100, Aprotinin, NaN ₃ , Ponceau-S, Aniracetam, Natriumvanadat, Deoxycholat (DOC), Hoechst H33258 (DAPI), Red Taq Polymerase, Red Taq-Puffer
Tebu-Bio	PDGF, bFGF
VWR	Bromphenolblau-Natriumsalz, Reaktionsgefäße (-80°C), Deckgläser, DMSO, Einmalspritzen, Whatman-Papier, Objektträger, Pasteurpipetten

2.3 Lösungen, Puffer und Medien

Agarplatten-Lösung	1,5% Agar-Agar in LB-Medium
APS	10% Ammoniumperoxodisulfat in H ₂ O
Blocklösung (<i>in vitro</i> Färbung)	BME + 10% HS
Blockpuffer (Western Blot)	PBST mit 4% (w/v) Milchpulver
BME/10%HS	9,34g/l BME; 2,2g/l NaHCO ₃ ; 2,24g/l α -D-Glucose; 10000i.u./l Penicillin; 10000i.u./l Streptomycin; 2mM L-Glutamin; 10% HS
Coomassie-Entfärbelösung	10% Isopropanol ; 10% Essigsäure
Coomassie-Färbelösung	50%Methanol/10%Essigsäure/0,1% Coomassie blue R250/dH ₂ O
DNase-Lösung, 0,5%	0,5%DNase/HBSS pH6,8
Einfrier-Medium	20%FCS, 70%RPML, 10%DMSO
Fixier-Lösung	4% Paraformaldehyd in PBS
HBSS	4,0g/l KCl; 0,6g/l KH ₂ PO ₄ ; 80g/l NaCl; 1,13g/l Na ₂ HPO ₄ x2H ₂ O; 10g/l α -D-Glucose; 100mg/l Phenolrot
HBSS+	zu 98,5ml HBSS- werden 1,5ml einer 10%igen MgSO ₄ -Lösung gegeben
Kinase Puffer	10mM HEPES (pH7,4), 5mM MgCl ₂ , 1mM Mn Cl ₂ , 100 μ M Na ₃ VO ₄ , 10mM NaF in PBS
Laufpuffer (10x)	250mM Tris/HCl; 1,9M Glycin; 1% SDS (pH 8,8)
LB-Medium	1% Trypton, 0,5% Hefe Extrakt, 1% NaCl in dH ₂ O
Moviol	20% Moviol + 1 Teil Glyzerin und 1 Teil dH ₂ O
NaN ₃ -Lösung	20% NaN ₃ in dH ₂ O
Paraformaldehyd, 4%	4% Paraformaldehyd in dH ₂ O
PBS	150mM NaCl; 80mM Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O; 17mM NaH ₂ PO ₄ x 2 H ₂ O; pH = 7,4
Permeabilisierungs-Lösung (<i>in.vivo.</i> Färbung)	0,05%Tx100 in PBS
Blocklösung (<i>in vivo</i> Färbung)	5%NGS (goat serum)/0,1%Tx100 in PBS
PBS/1%NGS /0,1%Tx100	1%NGS (goat serum)/0,1%Tx100 in PBS
PBST	1xPBS mit 0,1% Tween20
Permeabilisierungslösung (<i>in vitro</i> Färbung)	0,1% TritonX-100 in PBS

Poly-L-Lysin	0,01% (w/v) PLL (entspricht 200mM); 0,1M Borsäure in dH ₂ O
Ponceau S	0,2% (w/v) Ponceau S in 3% (w/v) TCA
Probenpuffer (4x)	1M Tris/HCl; 20ml β-Mercaptoethanol; 40ml Glyzerin; 9,2g SDS; 2-3 Spatelspitzen Bromphenolblau; ad 100ml dH ₂ O (pH 6,8)
Proteaseinhibitoren	Leupeptin [10mg/ml] in H ₂ O; Aprotinin [1mg/ml] in 1mM Hepes (1:1000); PMSF [17,4 mg/ml] in Methanol (1:100), Jodacetamid (1mg/ml) in H ₂ O
Protein-A-Sepharose-Lösung	300mg PAS/10ml Tx100 Lysis Puffer
RIPA Puffer	50mM Tris (pH7,2 mit HCl), 150mM NaCl, 1% Tx100, 1% DOC (Deoxycholat), 0,1% SDS, 1mM DTT
Sammelgelpuffer	0,5M Tris/HCl; 0,4% SDS (pH 6,8)
Sato Medium	13,4g/l DMEM; 0,2g/l NaHCO ₃ ; 0,01mg/ml Transferrin; 0,01mg/ml Insulin; 200nM Progesteron; 100μM Putrescin; 220nM Natriumselenit; 500nM Triiodo-L-Thyronin (T3); 500nM L-Thyroxin (T4); 25μg/ml Gentamycin; 1% hitzeinaktiviertes Pferdeserum
Sukrose	10,5% und 30% in dH ₂ O
Sukrose	5, 30, 80%, 5mM EDTA, 1mM PMSF in PBS
TAE	0,04M Tris, 1mM EDTA, 5,71% Essigsäure in dH ₂ O
Transferpuffer	24mM Tris; 20% Methanol; 192mM Glycin (pH 10,4) in H ₂ O
Trenngelpuffer	1,5M Tris/HCl; 0,4% SDS (pH 8,8)
Triton-Lysis-Puffer	1% Triton-X100; 50mM Tris; 150mM NaCl
Trypsin/EDTA	0,1% (w/v) Trypsin; 0,02% EDTA in HBSS
Trypsin-Lösung, 1%	1%Trypsin (2,5% Lösung in PBS)/HBSS pH7,8 mit NaOH

2.4 Antikörper

2.4.1 Polyklonale Antikörper

<u>Spezifität / Epitop</u>	<u>Name des Antikörpers</u>	<u>Spezies</u>	<u>Verdünnungen</u>	<u>Hersteller / Referenz</u>
EGFP	EGFP	Kaninchen	1:2000 (WB)	Gentaur
GluRB/C	GluR2/3	Kaninchen	1:50 (WB) 1:10 (IP)	Chemicon Int.
Lyn	Lyn (sc-15)	Kaninchen	1:1000 (WB) 1:100 (IP)	Santa Cruz Biotech. Inc.
Lyn	Lyn	Kaninchen	1:100 (IF)	Upstate Biotech.

pY418	SrcpY418	Kaninchen	1:1000 (WB) 1:100 (IF)	Biosource
β -Aktin	Aktin	Kaninchen	1:1000 (WB) 1:100 (IF)	Sigma

WB = Western Blot; IF = Immunfluoreszenz; IP = Immunpräzipitation

2.4.2 Monoklonale Antikörper

<u>Spezifität / Epitop</u>	<u>Name des Antikörpers</u>	<u>Spezies</u>	<u>Verdünnungen</u>	<u>Hersteller / Referenz</u>
α -Tubulin	α -Tubulin (DM1A)	Maus	1:5000 (WB)	Sigma
CNPase	CNPase	Maus	1:500 (WB) 1:100 (IF)	Sigma
Fyn	Fyn	Maus	1:500 (WB) 1:50 (IF)	BD Transduction Laboratories
Galakto-cerebrosid	O1	Maus	1:50 (IF)	(Sommer & Schachner 1981)
GFAP	GFAP (G-A-5)	Maus	1:10000 (WB)	Boehringer
L1	324	Ratte	1:10 (IF)	Chemicon int.
L1	555	Ratte	1:200 (WB)	(Lindner et al 1983)
Lyn	Lyn (H6)	Maus	1:500 (WB)	Santa Cruz Biotech., Inc.
MAG	513	Maus	1:500 (WB) 1:50 (IF)	Chemicon Int.
MOG	8-1805	Maus	1:500 (WB) 1:100 (IF)	Linnington Labor
NCAM	BSP-2	Ratte	1:100 (WB) 1:10 (IF)	Abcam
NG2	AN2	Ratte	1:200 (WB) 1:20 (IF)	(Niehaus et al 1999)
PLP	O10	Maus	Unverdünnt (IF)	(Kuhlmann-Krieg et al 1988)
Sulfatid	O4 (81)	Maus	1:50 (IF)	(Sommer & Schachner 1981)

WB = Western Blot; IF = Immunfluoreszenz; IP = Immunpräzipitation

2.4.3 Sekundäre Antikörper

<u>Name des Antikörpers</u>	<u>gekoppelte funktionelle Gruppe</u>	<u>gegen Spezies</u>	<u>Verdünnungen</u>	<u>Hersteller</u>
goat α mouse-Cy2	Cy2	Maus	1:100 (IF)	Dianova
goat α mouse-Cy2 spez.	Cy2	Maus	1:50 (IF)	Dianova
goat α mouse-Cy3	Cy3	Maus	1:100 (IF)	Dianova

goat α mouse-HRP	HRP	Maus	1:10000 (WB)	Dianova
goat α rat-Cy2	Cy2	Ratte	1:50 (IF)	Dianova
goat α rat-Cy3	Cy3	Ratte	1:50 (IF)	Dianova
goat α rat-Cy3 spez.	Cy3	Ratte	1:800 (IF)	Dianova
goat α rat-HRP	HRP	Ratte	1:10000 (WB)	Dianova
goat α rb-Cy3	Cy3	Kaninchen	1:800 (IF)	Dianova
goat α rb-Cy2	Cy2	Kaninchen	1:50 (IF)	Dianova
goat α rb-HRP	HRP	Kaninchen	1:10000 (WB)	Dianova

WB = Western Blot; IF = Immunfluoreszenz

HRP = *Horseradish peroxidase* (Meerrettich Peroxidase)

2.5 Primer Sequenzen, Plasmide und Software

Plasmide:

LynAwt-GFP-pSFV, LynBwt-GFP-pSFV, LynK279R-GFP-pSFV, Lyn Δ KD-GFP-pSFV, LynY508F-GFP-pSFV von P. Draber, Karls-Universität Prag (Arudchandran et al 1999, Kovarova et al 2001, Tolar et al 2004); pGEMt, Promega; pCMV (Cytomegalovirus plasmide) (Kramer-Albers et al 2006); EGFP-pCMV, Invitrogen

Primer, Sigma Genosys:

5'Lyn:

5'CGG ATC CGC CAC CAT GGG ATG TAT TAA ATC AAA AAG GAA AGA C 3'

3'GFP:

5'GAC GTC GAC TTA CTT GTA CAG CTC GTC C 3'

Software: AIDA (Advanced Image Data Analyzer) Ver. 4.11, Manual AIDA software, Raytest Isotopenmessgeräte GmbH; FireCam Ver. 1.7 and Application Suite Ver. 2.5.0, Leica ; GraphPad Prism Ver.4.00 for Windows, GraphPad Software; IPLab for Macintosh Ver. 3.2.4, Scanalytics Inc.; DNA Strider Classics 1.3f9, CEA

3 Methoden

3.1 Zellbiologische und histologische Methoden

3.1.1 Präparation primärer Oligodendrozyten

Die Präparation wurde nach (Trotter & Schachner 1989) durchgeführt.

Für die Präparation wurden die Gehirne von 14-16 Tage alten murinen Embryonen (E14-16) verwendet. Die Embryos wurden unter sterilen Bedingungen aus dem Uterus herauspräpariert und die von den Meningen befreiten Gehirne in HBSS+ auf Eis gesammelt. Anschließend wurden die Gehirne für 1min. mit 1%iger Trypsin-Lösung inkubiert, mit HBSS- gewaschen und in 0,5%iger DNase-Lösung dissoziiert. Diese Einzel-Zell-Suspension wurde bei 130g, 10min, 4°C zentrifugiert, zweimal mit BME/10%HS gewaschen und in einer Zelldichte von $3-3,5 \times 10^7$ Zellen/Zellkulturflasche (PLL-beschichtet, 80cm²) ausplattiert. Die Zellkultur wurde bei 37°C, 5% CO₂ kultiviert.

Nach 5 Tagen wurden die Neurone mittels einer Immunzytolyse abgetötet. Hierbei wurden die Zellen zunächst 5min. bei Raumtemperatur mit 358 Hybridoma Überstand (1:10) inkubiert. Dieser erkennt das Neuronen-spezifische Protein L1. Anschließend wurde für eine Stunde bei 37°C Komplement-aktives Meerschweinchen-Serum (1:15) zugegeben. Mikroglia und Makrophagen konnten durch leichtes schwenken und waschen aus der Kultur entfernt werden, da sie nur locker dem Zellrasen auflagen.

Die Oligodendrozyten Vorläuferzellen lagen den adhärenteren Astrozyten auf und konnten nach zehn Tagen abgeschüttelt werden. Die Zellsuspension wurde bei 130g, 10min, 4°C abzentrifugiert und auf PLL-beschichtete 6cm Kulturschalen (4×10^6 Zellen) oder 11 mm Deckgläsern (1×10^5 Zellen) in Sato/1%HS Medium (Bottenstein & Sato 1979) modifiziert nach (Trotter & Schachner 1989) ausplattiert. Dem Medium wurde direkt und nach 24 Stunden PDGF (10ng/ml) und bFGF (basic fibroblast growth factor) (5ng/ml) zur Steigerung der Überlebens- und Proliferationsrate der Oligodendrozyten Vorläuferzellen beigelegt (Bogler et al 1990).

Für Immunpräzipitations- und Glutamat Rezeptor B Aktivierungs-Experimente, die eine besondere Reinheit der Oligodendrozyten Kultur voraussetzten, wurde nach weiteren zwei Tagen erneut eine Neuronen Immunzytolyse wie oben beschrieben durchgeführt. PDGF und bFGF wurden erneut zum Medium gegeben.

Drei Tage nach der Separierung der Oligodendrozyten von den restlichen Gehirnzellen bzw. 1 Tag nach der zweiten Neuronen Immunzytolysen wurden die Experimente, wenn nicht anders beschrieben, durchgeführt.

Die Reinheit der Kulturen wurde mit Hilfe von Immunfluoreszenz-Färbungen überprüft, in denen Antikörper verwendet wurden, die spezifische Antigene von Neuronen (L1), Astrozyten (GFAP) und Oligodendrozyten (AN2, O4, MAG) erkannten.

Die primären Oligodendrozyten wurden mit 1%Tx100 Lysis Puffer (500µl/6cm Petrischale) lysiert, wenn nicht anders im Experiment beschrieben.

3.1.2 Zelllinie Oli-*neu*

Diese Zelllinie entstand durch die Infektion von primären murinen Oligodendrozyten mit replikationsdefekten Retroviren. Diese Viren wurden aus dem Medium-Überstand von Virus-produzierenden Zellen der Zelllinie GPE-*neu* gewonnen. Die Immortalisierung erfolgte durch ein MMLV-Vektorkonstrukt (moloney murine leukemia virus), das das Onkogen *t-neu* trug (Jung et al 1995).

Die Zellen wurden in Sato /1%HS kultiviert bis sie eine Dichte von ca. 70-90% erreichten, mittels 37°C warmen Trypsin/0,02%EDTA vom Untergrund gelöst und in kaltem BME/10%HS bei 4°C, 130g, 10min. abzentrifugiert. Anschließend wurden sie in der gewünschten Dichte in Sato/1%HS wieder auf Zellkultur-Flaschen/Petri-Schalen oder Deckgläsern ausgesät. Diese wurden vorher mit PLL für mindestens 30min. bei 37°C beschichtet und vor der Zell-Aussaat zweimal mit ddH₂O gewaschen.

Die Oli-*neu* Zelllinie wurde mit 1%Tx100 Lysis Puffer (500µl/6cm Petrischale) lysiert, wenn nicht anders im Experiment beschrieben.

3.1.3 Gehirn-Schnitte

Zur Fixierung des Gewebes wurde eine Perfusion durchgeführt. Hierbei wurden die Mäuse (P9) mit Chloroform betäubt, anschließend der Brustkorb geöffnet und die *Venae cavae* durchtrennt. Durch eine Injektion ins Herz wurde zuerst das Blut durch PBS im Blutgefäßsystem ersetzt und anschließend das PBS durch 4% Paraformaldehyd (PFA). Die Gehirne wurden aus dem Schädel entfernt und für 24h in 4% PFA, 4°C auf einem Schüttler zur weiteren Fixierung belassen. Anschließend wurden die Gehirne zur Stabilisierung in 3% Agarose mit niedrigem Schmelzpunkt

eingebettet und mit einem Vibratom Schnitte (40µm) hergestellt. Diese Schnitte wurden in PBS mit 0,5% NaN₃ bis zur Färbung aufbewahrt.

3.1.4 Zeitabhängige Prüfung von Protein-Expressionen

Bei dieser Methode sollte überprüft werden, ob die Expression von Proteinen, im Speziellen der Lyn Kinase, in Oli-neu Zellen zeitabhängig ist und ob unter verschiedenen Kultur-Bedingungen diese Zeitabhängigkeit Unterschiede aufweist. Durch die Passage der Zellen (2.8.2) wurden diese in ihrem Zellzyklus synchronisiert (Hill et al 1977, Schorl & Sedivy 2007), so daß die zeitabhängigen Expressionsmuster sichtbar gemacht werden konnten.

Für das Experiment wurden 6cm-Kulturschalen oder Napf-Platten-Vertiefungen mit 0,01% PLL für mindestens 30min. beschichtet und anschließend zweimal mit dH₂O gewaschen. Um die Oli-neu Zellen in Suspension zu halten wurden diese in unbeschichteten 15ml-Röhren aufbewahrt. Alle Zellen wurden in Sato/1%HS-Medium kultiviert. Die Zellen wurden direkt nach der Passage, nach 30min., 45min., 1, 2, 5, 10, 24, 30 und 48 Stunden, wenn nicht anders beschrieben, mit Tx100-Lysis Puffer lysiert (100µl/cm²) und die Lysate per Western Blot analysiert.

3.1.5 Glutamat Rezeptor B Aktivierung

Der AMPA Rezeptor, zu dem die Untereinheiten Glutamat Rezeptor (GluR) A, B, C und D gehören, kann durch das Substrat Glutamat aktiviert werden (Wu et al 2004) (1.6.1). In diesem Versuch sollten Veränderungen der Zelle aufgrund der AMPA Rezeptor Aktivierung untersucht werden, im Speziellen die Aktivität von Lyn und deren Einfluss auf die Zelle. Zur Hemmung der Desensitivierung des AMPA Rezeptors wurde 5min. vor der Aktivierung 1µM Aniracetam in das Sato-Medium der primären Oligodendrozyten gegeben. Die Aktivierung erfolgt mit 100µM bzw. 500µM Glutamat für 10min. zur Analyse der Lyn Aktivität und für 24h zur Analyse der Zelldifferenzierung. Danach wurde das Medium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und unmittelbar mit 1%Tx100 Lysis Puffer lysiert oder die Zellen für eine Immunfluoreszenz-Analyse fixiert. Als negativ Kontrollen wurden sowohl primäre Oligodendrozyten ohne Behandlung, als auch primäre Oligodendrozyten mit Aniracetam Behandlung verwendet.

Zur Detektion der Lyn Kinase Aktivität wurden die primären Oligodendrozyten nach der Behandlung mit Glutamat mittels Western Blot und mittels Immunfluoreszenz analysiert. Der Antikörper pY418 detektiert aktive Src-Kinasen, deren Tyrosin 418

(bei Lyn Kinase 397), phosphoryliert ist. Die Intensität dieser Aktivität wurde anhand der Detektionsbanden nach Entwicklung des Western Blot mit der Software AIDA analysiert. Die Detektion des Gesamtproteins der Lyn Kinase diente dazu, die Intensität der Aktivität gegenüber der Intensität der Expression zu normalisieren. Die statistische Auswertung fand mit der Software Graph Pad Prism statt. Als statistischer Test wurde One-way ANOVA gewählt, da eine Gruppe von Resultaten verglichen werden sollten, die auf denselben Zellen mit unterschiedlicher Behandlung basieren.

Um zu überprüfen, ob die Differenzierung von Oligodendrozyten nach Glutamat Behandlung beeinflusst ist, wurden primäre Oligodendrozyten nach der Behandlung mit Glutamat auf ihren Deckgläsern fixiert und wie in 2.11.7 beschrieben mit Oligodendrozyten-spezifischen Markern, angefärbt. Bei den Markern handelte es sich um NG2, ein Protein, dass in Oligodendrozyten Vorläuferzellen exprimiert wird, und um das Myelinprotein MAG, dass in differenzierten Oligodendrozyten exprimiert wird. Es wurden pro Experiment 500 Zellen pro Färbung ausgezählt. Die Signifikanz Unterschiede in der Anzahl der Zellen wurde mit dem Student's T-test statistisch ausgewertet und hierfür die Graph Pad Prism Software verwendet. Als negativ Kontrollen dienten nicht behandelte Zellen.

3.1.6 Transfektion der Lyn Konstrukte in Oli-*neu* Zellen und primären Oligodendrozyten

Die Transfektion fand durch Elektroporation statt. Hierbei wird ein elektrisches Feld erzeugt, dass die Zellmembran für kurze Zeit permeabel macht und so die Plasmide in die Zelle gelangen können. Diese werden dann in den Zellkern transportiert.

Bei der Transfektion der Oli-*neu* Zellen wurde pro Ansatz 300µl (Konzentration 5×10^6 Zellen/ml) Oli-*neu* in Sato/1%HS mit 10µg DNA in einer Elektroporationsküvette gemischt und mit dem Elektroporator transfiziert (Protokoll, Tabelle 3).

Anschließend wurden die Zellen auf PLL-beschichtete 6cm-Petrischalen ausplattiert. Die primären Oligodendrozyten wurden ebenfalls elektroporiert, jedoch mit dem AMAXA System. 100µl (Konzentration 4×10^6 Zellen) der Oligodendrozyten in Nukleofekt-Lösung wurden mit 1µg DNA gemischt, in einer AMAXA Küvette elektroporiert und anschließend in 3cm-Petrischalen ausplattiert (Protokoll, Tabelle 3).

Nach drei Tagen wurde die Transfektionseffizienz aufgrund der GFP-Fluoreszenz in Oli-*neu* Zellen und primären Oligodendrozyten überprüft und die Zellen entweder lysiert oder für Immunfluoreszenzfärbungen weiter verwendet.

Tabelle 3: Transfektion von Oli-*neu* und primären Oligodendrozyten mittels Elektroporation

Transfektion der Oli- <i>neu</i> Zellen	Transfektion der primären Oligodendrozyten
BioRad GenePulser Xcell 220V, 950µF, $\infty\Omega$, 4mm Küvette	AMAXA Nucleofector II Progamm O-005, 4mm Küvette (Nucleofector Kit)

3.1.7 Analyse der transfizierten Oli-*neu* Zellen und primären Oligodendrozyten

3.1.7.1 Auswertung der Zellausläuferlänge und -anzahl

Die transfizierten Oli-*neu* Zellen und primären Oligodendrozyten wurden mit Tubulin zusätzlich immungefärbt, unter dem Fluoreszenzmikroskop durch GFP identifiziert und die Anzahl und Länge der tubulinhaltigen Zellausläufer bei jeder Transfektion mit der IPLab Software bestimmt.

Sowohl die Anzahl als auch die Länge der Ausläufer wurde zwischen den unterschiedlich transfizierten Zellen verglichen und die Länge mit dem nicht-parametrischen Mann-Whitney Rank Sum Test analysiert. Dieser Test wurde gewählt, da angenommen werden muss, dass die Ausläufer-Längen-Verteilung keiner Normalverteilung nach Gauß folgt. Für die Anzahl der Ausläufer wurde der Student's t-test angewandt. Für die statistische Auswertung wurde die Software Graph Pad Prism verwendet. Als negativ Kontrollen dienten nicht transfizierte und mit EGFP-pCMV transfizierte Zellen, die ebenfalls mit Tubulin angefärbt wurden.

3.1.7.2 Auswertung der Oligodendrozyten Differenzierung

Die transfizierten Oli-*neu* Zellen und primären Oligodendrozyten wurden mit Oligodendrozyten-spezifischen Markern zusätzlich immungefärbt und unter dem Fluoreszenzmikroskop durch das GFP identifiziert und die Anzahl Marker-positiver Zellen bestimmt. Es wurden pro Experiment 500 transfizierte Zellen pro Transfektion und Färbung ausgezählt. Die Signifikanz der Anzahl der Zellen wurde mit dem Student's t-test statistisch ausgewertet und hierfür die Graph Pad Prism Software

verwendet. Als negativ Kontrollen dienten nicht transfizierte und mit EGFP-pCMV transfizierte Zellen, die ebenfalls mit NG2 bzw. MAG angefärbt wurden.

3.2 Biochemische Methoden

3.2.1 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung der Proteine wurde nach (Bradford 1976) mittels der BioRad Proteinassay nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Proben wurden soweit bei der Messung verdünnt, dass Detergenzien wie TritonX100 die Messung nicht mehr beeinflussen. BSA diente als Vergleichsprotein, mit der die Eichgerade ermittelt wurde.

3.2.2 Gelelektrophorese

Bei der Gelelektrophorese werden die Proteine in einem Polyacrylamid-Gel abhängig von ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Dies erfolgt aufgrund ihrer negativen Ladung im Puffer und einem elektrischen Feld, dass die Proteine durch das Gel Richtung positivem Pol wandern lässt, wobei kleinere Proteine schneller durch das Gel wandern können als Größere. Es wurde das diskontinuierliche Gelsystem nach (Laemmli 1970) verwendet.

Es wurden, je nach Experiment, Gele mit unterschiedlich hoher Acrylamid-Konzentration, sowie einfach-prozentige als auch Gradientengele verwendet (Tab.4). Neben selbst gegossenen Gelen wurden auch Gele von Invitrogen NuPAGE benutzt (4-12% Gradientengele).

Tabelle 4: Pipettierschema zur Erstellung von Polyacrylamid-Gelen:

	<u>Trenngel</u> <u>(ca. 15ml):</u>				<u>Sammelgel</u> <u>(ca.10ml):</u>
<u>Gelkonzentration</u>	7%	10%	12%	15%	
30% AA / 0,8% BA	3,5ml	5,0ml	6,0ml	7,5ml	1,7ml
Trenngelpuffer (pH 8,8) bzw. Sammelgelpuffer (pH 6,8)	3,8ml	3,8ml	3,8ml	3,8ml	1,25ml
10% SDS	150µl	150µl	150µl	150µl	100µl
H ₂ O	4,4ml	5,9ml	4,9ml	3,4ml	6,8ml
10% APS	150µl	150µl	150µl	150µl	100µl
TEMED	6µl	6µl	6µl	6µl	10µl

3.2.3 Western Blot

Beim Western Blot können die nach Größe aufgetrennten Proteine im Polyacrylamid-Gel auf eine PVDF-Membran übertragen (Jacobson & Karsnas 1990) werden. Diese können dann mittels Ponceau-S-Färbung oder mit protein-spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden. Es wurde sowohl die Semi-Dry-Blot Methode, als auch die Wet-Blot Methode verwendet.

Bei der Semi-Dry-Blot Methode hängt die mAmpere Zahl und die Dauer des Transfers von der Größe des Gels und dem Molekulargewicht der zu transferierenden Proteine ab. Wenn nicht anders beschrieben wurde der Transfer bei 250mA für 1h durchgeführt um Proteine mit einer Größe von bis zu 200kD aus einem 6x8cm Gel zu transferieren. 2h bei gleicher Amperezahl wurde benötigt, wenn es sich um ein 10x15cm Gel handelte.

Wet-Blot Methode: Diese Methode wurde ausschließlich in Zusammenhang mit dem Nupage System verwendet und ist aus diesem Grund standardisiert. Die Proteine in den Gelen wurden bei 30mV für 1h transferiert.

3.2.4 Radioaktive Markierung

Proteine wurden durch radioaktives Methionin und Cystein markiert, deren Schwefel Atom eine Atommasse von 35 besitzt und aufgrund dieser Atomkern-Instabilität mit einer Halbwertszeit von 87,5 Tagen zerfällt und dabei α -Strahlung freisetzt.

Die primären Oligodendrozyten wurden für 1 Stunde in Methionin-Cystein-freiem DMEM Medium überführt und anschließend 12h in DMEM-Medium mit radioaktiv markierten Methionin und Cystein (200 μ Ci) inkubiert. Die Zellen wurden anschließend für Immunpräzipitationen verwendet und nach elektrophoretischer Auftrennung durch Autoradiografie (Phosphoimager) analysiert.

3.2.5 Immunpräzipitation

Bei der Immunpräzipitation kann man Proteine selektiv durch Antikörper aus einem Lysat isolieren und diese, sowie assoziierte Proteine, anschließend per Western Blot detektieren.

300mg Protein-A-Sepharose quollen über Nacht in 10ml PBS, 4°C, wurden 2x mit Tx100 Lysis Puffer gewaschen und in 10ml Tx100 Lysis Puffer/0,01%NaN₃ aufgenommen. Primäre Oligodendrozyten wurden in Tx100 Lysis Puffer (1ml/6cm Petrischale) lysiert und anschließend mit 100 μ l/ml Protein-A-Sepharose für 1 Stunde

bei 4°C unter Rotation inkubiert. Bei dieser Vor-Inkubation sollen Proteine, die unspezifisch binden, aus dem Lysat entfernt werden. Anschließend wurde der Antikörper für 12h, 4°C unter Rotation zugegeben um sein Antigen aus dem Lysat zu binden. Der Antikörper-Antigen Komplex konnte dann mittels der Protein-A-Sepharose aus dem Lysat gebunden werden (1h, 4°C) und dieser Immunkomplex durch Zentrifugation vom Lysat getrennt. Um unspezifische Bindungen zu reduzieren wurden der Komplex 4x mit RIPA-Puffer gewaschen und einmal mit TBS. Anschließend wurde der Immunkomplex in 50µl 4x Probenpuffer aufgenommen und für 5min. bei 95°C erhitzt um das Antigen zu lösen.

Die Immunpräzipitationen wurden mittels Western Blot analysiert oder nach vorhergehender radioaktiver Markierung das Gel getrocknet und mit dem Phosphorimager ausgewertet.

3.2.6 Kinase Aktivitäts-Prüfung (radioaktiv)

Kinasen übertragen das γ -Phosphat von ATP auf ein Substrat um dieses zu aktivieren. Bei der Kinase Aktivitäts-Prüfung können Phosphorylierungen von Proteinen durch die Übertragung eines radioaktiv markierten γ -Phosphats sichtbar gemacht werden. Hierdurch kann die Aktivität einer Kinase überprüft, sowie die phosphorylierten Substrate sichtbar gemacht werden.

Die Immunpräzipitation oder die Raft Fraktion wurde hierfür in 50µl Kinase Puffer aufgenommen und 10µCi radioaktives ATP (P^{32} , Halbwertszeit 14 Tage, β -Emitter) dazugegeben. Anschließend wurden die Zellen 20min. bei 37°C inkubiert, zweimal mit Tx100-Lysis-Puffer gewaschen und mittels Autoradiografie analysiert.

3.2.7 Immunfluoreszenzfärbung

Bei der Immunfluoreszenzfärbung werden Proteine spezifisch angefärbt, indem man diese an Antikörper bindet und mit Fluoreszenz-Farbstoff-gekoppelten Zweit-Antikörpern inkubiert. Diese Farbstoffe können dann durch Licht bestimmter Wellenlänge angeregt und unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet werden.

3.2.7.1 *In vitro*

Primäre Oligodendrozyten und Oli-*neu* Zellen wurden auf gereinigten, PLL-beschichteten Deckgläsern (11mm) in Sato/1%HS ausgesät (1×10^4). Nach zwei Tagen wurden die Deckgläser zweimal mit PBS gewaschen, 10min. mit BME/10%HS blockiert und dann entweder sofort mit 4% Paraformaldehyd für 10min. fixiert oder

zuerst eine Lebendfärbung durchgeführt. Bei der Lebendfärbung wurde der erste Antikörper in BME/10%HS für 45min. auf die Zellen gegeben, zweimal mit PBS gewaschen und dann mit 4% Paraformaldehyd für 10min. fixiert um eine verbesserte Kopplung des Antikörpers an extrazelluläre Epitope zu ermöglichen. Nach der Fixierung wurden die Zellen 2min. mit 0,1% Tx100haltigem PBS permeabilisiert, mit PBS gewaschen und der Erst-Antikörper für intrazelluläre Epitope auf die Deckgläser gegeben und 45min. inkubiert. Bei der direkten Fixierung wurden die Erst-Antikörper für extra- und intrazelluläre Epitope gleichzeitig nach der Permeabilisierung auf die Zellen gegeben und 45min. inkubiert. In beiden Fällen wurden danach die Zellen mit PBS gewaschen und der Zweit-Antikörper für 30min. inkubiert, anschließend eine Zellkernfärbung mit DAPI für 2min. vorgenommen und die Zellen nach erneutem Waschen mit PBS und dH₂O mit Moviol auf Objektträgern eingebettet (Schnitzer & Schachner 1981).

3.2.7.2 *In vivo*

Die Gehirnschnitte wurden nach der „free-floating“ Methode gefärbt (Takahashi et al 1989) und hierfür nicht auf Deckgläsern fixiert, sondern in Napf-Platten-Vertiefungen gelegt. Die Gehirnschnitte wurden zweimal mit 0,05%TX100haltigem PBS gewaschen und anschließend 20min. mit PBS/5%NGS/0,01%Tx100 bei Raumtemperatur auf einem Schüttler blockiert bevor sie über Nacht mit dem ersten Antikörper in PBS/1%NGS/0,1%Tx100 bei 4°C auf einem Schüttler inkubierten. Die Gehirnschnitte wurden 3x15min. mit PBS/0,05%Tx100 gewaschen und anschließend mit dem Zweit-Antikörper in PBS/1%NGS/0,1%Tx100 für 2h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem 3xigen 15min. Waschschriff wurden die Schnitte für 15min. mit DAPI gefärbt und nochmals 2x 15min. gewaschen. Schließlich wurden die Gehirnschnitte in einem Becherglas mit PBS flach ausgebreitet und auf zweimal PLL-beschichtete Objektträger gezogen. Zur Reduktion störender Salzkristalle wurde der Objektträger mit dem Schnitt in dH₂O eingetaucht, angetrocknet, mit Moviol überschichtet und mit einem Deckgläschen überdeckt.

3.2.8 Myelin Isolierung

Zur Isolierung des Myelins aus Gehirnen wurden Mäuse im Alter P8, P12, P16, P20, P30, P60 getötet und deren Gehirne entnommen, indem das Fell vom Kopf präpariert und die Schädeldecke seitlich geöffnet wurde. Die entnommenen Gehirne wurden

auf Trockeneis schockgefroren und bei -80°C bis zur Myelin Aufreinigung aufbewahrt.

Die Myelin Isolierung aus Gehirnen erfolgte nach bekannten Protokollen (Norton & Poduslo 1973). Die Gehirne wurden in 10,5% Sukrose in PBS homogenisiert und anschließend 45min., bei 17000g zentrifugiert (Beckman, Rotor YA20/1). Das Pellet wurde in 30% Sukrose in PBS gelöst und mit 10,5% Sukrose überschichtet um dann bei 68000g (Beckman, Rotor SW40TI) 50min. zentrifugiert zu werden. Das Myelin sammelte sich aufgrund seiner Dichte zwischen der 10,5%igen und 30%igen Sukrose und konnte mit einer Spritze zwischen den Schichten herausgezogen werden. Das Myelin wurde mit ddH₂O vermischt um durch den osmotischen Schock Axolemma und Myelin voneinander zu trennen und anschließend 30min. bei 68000g zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde wiederholt, dann noch einmal eine Sukrose-Dichte-Zentrifugation durchgeführt und anschließend zweimal wie oben beschrieben mit ddH₂O gewaschen. Nach der Präparation wurde das Myelin Pellet in PBS aufgenommen und eine Proteinkonzentrationsbestimmung durchgeführt.

3.2.9 Isolierung von Mikrodomänen der Plasmamembran (*rafts*)

Die *rafts* wurden durch eine Sukrose-Dichte-Zentrifugation isoliert, da sie, aufgrund ihrer Lipid Zusammensetzung, eine geringe Dichte aufweisen und so von den restlichen Zell-Bestandteilen getrennt werden können.

Zum primären Oligodendrozyten Lysat bzw. dem aufgereinigten Myelin wurde das gleiche Volumen (500µl) 80% Sukrose gegeben, durchmischt und mit 30% (1ml) und 5% (200µl) Sukrose überschichtet. Anschließend erfolgte eine Auftrennung der Zellbestandteile aufgrund des Sukrose-Dichte-Gradienten für 2h, bei 260000g, 4°C (Beckman, TLS55 Rotor). Es wurden 400µl-Fractionen von oben entnommen. Dabei befinden sich *rafts* in der ersten Fraktion, da sie eine Dichte aufweisen, die einer Sukrose-Dichte von 15-20% entspricht. Zellbestandteile mit höherer Dichte, wie z.B. das Zytoskelett befanden sich hingegen weiter unten in der 40% Sukrose-Phase.

Je nach nachfolgendem Experiment wurden diese Proben direkt für einen Western Blot verwendet oder die Raft-Fraktion mit TBS gewaschen und in dem entsprechenden Puffer aufgenommen.

3.3 Molekularbiologische Methoden

Die *Lyn*-Konstrukte wurden von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Draber der Karls-Universität Prag zur Verfügung gestellt. Sie umfassen die beiden Wildtyp *Lyn*-

Isoformen A und B, jeweils eine inaktive Isoform und die *Lyn* Isoform B als konstitutiv aktives Konstrukt (Abb.9).

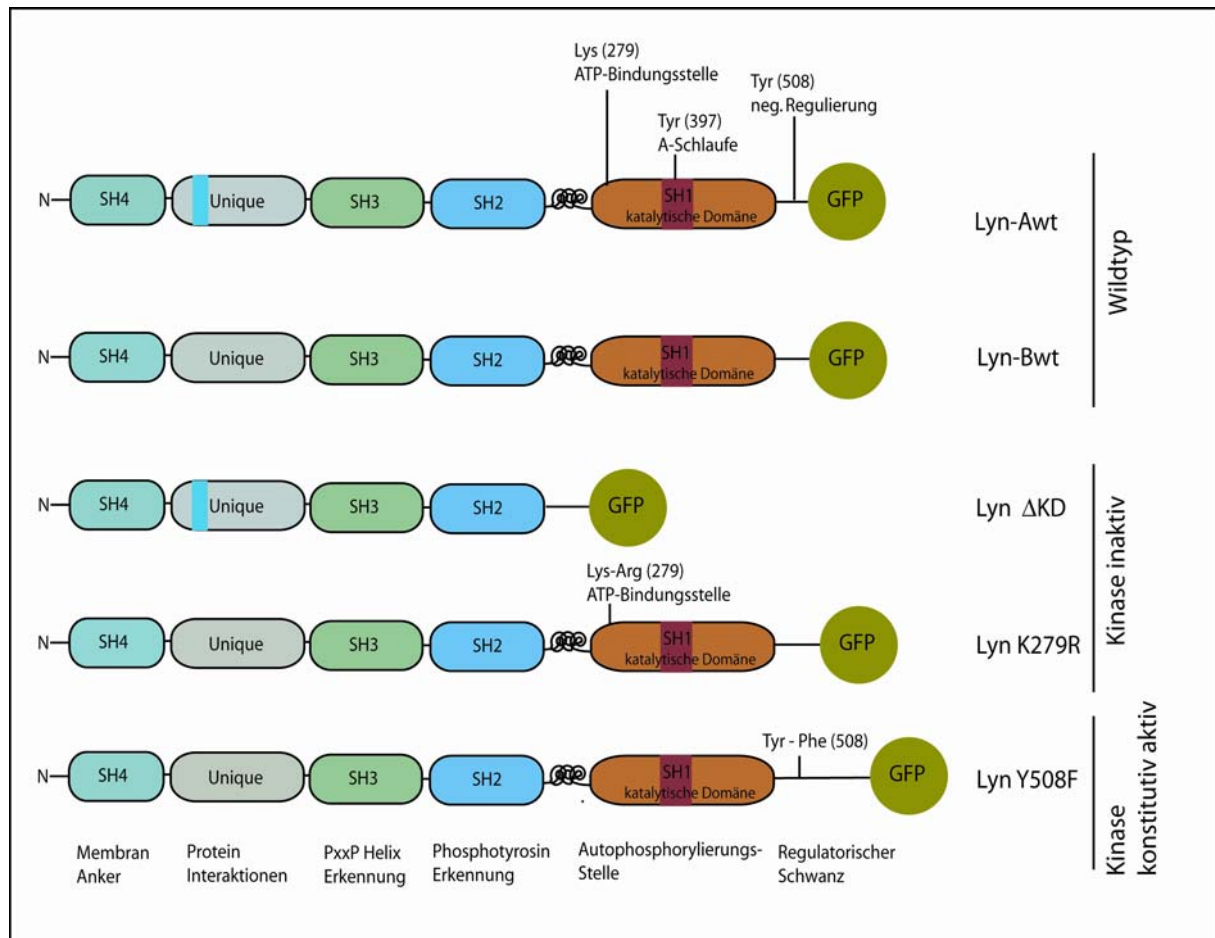


Abbildung 9: Lyn-GFP Konstrukte von Prof. P. Draber, Karls-Universität Prag (Kovarova et al 2001, Tolar et al 2004).

Von oben nach unten: Die beiden Wildtyp-Lyn Isoformen A und B, die inaktive Form von Isoform A: Lyn Δ KD (es fehlt die Kinase Domäne) und der Isoform B: Lyn K279R (Mutation der ATP-Bindungsstelle) und eine konstitutiv aktive Form der Isoform B: Lyn Y508F (Mutation des regulatorischen Schwanzes). Alle Konstrukte besitzen C-terminal ein GFP (green fluorescent protein).

Die beiden Wildtyp Isoformen Lyn Awt und Lyn Bwt unterscheiden sich nur in der „Unique“ Domäne. Lyn Δ KD ist katalytisch inaktiv, da die gesamte katalytische Domäne SH1 deletiert ist. Lyn K279R ist ebenfalls inaktiv, eine Mutation in der ATP-Bindungsstelle verhindert die Phosphorylierung von Liganden. Lyn Y508F ist konstitutiv aktiv, da es eine Punktmutation im regulatorischen Schwanz besitzt. Das Tyrosin 508 wurde durch ein Phenylalanin ersetzt, so dass die Kinase nicht mehr inaktiviert werden kann. Aktivitätsprüfungen zeigen, dass dieses Lyn Konstrukt 4x so aktiv ist wie eines der Wildtyp Konstrukte (Tolar et al 2004).

Alle Konstrukte haben am c-terminalen Ende des *Lyn* Gens ein *GFP* (green fluorescent protein) Gen, dass die Zellen nach erfolgreicher Transfektion detektieren lässt (Tolar et al 2004) (Kovarova et al 2001). Das *Lyn-GFP* Gen wurde aus dem pSFV (semiliki forest virus) über einen pGEMt Zwischenvektor in einen pCMV (cytomegalovirus) Expressionsvektor umklontiert.

3.3.1 PCR

Die *Lyn-GFP* Konstrukte wurden durch eine Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) direkt im pSFV amplifiziert und anschließend durch ein PCR-Aufreinigungs-Kit aufgereinigt.

Bei der PCR werden kleine DNA-Sequenz-Stücke (Primer) zu der DNA gegeben. Diese binden 3' und 5' des zu amplifizierenden DNA-Bereichs. Eine TAQ-Polymerase verlängert diese Stücke entlang der DNA-Matrize mit Hilfe von Desoxynukleotidtriphosphaten (dNTP's). Dieser Vorgang wird wiederholt, so daß es zu einer exponentiellen Vermehrung des Amplikons kommt. Reaktionsgemisch und Amplifikationsprotokoll sind Tabelle 5 zu entnehmen.

Tabelle 5: Reaktionsgemisch und Amplifikationsprotokoll der PCR

Reaktionsgemisch	Amplifikationsprotokoll
5 µl DNA (pSFV-Konstrukt)	95°C 30sec
25 µl Nuklease-freies H ₂ O	65°C 30sec
5 µl Red Taq Puffer (10x)	72°C 2,5min
4 µl 5'Primer (<i>Lyn</i>) (15pM)	72°C 10min
4 µl 3'Primer (<i>GFP</i>) (15pM)	4°C ∞
4 µl dNTP's (10mM)	
4 µl MgSO ₄ (100mM)	
2 µl Red Taq Polymerase (1U/µl)	
0,5 µl BSA (10mg/ml)	

3.3.2 Ligation

Bei der Ligation wird das 3'-Ende einer DNA mit dem 5'-Ende einer zweiten DNA mit Hilfe einer Ligase verbunden. Um die Spezifität zu erhöhen ist es von Vorteil die DNA

mit Restriktionsenzymen so zu schneiden, dass Überhänge entstehen, die einander komplementär sind.

Die PCR-Produkte wurden in einen Zwischen-Vektor (pGEMt Vektor) ligiert, bevor die Klonierung in den pCMV Endvektor stattfand. Der pGEMt Vektor hat keine Ringstruktur und an seinen Enden mehrere Thymidin-Nukleotide, was die Ligation von PCR Produkten mit einem Poly-A-Schwanz (mehrere Adenin-Nukleotide) vereinfachte, da kein vorheriger Restriktionsverdau nötig war. Das Protokoll der Ligation in den pGEMt Vektor ist Tabelle 7 zu entnehmen.

Die Konstrukte im pGEMt Vektor und der pCMV wurden mit den Restriktionsenzymen BamHI und Sall verdaut um komplementäre DNA-Überhänge zu schaffen. Der pCMV wurde anschließend mit einer Phosphatase (CIP) an seinen Überhängen dephosphoryliert um eine Ligation ohne Konstrukt zu verhindern. Das Protokoll des Restriktionsverdaus ist in Tabelle 6 zu sehen.

Tabelle 6: Restriktionsverdau von Lyn-GFP-pGEMt und -pCMV

5 µl DNA	
3 µl Bam HI (20000U/ml)	
2 µl Bam HI Puffer (10x)	
10 µl Nuklease-freies H ₂ O	1,5h 37°C Wasserbad
DNA Aufreinigung mit dem Promega PCR-Aufreinigungs-Kit	
40 µl DNA	
5 µl Sal I (20000U/ml)	
5 µl Puffer NEB III (10x)	
0,5 µl BSA (10mg/ml)	1,5h 37°C Wasserbad
20 min. Deaktivierung bei 80°C im Heizblock	
pCMV Aufreinigung mit dem Promega PCR-Aufreinigungs-Kit	
50 µl pCMV	
5,5 µl CIP (10000U/ml)	
5 µl CIP Puffer (10x)	1h 37°C Wasserbad

Nach der Aufreinigung der Konstrukte und des pCMV über ein 1% Agarose Gel (TAE Puffer, 80mV, 1h) wurden die entsprechenden Banden (Konstrukte 2,3kb, pCMV 4,7kb) aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA mit dem Gel-Aufreiniungs-Kit von Promega nach Herstellerangaben isoliert.

Anschließend wurden die Konstrukte in den pCMV Vektor ligiert, wie aus Tabelle 7 ersichtlich wird.

Tabelle 7: Ligation der Lyn-GFP-Konstrukte in den pGEMt bzw. pCMV

5 µl PCR Produkt (1µg)	5 µl Konstrukt (Bam HI/ Sal I Überhänge) (1µg)
1 µl pGEMt Vektor (Promega)	3 µl pCMV (Bam HI/Sal I Überhänge) (0,6ug)
1 µl Ligase (3U/µl)	3 µl Ligase (3U/µl)
1µl Ligase Puffer (10x)	3 µl Ligase Puffer (10x)
2 µl Nuklease-freies H ₂ O	16 µl Nuklease-freies H ₂ O
16°C, über Nacht im PCR-Gerät	16°C, über Nacht im PCR-Gerät

3.3.3 Transformation

Die ligierten *Lyn-GFP*-pGEMt und *Lyn-GFP*-pCMV Plasmide wurden in *E. coli* (T10F) zur Vermehrung der Plasmide transformiert und Bakterienkulturen angelegt.

Es wurden 2µl Ligationsansatz und 100µl T10F vermischt und 30 min. auf Eis inkubiert. Danach folgte ein Hitze-Schock für 1 min. bei 42°C im Heizblock und dann 2 min. auf Eis. Durch die Temperaturwechsel wird die Plasmamembran der Bakterien für die Plasmide durchlässig. Zu dem Ansatz wurde 1ml LB-Medium gegeben und 45 min. bei 37°C, 150rpm inkubiert, so dass sich die Bakterien vermehren konnten. Anschließend wurden die Bakterien auf LB-Medium-Agar Platten mit 75µl Ampicillin aufplattiert. Da die Plasmide pGEMt und pCMV Ampicillin-Resistenz-Gene besitzen, sollten nur Bakterien auf der Platte wachsen, die das Plasmid besitzen. Die Agar-Platten wurden über Nacht bei 37°C in einem Brutschrank inkubiert.

3.3.4 Mini- und Maxi-Präparation

Es wurden Klone von den Agarplatten gepickt, in 5ml LB-Medium mit 75µl/ml Ampicillin herangezüchtet und eine Mini-Präparation nach Promega durchgeführt. Anschließend wurde ein Restriktionsverdau durchgeführt um zu überprüfen, ob die Plasmide mit dem Konstrukt vorhanden sind (Tab.5). Klone, die das Plasmid mit Konstrukt besaßen wurden in 200ml LB-Medium mit 75µl/ml Ampicillin weitergezüchtet und eine Maxi-Präparation nach Promega durchgeführt. Die DNA-Konzentrationen wurden mit Hilfe eines Photometers ermittelt (bei 260nm).

3.4 Statistik

Für die statistische Analyse wurde die Software Graph Pad Prism, Version 4.00 für Windows verwendet. Es wurden die folgenden Statistik Tests eingesetzt:

Student's t-test: Dieser Test ist parametrisch und vergleicht die Mittelwerte zweier Gruppen. Es soll festgestellt werden mit welcher Wahrscheinlichkeit die Verteilung der Einzelergebnisse beider Gruppen zur selben Grundgesamtheit gehören.

Mann-Whitney Test: Dieser Test ist ein nicht-parametrischer Test, es werden also die Mediane und nicht die Mittelwerte verglichen. Dadurch können Verteilungen verglichen werden, die nicht der gauß'schen Verteilung folgen. Er dient zur Überprüfung der Signifikanz der Übereinstimmung zweier Verteilungen, also ob zwei unabhängige Verteilungen zu derselben Grundgesamtheit gehören.

One-way ANOVA: Dieser Test vergleicht die Mittelwerte von mindestens drei Gruppen und ist somit ein parametrischer Test. Die Gruppen repräsentieren Ergebnisse nach unterschiedlicher Behandlung derselben Ausgangsmaterie. Er dient zur Überprüfung der Signifikanz der Übereinstimmung von mindestens drei Verteilungen und ob diese zu derselben Grundgesamtheit gehören.

4 Ergebnisse

In dieser Studie wurde die zeitliche Expression der Lyn Kinase *in vitro* und *in vivo* in Oligodendrozyten und im Myelin untersucht, sowie die Lokalisation innerhalb und außerhalb von Mikrodomänen der Plasmamembran. Diese Charakterisierung der Lyn Expression sollte Aufschluss darüber geben, in welchem Entwicklungsstadium der Oligodendrozyten Lyn eine funktionelle Rolle übernehmen könnte.

Die Manipulation der Aktivität der Lyn Kinase in Oligodendrozyten durch Transfektion aktiver und inaktiver Konstrukte, sollte einen weiteren Beitrag zur Aufklärung der Funktion geben.

Außerdem wurden Co-Immunpräzipitationen durchgeführt, um mögliche Bindungspartner der Lyn Kinase aufzuzeigen und die Signalkaskade konkret anhand von interagierenden Proteinen nachzuweisen.

Die Aktivierung des assoziierten Rezeptors mit einem Agonisten sollte weiteren Einblick in die Aktivierung und Funktion der Lyn Kinase geben.

4.1 Expression der Src-Kinase Lyn in Zellen des murinen Gehirns

Um die Lyn Kinase im zentralen Nervensystem der Maus im Allgemeinen und in Oligodendrozyten im Besonderen zu charakterisieren, wurde ihre Expression untersucht. Hierbei wurde sowohl die Expression in unterschiedlichen Zelltypen und Geweben des zentralen Nervensystems *in vitro* und *in vivo*, als auch die zeitliche Expression während der Differenzierung der Oligodendrozyten und im Myelin des sich entwickelnden Gehirns geprüft. Da Mikrodomänen oder *rafts* der Plasmamembran als Plattform für Signaltransduktionen gelten, wurde zusätzlich die Expression der Lyn Kinase in *rafts* untersucht.

4.1.1 Lyn Kinase Expression in Zellen des Gehirns und im Myelin

Zur Überprüfung der Expression der Lyn Kinase im ZNS wurden aus primären Oligodendrozyten und primären Astrozyten (3.1.1), sowie der Zelllinie Oli-*neu* (3.1.2) Tx100-haltige Lysate erstellt. Myelin und Axolemma wurden nach der Präparation (3.2.8) in PBS aufgenommen. Abb.10 zeigt, dass in primären Oligodendrozyten und im Myelin, in Astrozyten und im Axolemma beide Lyn Isoformen (53 und 56kD) exprimiert werden. Die Expression im jüngeren Myelin (P12) ist stärker als im älteren Myelin (P60). Es konnte keine Expression in der Zelllinie Oli-*neu* festgestellt werden.

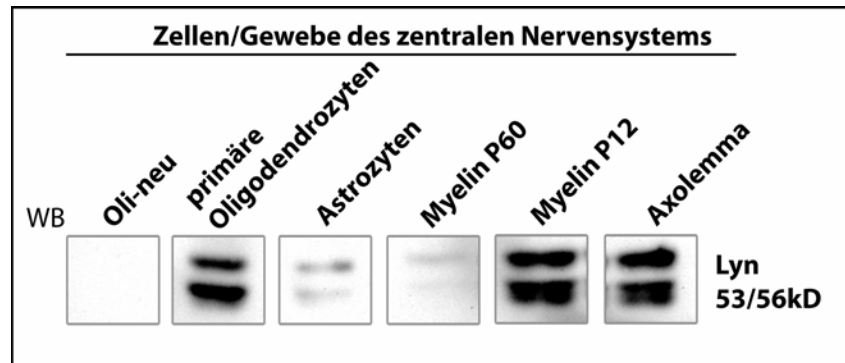


Abbildung 10: Lyn Expression in Zellen und Gewebe des ZNS und der Zelllinie Oli-neu, Western Blot

Oli-neu Zellen und primäre Oligodendrozyten/Astrozyten (5Tage-Kultur) wurden mit Tx100-Puffer lysiert, Myelin und Axolemma aus Gehirnen präpariert. Auftrennung der Proteine durch ein 10% SDS-Gel und Western Blot. Oli-neu Zellen exprimieren kein Lyn (siehe 3.1.5), primäre Oligodendrozyten (pOL), Astrozyten, Myelin von Mäusen, 60 bzw. 12 Tage alt (P60, P12) und das Axolemma von Neuronen exprimieren beide Isoformen der Lyn Kinase (53/56kD).

Zur Kontrolle dieser Ergebnisse wurde eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Zellen des Gehirns wurden aus Mäusen (E15) präpariert und mit Antikörper, die die Lyn Kinase oder zell-spezifische Marker für Oligodendrozyten (O4), Astrozyten (GFAP) und Neurone (L1) detektieren inkubiert (Abb.11). Lyn ist hier in grün zu sehen, die zell-spezifischen Marker in rot. Zusätzlich wurde eine Lyn Färbung (grün) der Zelllinie Oli-neu vorgenommen. Die Immunfluoreszenzfärbung bestätigt das Ergebnis des Western Blots. Lyn wird in allen drei Zelltypen des zentralen Nervensystems exprimiert (Pfeile), jedoch nicht in der Zelllinie Oli-neu.

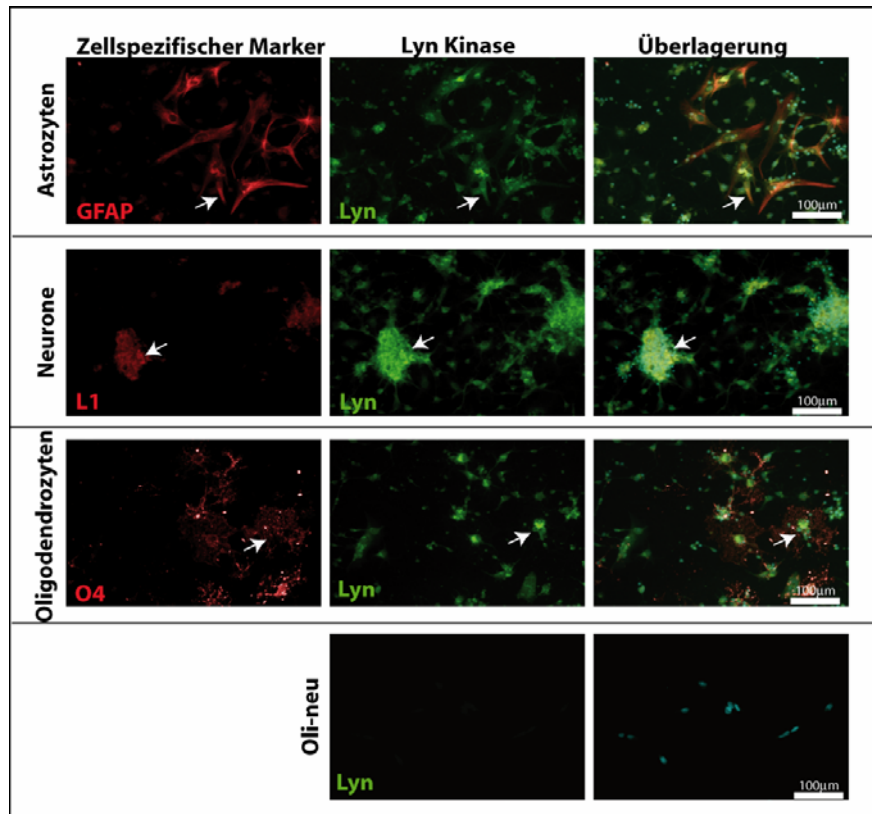


Abbildung 11: Immunfluoreszenzfärbung zur Detektion der Lyn Expression in Zellen des ZNS und der Zelllinie Oli-neu

Astrozyten, Neurone und Oligodendrozyten wurden aus Gehirnen, Embryonal-Tag 15 (E15) präpariert und 5 Tage kultiviert. Von links nach rechts: zellspezifische Marker (rot), Lyn Kinase (grün), Überlagerung der Bilder mit Zellkernfärbung (blau). Von oben nach unten: Astrozyten, zellspezifischer Marker GFAP; Neurone, zellspezifischer Marker L1; Oligodendrozyten, zellspezifischer Marker O4 und die Zelllinie Oli-neu. Lyn wird in allen drei Zelltypen des zentralen Nervensystems exprimiert, jedoch nicht in der Zelllinie Oli-neu.

4.1.2 Lyn Kinase Expression in Oligodendrozyten und im Myelin verschiedener Entwicklungsstadien

Abb.10 zeigt, dass die Expression im Myelin unterschiedlich alter Mäuse variiert. Um die Expression in Oligodendrozyten und Myelin näher zu bestimmen wurde Myelin aus murinen Gehirnen verschiedenen Alters extrahiert (P8, P12, P16, P20, P30 und P60) , sowie primäre Oligodendrozyten nach der Präparation unterschiedlich lange kultiviert (2, 5 und 9 Tage) (Abb.12). In Abb.12A wurde die Lyn Kinase in Myelin der Alterstufen P8-P60 nachgewiesen. Zu jedem Zeitpunkt werden beide Isoformen der Lyn Kinase im Myelin exprimiert. Die Expression verringert sich jedoch nach P16 und ist in P60 am schwächsten. In Abb.12B wurde die Expression von Lyn in primären Oligodendrozyten untersucht. Beide Lyn Isoformen werden zu allen Zeitpunkten exprimiert, die Expression verringert sich jedoch mit der Länge der Kultivierung.

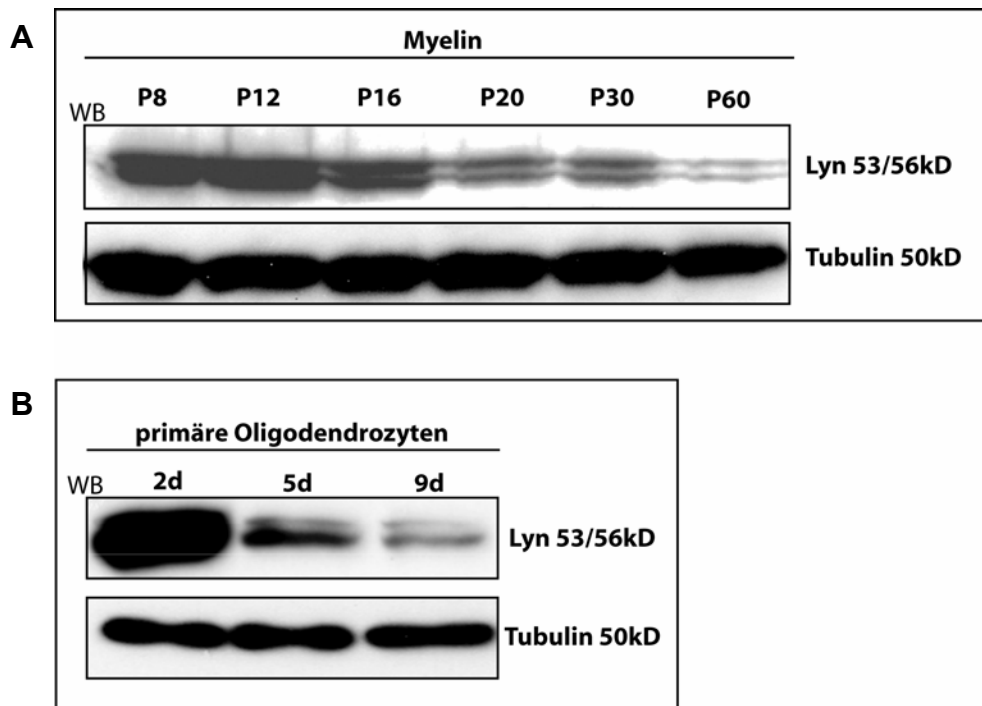


Abbildung 12: Entwicklungsbedingte Expression der Lyn Kinase im Myelin und primären Oligodendrozyten

Primäre Oligodendrozyten wurden in Tx100-Puffer lysiert und Myelin mit Hilfe eines Sukrose-Gradienten isoliert. Auftrennung der Proteine durch ein 10% SDS-Gel. Tubulin dient als Ladekontrolle. A: Lyn Expression in unterschiedlichen Alterstufen des Myelins (postnataler Tag (P): P8-P60) B: Lyn Expression in primären Oligodendrozyten, 2, 5 und 9 Tage in Kultur. Die Lyn Expression beider Isoformen nimmt mit dem Alter der Mäuse im Myelin und mit der Dauer der Kultivierung in den primären Oligodendrozyten ab.

Um diese Ergebnisse zu bestätigen wurde eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Hierbei wurden primäre Oligodendrozyten mit Antikörpern gegen Lyn Kinase und zell/entwicklungs-spezifischen Markern für Oligodendrozyten inkubiert (1.2.7). In Abb.13 sieht man von oben nach unten die Oligodendrozyten-Marker in der Reihenfolge, wie sie auch während der Entwicklung exprimiert werden. NG2 (Antikörper: AN2) ist ein früher Marker, der in undifferenzierten Vorläuferzellen exprimiert wird. Während der Reifung der Oligodendrozyten werden dann Sulfatid (O4), CNP und Galaktocerebrosid (O1) exprimiert. MAG, PLP (O10) und MOG dagegen sind Myelin-Proteine, die in reifen, differenzierten Oligodendrozyten zu finden sind. In Abb.13 ist Lyn grün dargestellt, die Oligodendrozyten-Marker in rot. Das jeweils rechte Bild zeigt eine Überlagerung beider Färbungen. Die Lyn Kinase zeigt mit jedem Oligodendrozyten-Marker Doppelfärbungen derselben Zelle (Pfeile). Dies bestätigt die vorherigen Ergebnisse, da in beiden Experimenten eine Expression der Lyn Kinase festgestellt werden kann. Die Expression nimmt

allerdings entwicklungsabhängig ab (Abb.12). Gibt es Unterschiede in der Anzahl der Lyn-exprimierenden Zellen, je nach Reifegrad der Zelle?

Um dies festzustellen wurden die oben beschriebenen Doppelfärbungen (Marker/Lyn) der Immunfluoreszenz in primären Oligodendrozyten quantifiziert, indem in drei unabhängigen Experimenten jeweils 500 Zellen gezählt wurden. Die Anzahl der Marker/Lyn-positiven Zellen zur Gesamtzellzahl wurde für jeden Marker bestimmt und anschließend statistisch ausgewertet (Abb.14). Hierfür wurde der Student's t-test (parametrisch) gewählt.

In Abb.14 sieht man, dass 57% der Lyn-positiven Zellen auch den Marker NG2 (AN2), der in Oligodendrozyten Vorläuferzellen detektiert werden kann, exprimieren. Während der Reifung zur differenzierten Oligodendrozyte exprimieren noch 19-33% der Zellen sowohl die Lyn Kinase als auch den Marker (Sulfatid (O4), CNP, Galaktocerebrosid (O1)), die differenzierte Oligodendrozyte, die Myelin-Komponenten wie MAG, PLP (O10) und MOG exprimiert besitzt nur noch zu 13-18% Lyn-positive Zellen (eine Gesamtprozentzahl von über 100% kommt dadurch zustande, dass die Marker zeitweise gleichzeitig exprimiert werden).

Undifferenzierte Zellen, die frühe Oligodendrozyten Marker wie NG2 (AN2) exprimieren, exprimieren auch zu einem signifikant höheren Prozentsatz Lyn Kinase (NG2-CNP: $p < 0,01$, NG2-restliche Marker: $p < 0,001$). Mit der Fortentwicklung der Oligodendrozyten nimmt die Expression der Lyn Kinase ab.

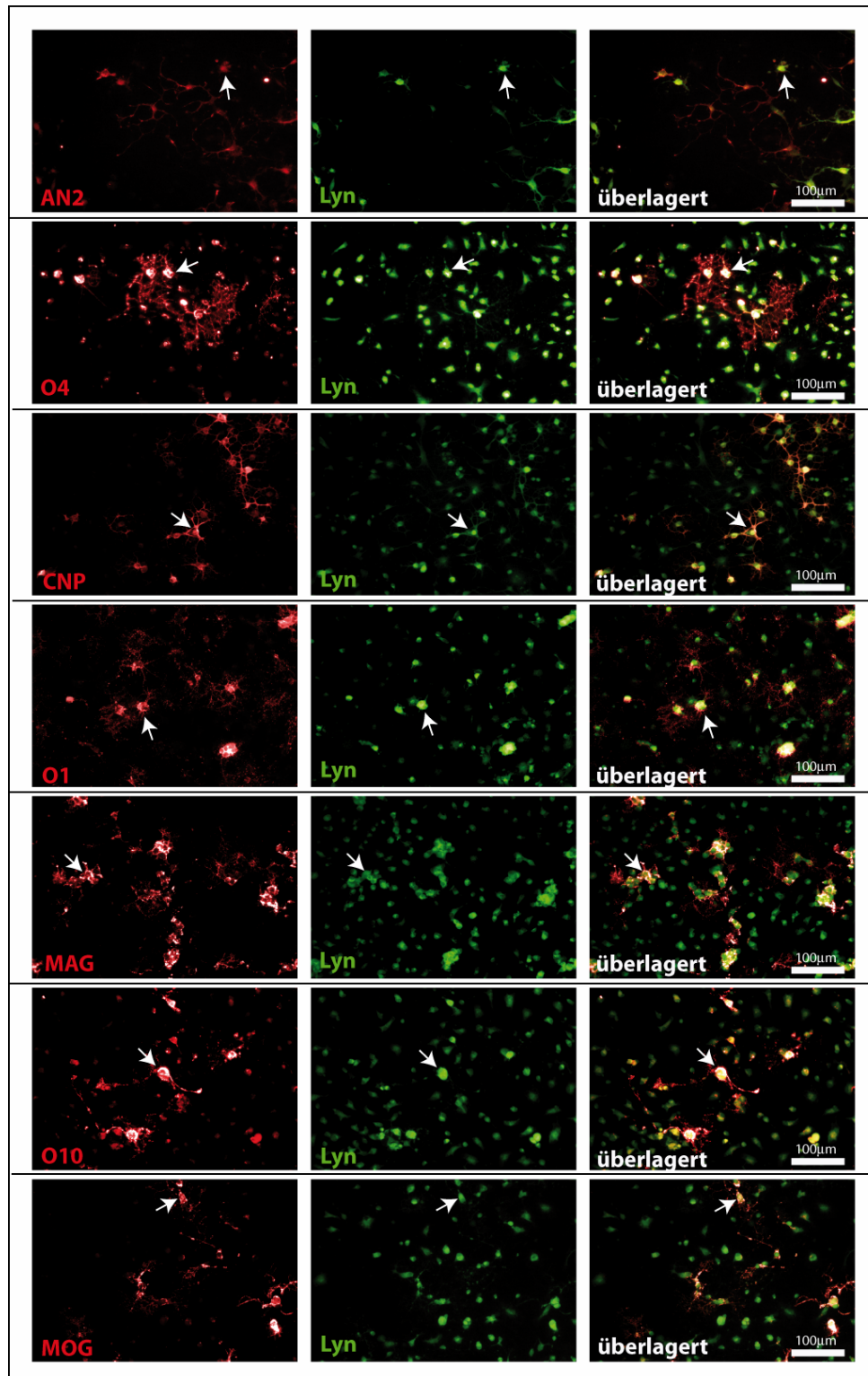


Abbildung 13: Entwicklungsbedingte Expression der Lyn Kinase in primären Oligodendrozyten, Immunfluoreszenz mit Antikörpern gegen Oligodendrozyten-Marker und Lyn Kinase.

Primäre Oligodendrozyten wurden nach der Präparation 5 Tage kultiviert. Von links nach rechts: Oligodendrozyten Marker (rot), Lyn Kinase (grün) Überlagerung der Bilder. Von oben nach unten: NG2 (AN2), Sulfatid (O4), CNP, Galaktocerebrosid (O1), MAG, PLP (O10) und MOG Doppelfärbungen mit der Lyn Kinase. Die Reihenfolge entspricht der Expression der Marker während der Entwicklung der Oligodendrozyten. Eine Co-Expression der Lyn Kinase kann für jeden Marker detektiert werden (Pfeil). Lyn wird in Oligodendrozyten exprimiert, die Expression ist sowohl in jüngeren, als auch in späteren Entwicklungsstadien zu finden.

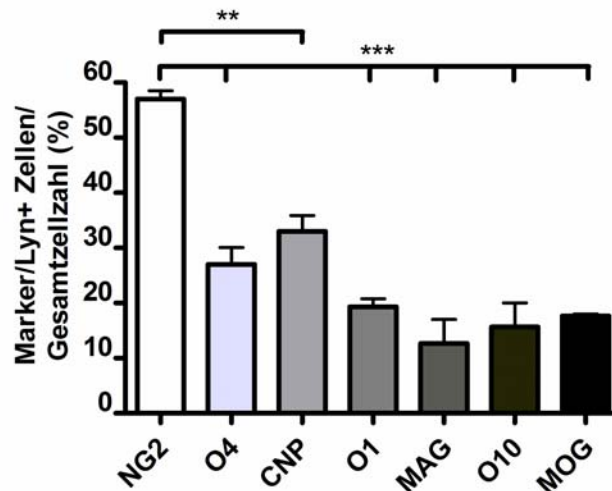


Abbildung 14: Statistische Analyse der Lyn Expression in Oligodendrozyten unterschiedlichen Entwicklungsgrades

Quantifizierung von Lyn/Marker-Doppelfärbungen der Immunfluoreszenz in primären Oligodendrozyten. Entwicklungsspezifische Marker von links nach rechts: NG2 (AN2), Sulfatid (O4), CNP, Galaktocerebrosid (O1), MAG, PLP (O10) und MOG. Auszählung von 500 Zellen/Experiment von drei unabhängigen Experimenten. Marker/Lyn-positive Zellen: 57% NG2/Lyn, 29% O4/Lyn, 33% CNP/Lyn, 19% O1/Lyn, 13% MAG/Lyn, 16% O10/Lyn und 18% MOG/Lyn. Es sind signifikant mehr Lyn/NG2-positive Zellen zu detektieren. Die Lyn Kinase Expression reduziert sich während der Reifung der Oligodendrozyten. Software GraphPad Prism, Student's t-test, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, $n = 3$

4.1.3 Lyn Kinase Expression in murinen Gehirnen *in vivo*

In 4.1.2 wurde gezeigt, dass die Lyn Kinase in Oligodendrozyten *in vitro* exprimiert wird und auch in Myelin-Lysaten nachzuweisen ist. Um diese Daten zu unterstützen und die Expressions-Analyse der Lyn Kinase in Oligodendrozyten zu vervollständigen wurden *in vivo*-Untersuchungen durchgeführt. Hierbei wurden Gehirne von 9 Tage alten Mäusen (P9) mit einem Vibratom in Schnitte der Dicke 40µm angefertigt (3.1.3) und die Lyn Kinase und Oligodendrozyten Marker durch Immunfluoreszenz nachgewiesen (3.2.7).

In Abb.15 sind Doppelfärbungen der Lyn Kinase und Oligodendrozyten Marker im Bereich des *Corpus Callosum* gezeigt. Es wurden dieselben Marker, wie auch bei der *in vitro*-Färbung der Oligodendrozyten in Abb.13, verwendet. Links in Abb.15 sind jeweils die Marker zu sehen (rot), daneben die entsprechende Lyn Färbung (grün) und rechts eine Überlagerung beider Bilder mit einer zusätzlichen Zellkernfärbung mit DAPI (blau).

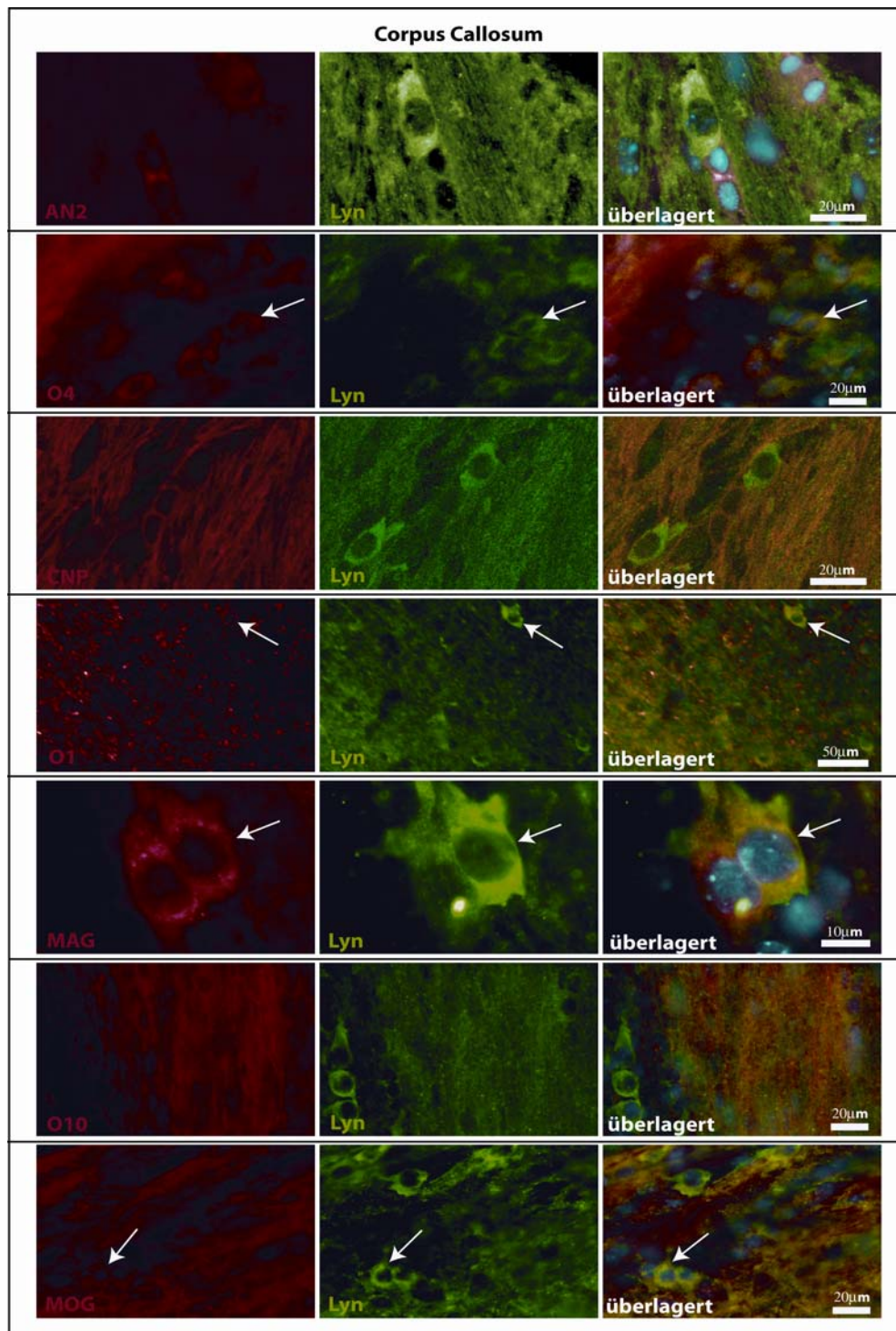


Abbildung 15: Expression der Lyn Kinase in Gehirnschnitten einer Maus (postnataler Tag 9) im Bereich des *Corpus Callosum*, Immunfluoreszenz mit Antikörpern gegen Oligodendrozyten-Marker und Lyn Kinase.

Von links nach rechts: Oligodendrozyten Marker (rot), Lyn Kinase (grün), Überlagerung der Bilder mit einer Zellkernfärbung (DAPI, blau). Von oben nach unten: NG2 (AN2), Sulfatid (O4), CNP, Galaktocerebroside (O1), MAG, PLP (O10) und MOG Doppelfärbungen mit Lyn. Die Reihenfolge entspricht der Expression der Marker während der Entwicklung der Oligodendrozyten. Die Co-Expression von Lyn und O4, O1, MAG und MOG in einer Zelle kann detektiert werden (Pfeile). Im Bereich des *Corpus Callosum* konnte jedoch keine Co-Expression von Lyn und NG2 (AN2) bzw. CNPase festgestellt werden. Doppelmarkierungen von Lyn und O10 in einer Zelle sind schwierig zu detektieren, da O10 hauptsächlich Zell-Ausläufer markiert während Lyn Kinase hauptsächlich im Zellkörper zu finden ist.

Es konnten Zellen identifiziert werden, die sowohl Sulfatid (O4), Galaktocerebrosid (O1), MAG oder MOG exprimieren, als auch Lyn Kinase (Pfeile). Da die PLP (O10)-Färbung hauptsächlich in den myelinisierenden Ausläufern zu finden ist, Lyn Kinase dagegen hauptsächlich im Zellkörper, ist eine Aussage über die Co-Expression in einer Zelle nicht zu treffen. Es konnten keine Zellen im *Corpus Callosum* gefunden werden, die sowohl NG2 (AN2) oder CNPase, als auch Lyn exprimieren.

Dieses Ergebnis (Abb.15) entspricht nicht den Resultaten aus den *in vitro* Untersuchungen, in denen die Lyn Kinase in Oligodendrozyten jeden Reifegrades exprimiert wird, jedoch signifikant häufiger in undifferenzierten NG2-positiven Oligodendrozyten. Um dieses Phänomen genauer zu untersuchen wurden zusätzliche Färbungen im *Thalamus* des Gehirns, das ventral vom *Corpus Callosum* liegt, angefertigt.

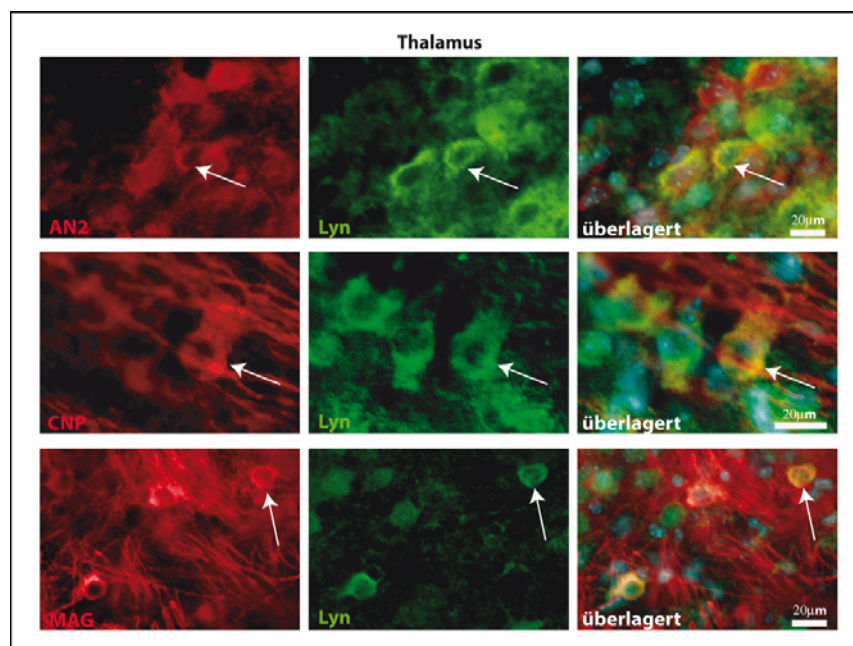


Abbildung 16: Expression der Lyn Kinase in Gehirnschnitten einer Maus (postnataler Tag 9) im Bereich des *Thalamus*, Immunfluoreszenz mit Antikörpern gegen Oligodendrozyten-Marker und Lyn Kinase.

Von links nach rechts: Oligodendrozyten Marker (rot), Lyn Kinase (grün), Überlagerung der Bilder mit einer Zellkernfärbung (DAPI, blau). Von oben nach unten: NG2 (AN2), CNP und MAG Doppelfärbungen mit der Lyn Kinase. Die Reihenfolge entspricht der Expression der Marker während der Entwicklung der Oligodendrozyten. Lyn wird in Oligodendrozyten *in vivo* im *Thalamus* exprimiert, die Expression ist sowohl in jüngeren, als auch in späteren Entwicklungsstadien zu finden. Es konnte eine Co-Expression von Lyn mit allen drei Markern detektiert werden (Pfeile).

In Abb.16 sind Immunfluoreszenzfärbungen mit Antikörper gegen Lyn Kinase und den Oligodendrozyten-Markern NG2 (AN2), CNPase und MAG zu sehen. In Abb.16

sind links jeweils die Marker gezeigt (rot), daneben Lyn Kinase (grün) und rechts eine Überlagerung mit zusätzlicher Zellkernfärbung mit DAPI (blau). Eine Co-Expression von NG2 (AN2), CNPase oder MAG mit Lyn Kinase ist in allen drei Fällen zu detektieren (Pfeile).

Es ist also festzustellen, dass Lyn Kinase auch *in vivo* in Oligodendrozyten exprimiert wird und diese Expression sowohl in undifferenzierten als auch in differenzierten Oligodendrozyten zu finden ist. Ob die Expression verstärkt in undifferenzierten Zellen vorhanden ist, lässt sich anhand dieses Experimentes nicht eindeutig sagen.

4.1.4 Lyn Kinase Expression in der Zelllinie Oli-*neu*

Es konnte gezeigt werden, dass die Lyn Kinase *in vitro* und *in vivo* in Oligodendrozyten exprimiert wird. Eine Expression in der Oligodendrozyten Zelllinie Oli-*neu* konnte nicht eindeutig nachgewiesen werden, allerdings wurden in wenigen Oli-*neu* Lysaten eine schwache Lyn Kinase Expression mittels Western Blot und Antikörper Detektion festgestellt (nicht gezeigt).

Um die Lyn Kinase der Lysate anzureichern und die Detektion dadurch zu erleichtern wurden Immunpräzipitationen aus radioaktiv markierten Lysaten hergestellt. In Abb.17 sind jeweils von links nach rechts Lysate, die Immunpräzipitationen (IPLyn) und Kontrollen zu sehen. Sowohl im Oli-*neu* Lysat (A), als auch im Lysat der primären Oligodendrozyten (pOL, B) sind viele radioaktiv markierte Proteine zu erkennen. In dem Immunpräzipitat aus Oli-*neu* Lysat (IPLyn, A) sind keine Banden bei 53 und 56kD zu detektieren, im Immunpräzipitat aus primären Oligodendrozyten (IPLyn, B) sind zwei schwache Banden dieser Größenordnung zu erkennen, rechts stärker kontrastiert (C). Es ist eine weitere Bande bei 49kD zu sehen. Dabei könnte es sich um ein Protein handeln, dass mit der Lyn Kinase assoziiert ist und deshalb mit im Immunpräzipitat auftaucht. Die Identität dieses Proteins konnte jedoch nicht geklärt werden. Die Kontrollen zeigen in beiden Fällen (A und B) keinerlei Banden, Proteine haben also nicht unspezifisch gebunden.

Es konnte ein weiteres Mal gezeigt werden, dass Lyn Kinase in primären Oligodendrozyten exprimiert wird, jedoch konnte keine Expression in Oli-*neu* Zellen festgestellt werden.

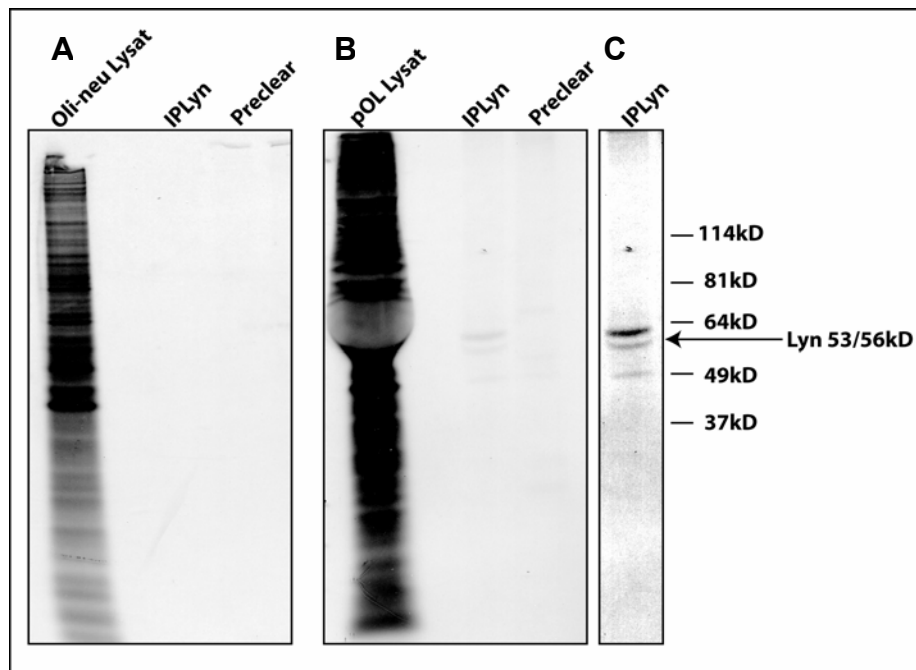


Abbildung 17: Lyn Kinase Expressionsnachweis in Oli-*neu* und primären Oligodendrozyten nach Immunpräzipitationen radioaktiv-markierter Zellen, Phosphoimager Detektion

Radioaktive Markierung der Zellen mit Cystein- S^{35} und Methionin- S^{35} –haltigem Medium. A/B von links nach rechts. Zell-Lysat, Immunpräzipitation (IP), Kontrolle. Die Kontrollen zeigen in beiden Fällen keine Banden und somit keine unspezifische Bindung von Proteinen. A: Im Oli-*neu* Lysat sind alle radioaktiv markierten Proteine zu sehen, in der IPLyn ist kein Lyn Protein detektierbar. B: Im Lysat der primären Oligodendrozyten (pOL) (5 Tage Kultur) sind alle radioaktiv markierten Proteine zu sehen. In der Immunpräzipitation sieht man eine Doppelbande bei 53/56kD, die die beiden Lyn Isoformen zeigen. Es ist eine weitere Bande bei 49kD zu sehen, die ein assoziiertes Protein anzeigt (B/C). Das Immunpräzipitat sieht man links verstärkt (C).

Da in vorherigen Versuchen gelegentlich eine schwache Lyn Expression in Oli-*neu* Zellen beobachtet wurde (nicht gezeigt), sollte zusätzlich geprüft werden, ob die Lyn Kinase in Oli-*neu* Zellen nur Zellzyklus-abhängig exprimiert wird. Einige Zellen wurden sofort lysiert (Passage), die anderen Zellen in Kulturschalen ausplattiert und nach 30, 45 min., 1, 2, 5, 10, 24, 30 und 48 Stunden (h) mit Tx100-haltigem Lysis-Puffer lysiert (Abb.18). Die hohe Serum-Konzentration (HS) im BME-Medium, sowie die Kontakt-Inhibition der Zellen nach der Trypsinierung führte zu einer Synchronisation des Zell-Zyklus aller Zellen (Hill et al 1977, Schorl & Sedivy 2007). Des Weiteren wurden zwei Oli-*neu* Kulturen mit unterschiedlich langen Kultur-Zeiträumen gewählt (die Zellen wurden 27 bzw. 44x trypsiniert und in neue Kulturschalen ausgesät: P27 und P44). Neben PLL-beschichteten Kulturschalen wurden die Oli-*neu* Zellen auch in unbeschichtete Kulturschalen ausgesät bzw. in 15ml-Reaktionsgefäßen in Suspension gehalten.

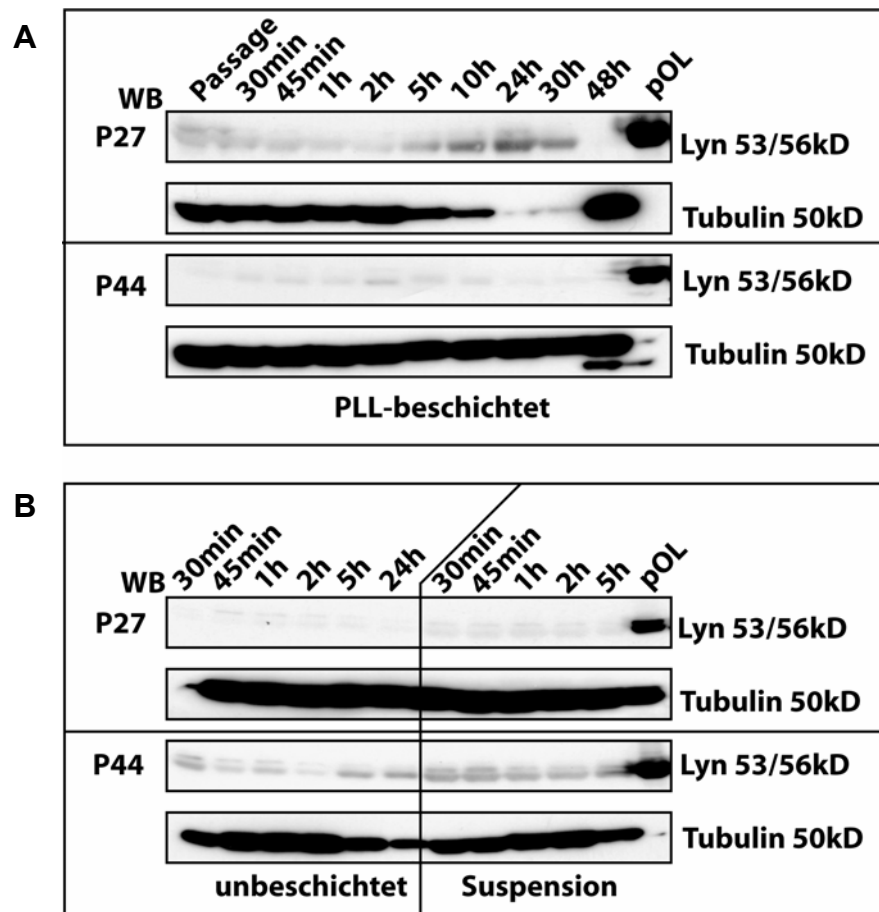


Abbildung 18: Western Blot zur Detektion der Lyn Expression in Oli-*neu* Zellen unter verschiedenen Kulturbedingungen und -zeiten

Oli-*neu* Lysate wurden trypsinisiert und in BME/10%HS pelletiert (Passage, P), sowie für 30, 45min, 1, 2, 5, 10, 24 und 48h nach der Passage der Zellen auf unterschiedlich beschichteten Kulturschalen bzw. in Suspension kultiviert. Tubulin dient als Ladekontrolle. Lysat aus primären Oligodendrozyten (pOL) dient als Positiv-Kontrolle. A: Die zeitliche Expression von Lyn in Oli-*neu* P27 ist in der Passage und nach 24h am höchsten, in P44 nach 2h. B: In unbeschichteten Schalen (links) ist die Lyn Expression in P27 nach 1h und in P44 nach 30min und 24h am höchsten. In der Suspension ist die Expression gleich bleibend, in allen anderen Fällen kann eine zyklische Expression beobachtet werden.

In Abb.18A wird deutlich, daß die Lyn Expression in den Oli-*neu* Zellen von P27 und P44 unterschiedlich ist. Die Zellen von P27 exprimieren Lyn Kinase hauptsächlich direkt in der Passage und nach 24 Stunden Kultivierung, die Zellen von P44 haben die höchste Lyn Kinase Expression nach 2 Stunden. In beiden Fällen scheint die Expression der Lyn Kinase zyklisch zu verlaufen. Wiederholungen dieses Experiments zeigen, daß die Expression der Lyn Kinase immer unterschiedlich ist, dass das Expressionmuster jedoch immer zyklisch verläuft und ca. einen 24 Stunden-Rhythmus einhält.

Abb.18B zeigt die Lyn Kinase Expression in Zellen, die auf unbeschichteten Kulturschalen wuchsen (links) oder in Suspension gehalten wurden (rechts). Die

Zellen, die auf den unbeschichteten Kulturschalen gewachsen sind, haben ebenfalls eine zyklische Expression (höchste Expression von P27: nach 45min., von P44: nach 30min. und 24h), wohingegen die Zellen in Suspension eher eine gleichbleibende, schwache Expression der Lyn Kinase zeigen.

4.1.5 Lyn Kinase Expression in Mikrodomänen (*rafts*) von Oligodendrozyten und Myelin

Nachdem untersucht wurde, wann die Lyn Kinase in Oligodendrozyten, im Myelin und in der Zelllinie Oli-*neu* exprimiert wird, sollte als Nächstes ermittelt werden, wo die Lyn Kinase in der Plasmamembran lokalisiert ist. Es wurden Mikrodomänen oder *rafts* der Plasmamembran isoliert (3.2.9) und die Verteilung der Lyn Kinase in der Plasmamembran untersucht. Die *rafts* sammeln sich dabei aufgrund ihrer Dichte in Fraktion 1 (F1), die anderen Fraktionen beinhalten Bestandteile der Zelle die sich entsprechend ihrer Dichte in dem Sukrose-Gradienten verteilen. Fraktion 5 (F5) hat die größte Sukrose-Dichte. In Abb.19 sind die Fraktionen der Sukrose-Dichte-Zentrifugation aus primären Oligodendrozyten zu sehen. Der Nachweis der drei NCAM Isoformen mittels Antikörper Detektion diente als Kontrolle, da nur die Isoform NCAM120 in *rafts* lokalisiert ist. Der Nachweis der Lyn Kinase erfolgte mit einem Lyn-spezifischen Antikörper. Die Isolierung der *rafts* ist gelungen, da nur NCAM120 in den Fraktionen F1-F3 zu finden ist. Es konnten beide Isoformen der Lyn Kinase sowohl in F1 (*rafts*), als auch in F5 (außerhalb von *rafts*) nachgewiesen werden.

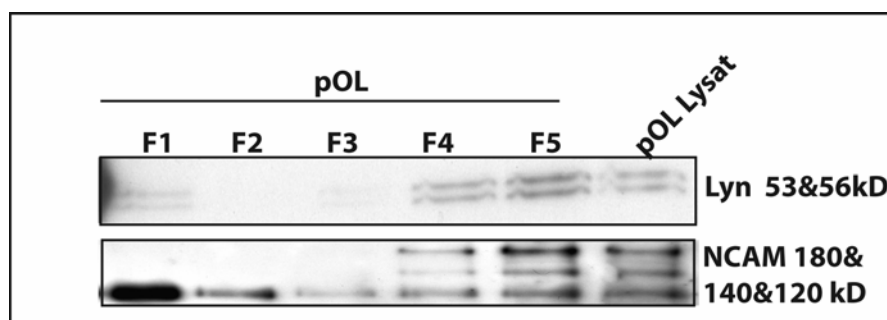


Abbildung 19: Expression der Lyn Kinase in Mikrodomänen der Plasmamembran (*rafts*), Sukrose-Dichte-Gradienten-Zentrifugation aus primären Oligodendrozyten, Western Blot

Tx100-haltiges Lysat aus primären Oligodendrozyten, 5 Tage Kultur. Das Gesamt-Lysat aus primären Oligodendrozyten dient als Positiv-Kontrolle. Von links nach rechts: Fraktion 1 (F1, *rafts*), F2, F3, F4, F5. Die Dichte der Bestandteile nimmt entsprechend der Sukrose-Dichte von F1-F5 zu. Der Nachweis der drei NCAM Isoformen diente als Kontrolle, da nur NCAM120 in *rafts* lokalisiert ist. Lyn ist sowohl in der *raft*-Fraktion (F1) als auch ausserhalb von *rafts* zu finden (F4 und F5).

Die Fraktionen der Sukrose-Dichte-Zentrifugation aus Myelin unterschiedlichen Alters ist in Abb.20 gezeigt. Abb.20A zeigt die Lyn Expression in Myelin aus Mäusen (postnataler Tag (P) 8-60). Die Expression der Lyn Kinase nimmt mit dem Alter der Mäuse ab. Gleiche Mengen wurden für die *raft*-Isolierung eingesetzt (Abb.20B). Im Myelin von 8-16 Tage alten Mäusen (P8-P16) ist die Lyn Kinase sowohl in der *raft*-Fraktion, als auch außerhalb von *rafts* zu detektieren. Im Myelin von 20-60 Tage alten Mäusen (P20-60) ist die Lyn Kinase nur noch in der *raft*-Fraktion zu finden. Die Lyn Kinase Expression nimmt jedoch insgesamt, auch in der *raft*-Fraktion, ab (Abb.20C).

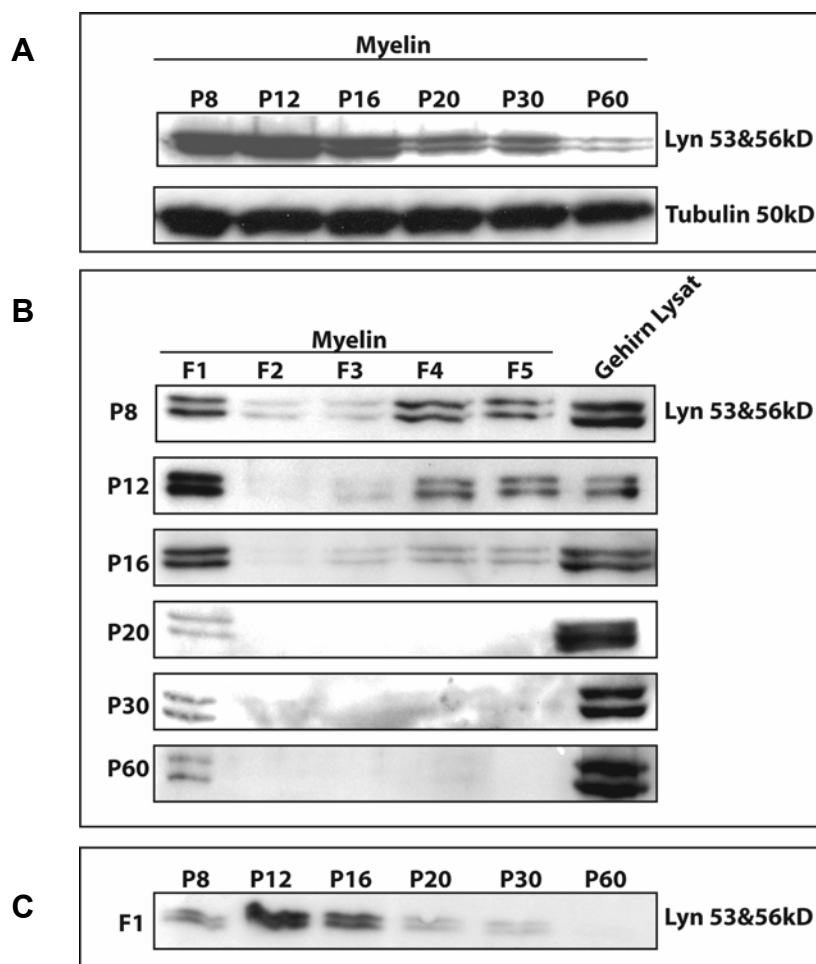


Abbildung 20: Expression der Lyn Kinase in Mikrodomänen der Plasmamembran (*rafts*), Sukrose-Dichte-Gradienten-Zentrifugation aus Myelin, Western Blot

Das Myelin wurde aus Mäusen postnataler Tag (P) 8, 12, 16, 20, 30 und 60 isoliert. A: Lyn Expression in Myelin, Tubulin dient als Ladekontrolle; gleiche Mengen wurden für die *raft* Isolierung eingesetzt. B: *Raft* Isolierung aus Myelin (P8-60), von links nach rechts: F1 (*raft*-Fraktion), F2, F3, F4, F5, die Dichte der Bestandteile nimmt entsprechend der Sukrose-Dichte von F1 bis F5 zu. Das Gehirnlisat dient als Positiv-Kontrolle. Lyn ist im Myelin (P8-P16) sowohl in *rafts* als auch in anderen Bestandteilen zu finden. Im Myelin älterer Mäuse (P20-P60) ist insgesamt weniger Lyn Protein zu detektieren, die Lyn Kinase konzentriert sich nun hauptsächlich in den *rafts*. C: *Raft* Fraktionen des Myelins. Die höchste Lyn Expression in *rafts* des Myelins ist in P12-P16 zu detektieren.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Lyn Kinase in Oligodendrozyten, Neuronen und Astrozyten *in vitro*, als auch im Myelin *in vivo* exprimiert wird. Färbungen von Gehirnschnitten haben die Expression der Lyn Kinase in Oligodendrozyten *in vivo* bestätigt. Die Expression ist im Myelin mit ansteigendem Alter der Mäuse reduziert. In Oligodendrozyten nimmt sie *in vitro* bei andauernder Kultivierung ab. Dies ist mit der fortschreitenden Reifung der Oligodendrozyten zu erklären, da Immunfluoreszenzfärbungen gezeigt haben, dass die Lyn Kinase hauptsächlich in undifferenzierten Zellen exprimiert wird und diese Expression mit der Reifung der Zellen abnimmt. In der Oligodendrozyten Zelllinie Oli-*neu* konnte keine Expression der Lyn Kinase nachgewiesen werden, bis zeitabhängige Experimente deutlich machten, dass die Lyn Kinase Expression in Oli-*neu* Zellen sehr kurzfristig ist und sich zyklisch verhält. Untersuchungen der Lyn Kinase Expression in *rafts* aus primären Oligodendrozyten und Myelin haben gezeigt, dass die Lyn Kinase sowohl in *rafts* als auch in anderen Bereichen der Plasmamembran zu finden ist. Die Lyn Kinase Expression in Myelin nimmt insgesamt mit dem Alter der Mäuse ab und ist dann zunehmend in den *rafts* zu finden.

4.2 Aktivität und Funktion der Src-Kinase Lyn

Nachdem die Expression der Lyn Kinase in Zellen des zentralen Nervensystems *in vivo* und *in vitro* untersucht wurde, soll nun die mögliche Funktion dieses Proteins näher analysiert werden. Dafür soll zunächst festgestellt werden, zu welchem Zeitpunkt die Lyn Kinase aktiv ist.

In Abb.21 wurden die *raft*-Fraktionen aus Myelin (P8-16) einer Kinase-Aktivitäts-Prüfung unterzogen (3.2.6). Links ist die gesamte *raft*-Fraktion zu sehen und rechts nach einer Immunpräzipitation mit einem Lyn-spezifischen Antikörper. In den *raft*-Fraktionen kann keine Lyn Kinase Aktivität detektiert werden. Die Anreicherung der Lyn Kinase aus den Lysaten durch eine Immunpräzipitation erleichtert die Detektion. Hier ist eine Bande bei ca. 53/56kD festzustellen. Die Aktivität ist in P8 schwach, in P12 am höchsten und nimmt dann wieder ab. Dies korreliert mit der Expression der Lyn Kinase.

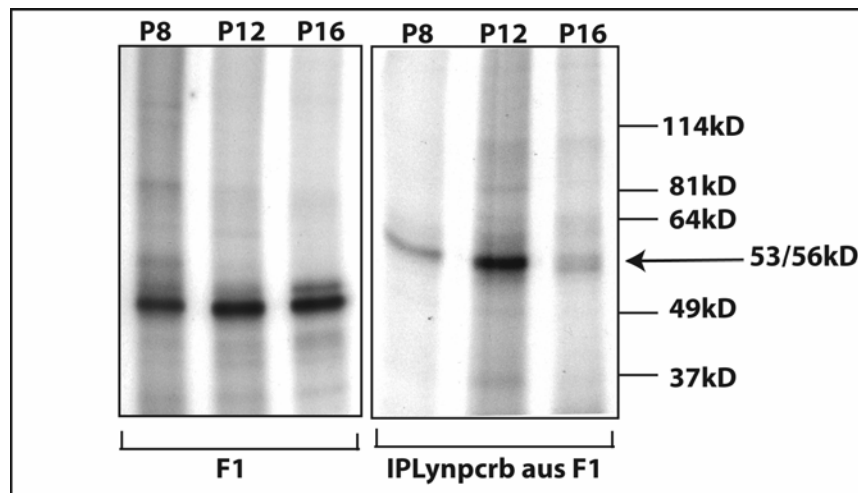


Abbildung 21: Lyn Kinase Aktivität in *rafts* und in Immunpräzipitationen aus *rafts* des Myelins nach einer Kinase-Aktivitäts-Prüfung mit ATP³², Autoradiografie

Kinase-Aktivitäts-Prüfung mit ATP³² und anschließende *raft*-Isolierung aus Myelin. Auftrennung der Proteine auf einem 4-12% SDS-Gel. Links: *Raft*-Fraktionen (F1) Rechts: Immunpräzipitation mit einem polyklonalen Lyn-spezifischen Antikörper aus den *raft*-Fraktionen (IPLynpcrb). Von links nach rechts: jeweils P8, P12, P16. Die Aktivität ist in der *raft*-Fraktion erst detektierbar, nachdem eine Anreicherung der Lyn Kinase mit einer Immunpräzipitation stattgefunden hat. Die Aktivität der Lyn Kinase ist in den *rafts* (F1) P12 am höchsten.

4.2.1 Transfektion von Lyn Konstrukten in Oligodendrozyten

Um die Funktion der Lyn Kinase näher zu untersuchen wurden Plasmide mit unterschiedlichen Lyn Konstrukten hergestellt. Die ursprünglichen Konstrukte wurden von Prof. Petr Draber der Karls-Universität Prag zur Verfügung gestellt. Es handelt sich dabei um die beiden Wildtyp Lyn-Isoformen *Awt* und *Bwt*, den Kinase inaktiven Formen (*B*: K279R, *A*: Δ KD) und der Isoform *B* als konstitutiv aktive Form (*Y508F*) (3.3). Alle Konstrukte sind 2,3kb groß, nur die inaktive Form Δ KD ist 1,5kb groß, da die SH1-Domäne deletiert wurde. Dies entspricht Proteinen mit einer Größe von 80 bzw. 60kD.

4.2.1.1 Nachweis der Expression und Aktivität der Lyn Konstrukte in den Zellen

Abb.22 zeigt transfizierte Oli-*neu* Zellen. Von oben nach unten sieht man Zellen mit den Wildtyp-Konstrukten *Awt* und *Bwt*, Zellen mit den inaktiven Konstrukten K279R und Δ KD und dem konstitutiv aktiven Konstrukt *Y508F*. Als Kontrollen dienten Oli-*neu* Zellen, die mit *EGFP*-pCMV transfiziert wurden und nicht transfizierte Zellen. Links sieht man eine Fluoreszenzaufnahme des GFP, rechts eine Phasenkontrastaufnahme der Zellen. Vergleicht man Kontroll-Zellen mit Zellen, die ein Wildtyp-Konstrukt tragen, so kann man keine morphologischen Veränderungen feststellen. Oli-*neu* Zellen, die mit einem inaktiven Konstrukt transfiziert wurden,

haben eine höhere Anzahl an Ausläufern als nicht transfizierte Zellen. Zellen, die mit dem konstitutiv aktiven Konstrukt transfiziert wurden haben dagegen wenige, kurze Ausläufer.

Zunächst sollten die Konstrukte getestet werden. In Abb.23 ist ein Western Blot der transfizierten Oli-*neu* Zellen (A) und primären Oligodendrozyten (B) zu sehen. In Abb.23A sind von links nach rechts dargestellt: Oli-*neu* transfiziert mit *Awt*, *Bwt*, *K279R*, Δ *KD*, *Y508F* und dem *EGFP*-pCMV Vektor. Als Positiv-Kontrolle diente ein Gehirn-Lysat (gemischtes Kultur). Der Lyn Antikörper (Lyn AB) erkennt das ektopischen Lyn-GFP (80kD bzw. 60kD (Δ KD)) als auch die endogen exprimierte Lyn Kinase (53/56kD). Darunter wurde die Expression von GFP mit einem GFP-spezifischen Antikörper nachgewiesen (GFP-AB). Es wird das ektopische Lyn-GFP bestätigt und das EGFP in der Kontrolle erkannt (25kD). Ein Antikörper, der ausschließlich aktive Src-Kinasen erkennt (pY418), zeigt im unteren Blot, dass *Awt* und *Bwt* und das konstitutiv aktive *Y508F* Aktivität zeigen, wohingegen die beiden inaktiven *K279R* und Δ *KD* keinerlei Aktivität aufweisen. Dadurch wurde bestätigt, dass die transfizierten Konstrukte in Proteine translatiert werden können, diese Proteine durch einen Lyn Antikörper, sowie durch einen GFP-Antikörper erkannt werden und die zu erwartenden Aktivitäten vorhanden sind. In Abb.23B sind primäre Oligodendrozyten mit *Awt*, *K279R* und *Y508F* transfiziert und die Resultate der Ergebnisse in Abb.23A bestätigt worden.

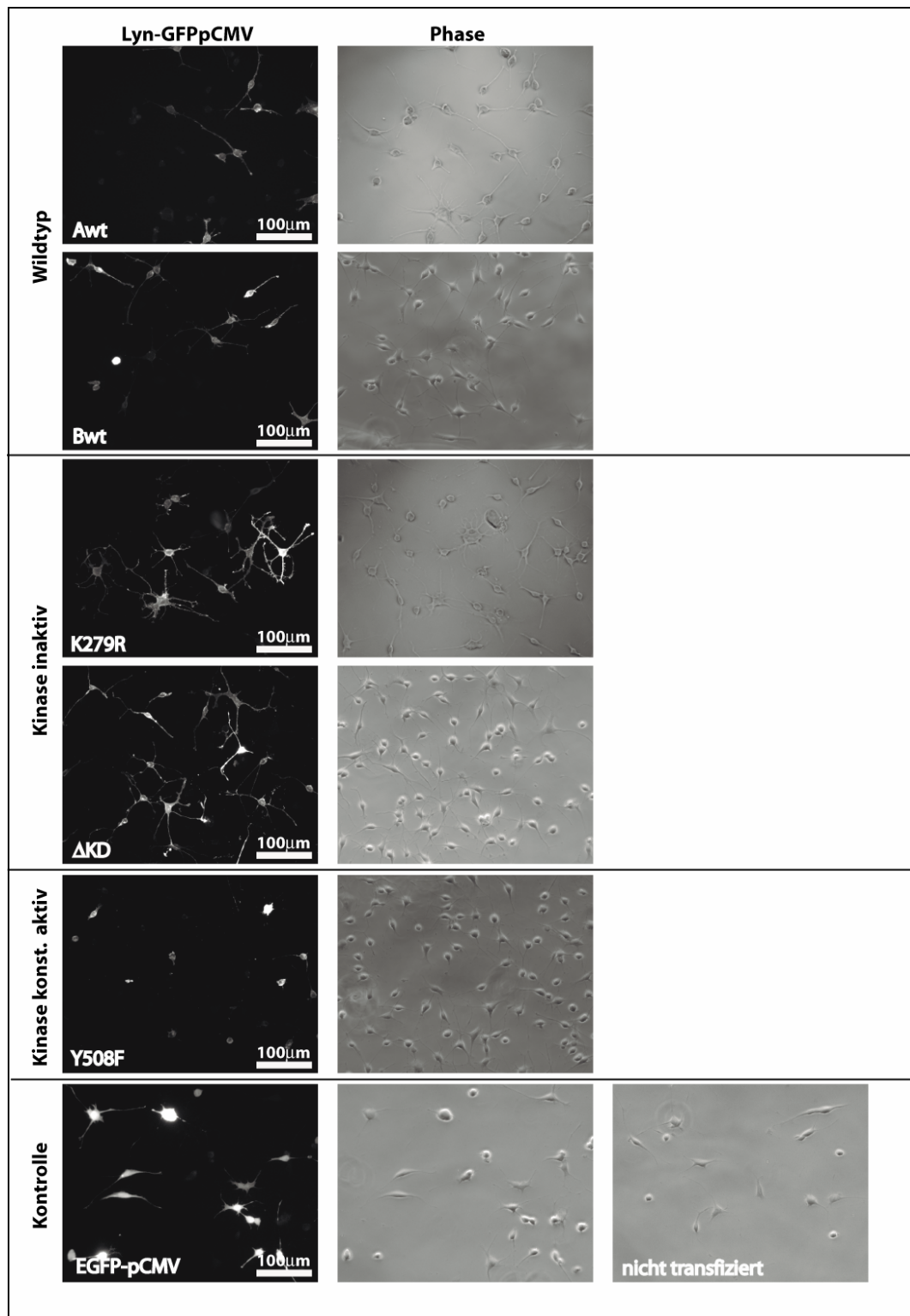


Abbildung 22: Oli-*neu* Zellen transfiziert mit *Lyn-GFP-pCMV* Konstrukten und Kontrollen mittels Elektroporation;

Von oben nach unten: Oli-*neu* transfiziert mit *Awt*, *Bwt*, *K279R*, *LynΔKD* und *Y508F*. Der *EGFP-pCMV* Leervektor dient als Kontrollvektor, daneben sieht man nicht transfizierte Zellen. Links ist jeweils das entsprechende Phasenkontrast-Bild (Phase) zu sehen. Oli-*neu* Zellen, die mit den Wildtyp-Konstrukten transfiziert wurden entsprechen morphologisch den Oli-*neu* Zellen, die nicht oder mit einem Leervektor transfiziert wurden. Oli-*neu* Zellen, transfiziert mit einem inaktiven *Lyn*-Konstrukt, haben eine erhöhte Anzahl an Zellausläufern, wohingegen Zellen, die mit dem konstitutiv aktiven *Lyn*-Konstrukt transfiziert wurden, weniger Ausläufer bilden.

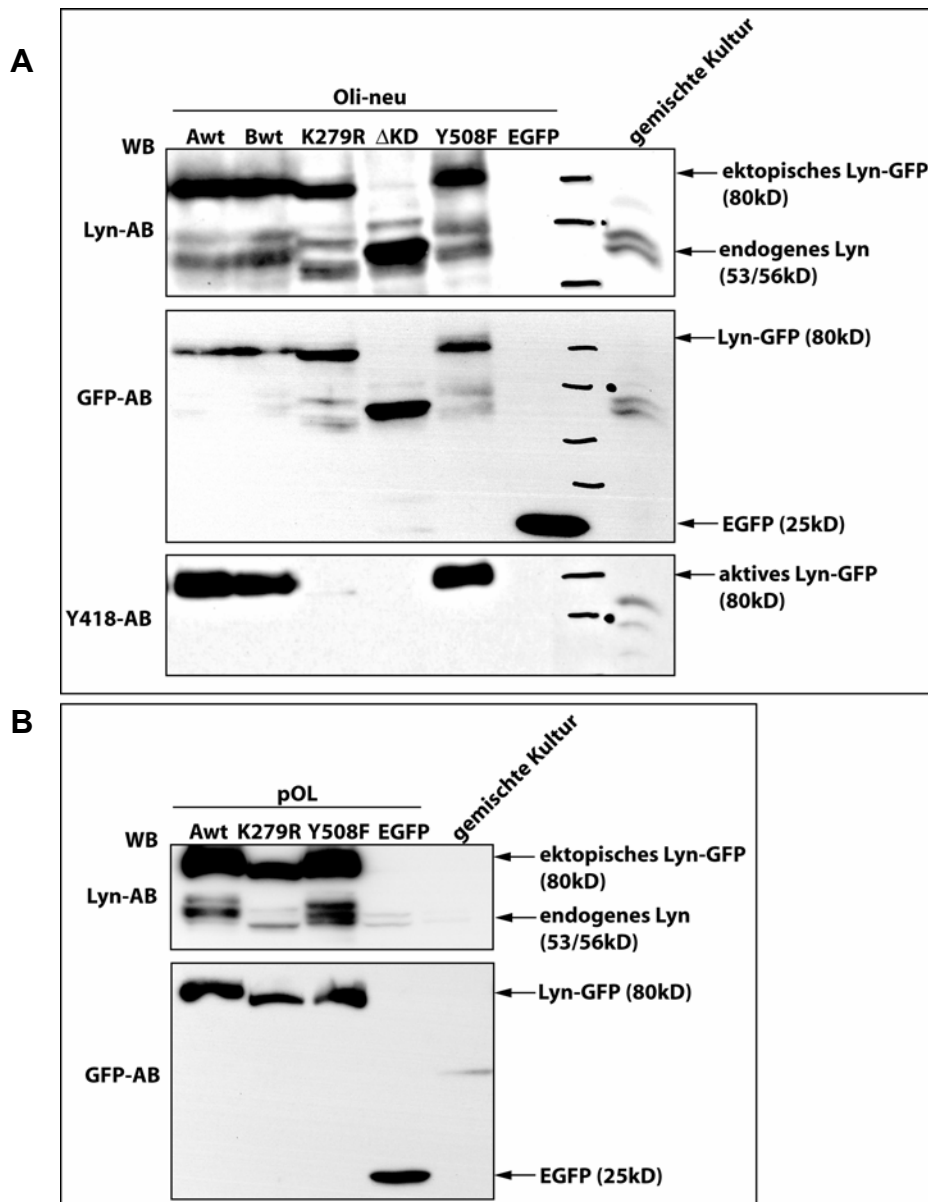
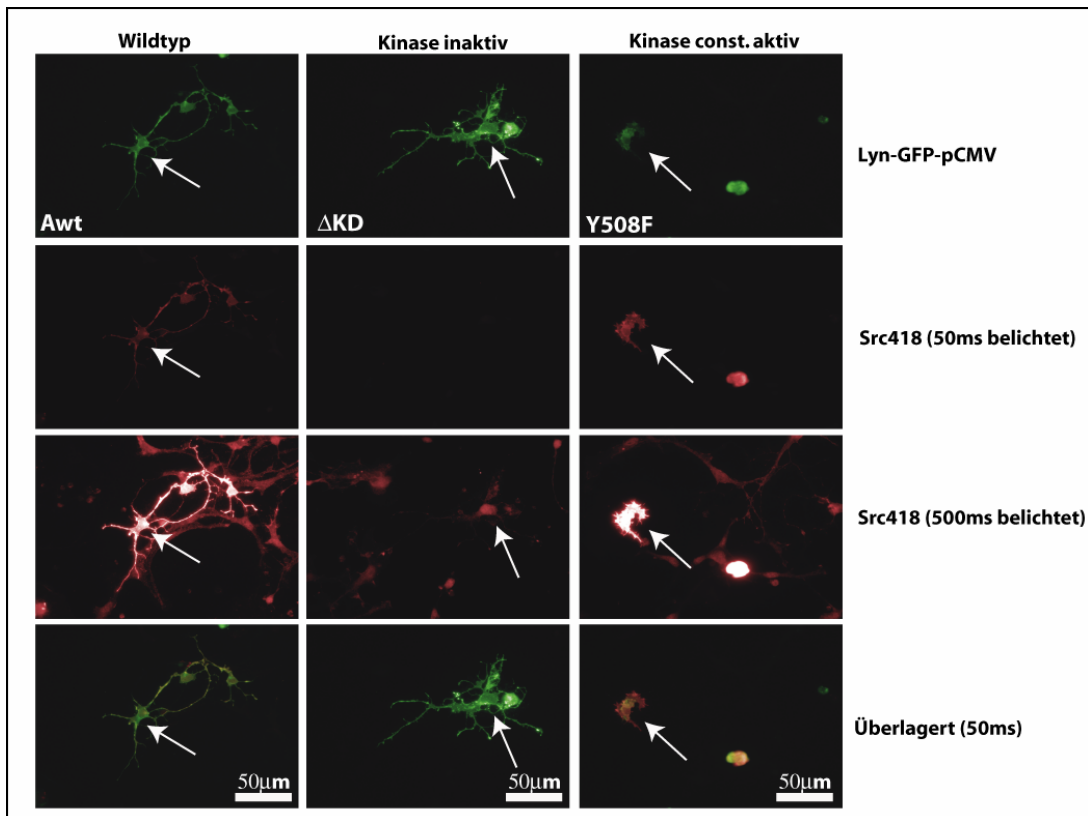


Abbildung 23: Western Blot Nachweis der Transfektion von *Lyn-GFP*-pCMV Konstrukten in *Oli-neu* Zellen (A) und primären Oligodendrozyten (B).

A: Lysate aus transfizierten *Oli-neu* Zellen. Von links nach rechts transfiziert mit *Awt*, *Bwt*, *K279R*, *LynΔKD* und *Y508F*. Als Kontrolle dienen *Oli-neu* Zellen transfiziert mit dem Leervektor *EGFP*-pCMV und Lysat aus einer Gehirnkultur (gemischte Kultur). In der oberen Abbildung kann sowohl das ektopische *Lyn-GFP* als auch das endogene *Lyn* mit einem *Lyn*-spezifischen Antikörper in allen Lysaten nachgewiesen werden. Darunter sieht man den Nachweis des *Lyn-GFP* als auch des *EGFP* in der Kontrolle mit einem *GFP*-spezifischen Antikörper. Darunter wird die Aktivität der *Lyn* Kinase mit einem Antikörper nachgewiesen, der ausschließlich aktive *Src*-Kinasen erkennt (pY418). Beide Wildtyp-Konstrukte (*Awt*, *Bwt*) und das konstitutiv aktive *Lyn* (*Y508F*) zeigen Aktivität, wohingegen die beiden inaktiven Konstrukte (*K279R*, *ΔKD*) keinerlei Aktivität zeigen. **B:** Die primären Oligodendrozyten (pOL) wurden mit *Awt*, *K279R*, *Y508F* und *EGFP* transfiziert und die Proteine mit einem *Lyn*-spezifischen und *GFP*-spezifischen Antikörper nachgewiesen. Ein Gehirnkultur (gemischte Kultur) diente als Kontrolle.

Die unterschiedliche Aktivität der *Lyn* Kinasen kann auch in einer Immunfluoreszenzfärbung demonstriert werden. Primäre Oligodendrozyten wurden mit *Awt*, *ΔKD* und *Y508F* transfiziert (*GFP*-gekoppelt) und die Zellen nach drei Tagen



Von links nach rechts: Zellen transfiziert mit *Awt*, ΔKD und *Y508F*. Von oben nach unten: GFP (grün), Src118 (rot). Belichtungszeiten: 50ms und 500ms. Darunter sieht man eine

4.2.1.2 Auswirkungen der Lyn Kinase Aktivität auf die Morphologie der Oligodendrozyten

In Abb.22 wurde bereits gezeigt, dass die Transfektion der *Lyn-GFP*-pCMV Konstrukte in *Oli-neu* Zellen zu einer Veränderung der Zellmorphologie führt. Die Zellen, die mit einem der Wildtyp-Konstrukte transfiziert wurden haben keine morphologische Veränderung im Vergleich zu nicht transfizierten oder *EGFP*-pCMV transfizierten Zellen. *Oli-neu* Zellen, transfiziert mit einem inaktiven Konstrukt, haben eine höhere Anzahl an Ausläufern, wohingegen die Zellen, die mit dem konstitutiv aktiven Konstrukt transfiziert wurden wenige, kurze Ausläufer haben.

Um festzustellen, ob die betroffenen Ausläufer Tubulin- oder Aktin-gestützte Ausläufer sind, wurde nach der Transfektion eine Immunfluoreszenzfärbung mit Antikörpern gegen Tubulin bzw. gegen Aktin durchgeführt.

Abb.25 zeigt transfizierte *Oli-neu* Zellen. Von oben nach unten transfiziert mit *Awt*, *Bwt*, *K279R*, ΔKD und *Y508F*. Als Kontrollen dienten *Oli-neu* Zellen, die mit *EGFP*-pCMV transfiziert wurden und nicht transfizierte Zellen. Von links nach rechts ist die Fluoreszenz des Lyn-GFP gezeigt (grün), die Tubulin-Färbung (violett) und eine Überlagerung beider vorheriger Bilder mit zusätzlicher Anfärbung des Zellkerns mit DAPI (blau), sowie eine Vergrößerung des überlagerten Bildes bei Zellen transfiziert mit *Awt* und *K279R*. Die Anzahl der Tubulin-gestützten Ausläufer ist in *LynAwt/Bwt*-transfizierten Zellen genauso groß, wie in den Kontrollen. Zellen, transfiziert mit einem inaktiven Konstrukt haben mehr Tubulin-gestützte Ausläufer, aber auch mehr kleinere Ausläufer, die nicht Tubulin beinhalten. Zellen, transfiziert mit *Y508F*, haben deutlich weniger oder gar keine Tubulin-gestützten Ausläufer. Die Vergrößerungen zeigen, dass die Lyn Kinase und Tubulin im Bereich der Plasmamembran eine Co-Verteilung aufweisen (Pfeile), die kleinen Lyn-positiven Ausläufer sind jedoch Tubulin-negativ.

In Abb.26 sind ebenfalls transfizierte *Oli-neu* Zellen zu sehen, jedoch mit einer Immunfluoreszenzfärbung gegen Aktin (rot).

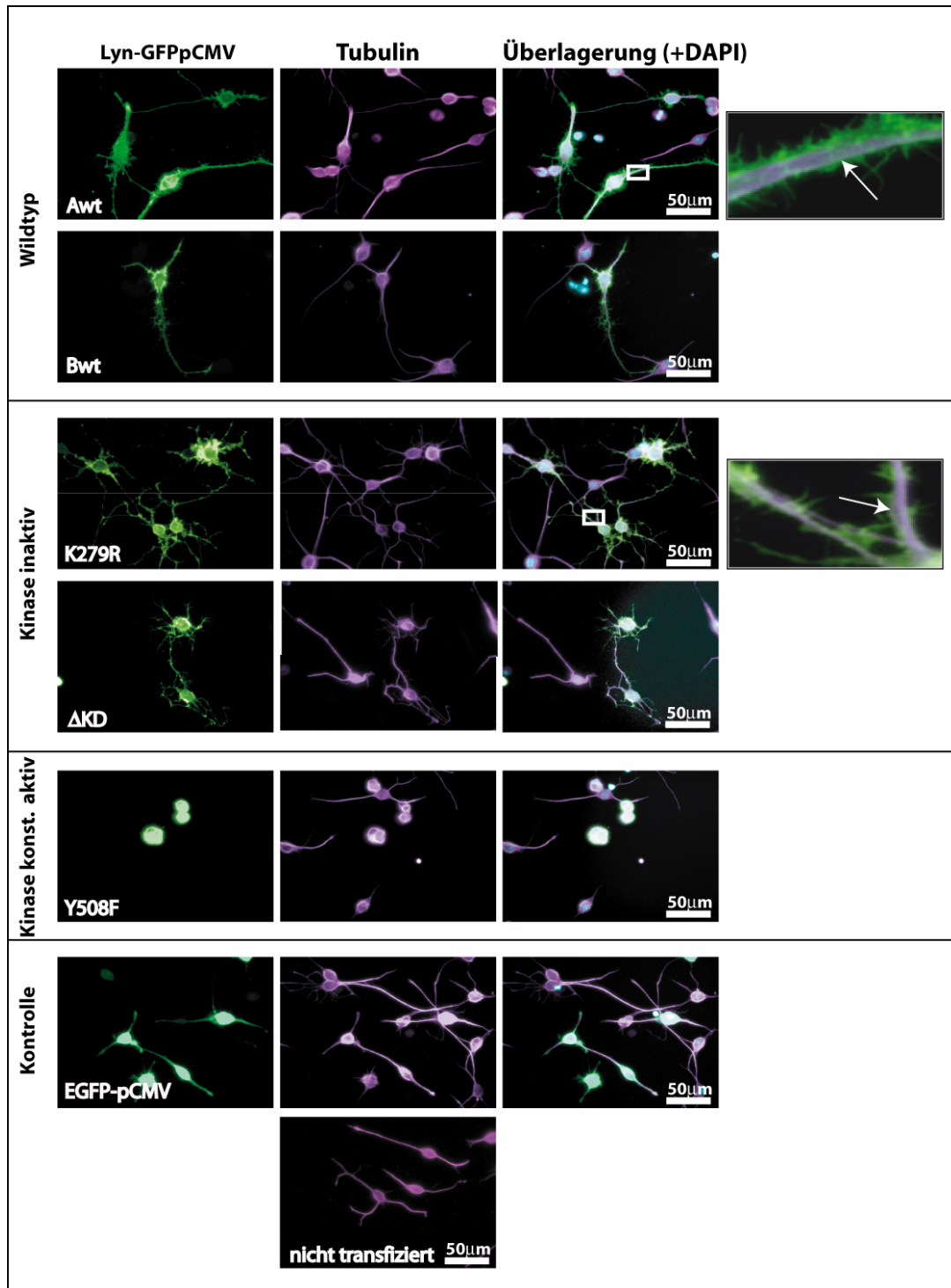


Abbildung 25: Morphologische Veränderungen von Oli-neu Zellen nach Transfektion mit Lyn-GFP-pCMV-Konstrukten und Immunfluoreszenzfärbung mit einem Antikörper gegen β -Tubulin.

Von oben nach unten: Oli-neu Zellen transfiziert mit Awt, Bwt, K279R, Lyn Δ KD und Y508F. Der EGFP-pCMV Leervektor diente als Kontrollvektor, sowie nicht transfizierte Zellen. Von links nach rechts: GFP (grün) der Lyn-GFP Konstrukte, Immunfluoreszenzfärbung gegen β -Tubulin (violett), Überlagerung beider vorhergehender Bilder und Zellkernfärbung mit DAPI (blau).

Oli-neu Zellen, transfiziert mit einem inaktiven Lyn-Konstrukt (K279, Δ KD), haben eine erhöhte Anzahl und Menge an Zellausläufern, wohingegen Zellen, die mit dem konstitutiv aktiven Lyn-Konstrukt transfiziert wurden (Y508F), weniger Ausläufer besitzen. Diese Ausläufer sind hauptsächlich Tubulin-gestützte Ausläufer. In den Vergrößerungen sind Co-Verteilungen von Lyn und Tubulin in weiß zu sehen (Pfeile). Kleinere Ausläufer sind Lyn-positiv, aber Tubulin-negativ.

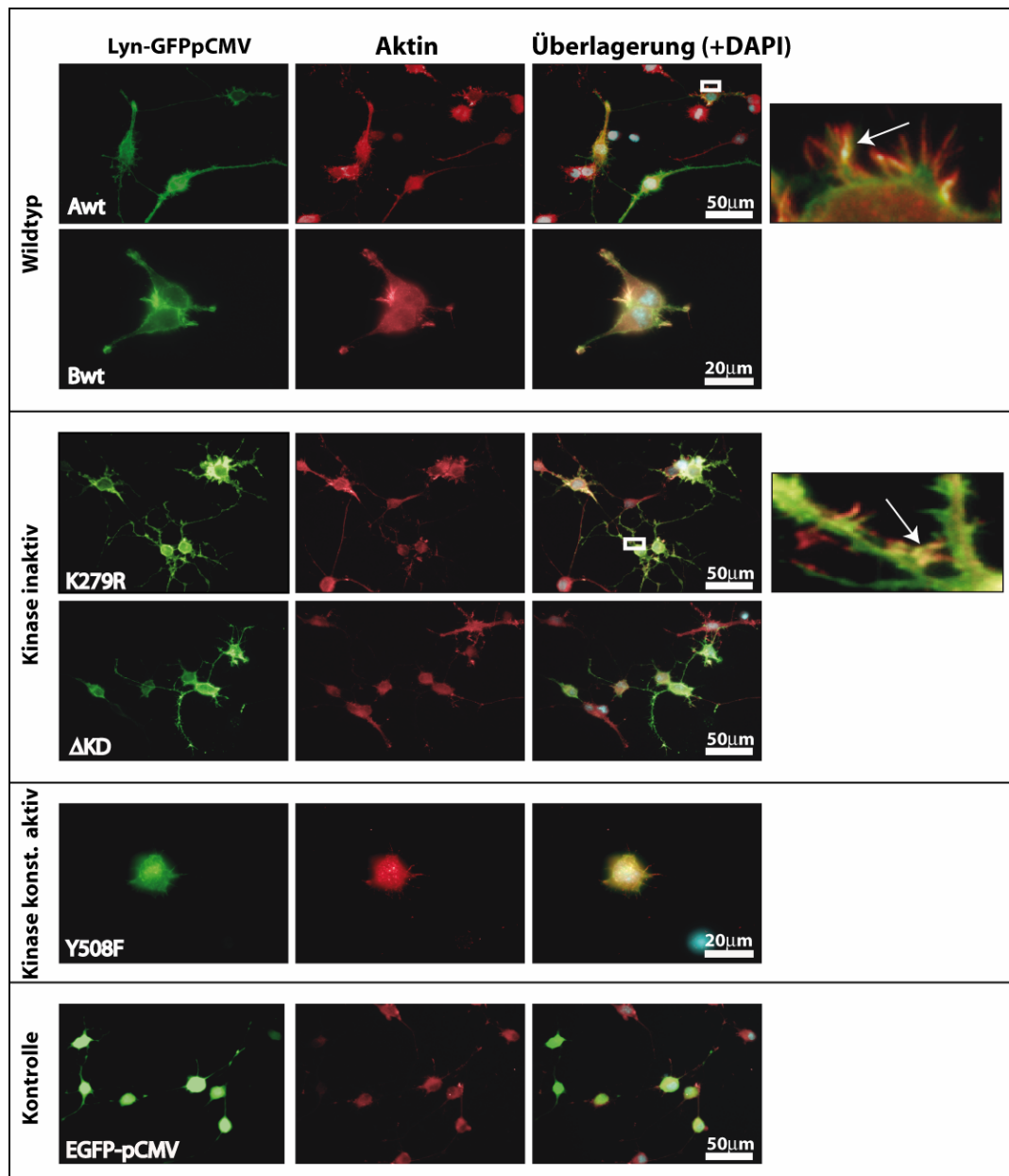


Abbildung 26: Morphologische Veränderungen von Oli-neu Zellen nach Transfektion mit *Lyn-GFP-pCMV*-Konstrukten und Immunfluoreszenzfärbung mit einem Antikörper gegen α -Aktin.

Von oben nach unten: Oli-neu transfiziert mit *Awt*, *Bwt*, *K279R*, *Lyn Δ KD* und *Y508F*. Der *EGFP-pCMV* Leervektor diente als Kontrollvektor, sowie nicht transfizierte Zellen. Von links nach rechts: GFP (grün) der *Lyn-GFP* Konstrukte, Immunfluoreszenzfärbung gegen α -Aktin (rot), Überlagerung beider vorhergehender Bilder und Zellkernfärbung mit DAPI (blau). Oli-neu Zellen, transfiziert mit einem inaktiven Lyn-Konstrukt haben eine erhöhte Anzahl und Menge an Zellausläufern, wohingegen Zellen, die mit dem konstitutiv aktiven Lyn-Konstrukt transfiziert wurden, weniger Ausläufer besitzen. Die kleineren, dünneren Ausläufer sind Aktin-gestützte Ausläufer, Lyn ist auch in diesen Ausläufern lokalisiert und mit Aktin teilweise co-verteilt, wie man in den Vergrößerungen in gelb sieht (Pfeile).

Die Anzahl der Aktin-gestützten Ausläufer ist in *LynAwt/Bwt*-transfizierten Zellen genauso groß, wie in den Kontrollen. Zellen, die mit einem der inaktiven Konstrukte transfiziert wurden haben mehr Aktin-gestützte Ausläufer. Dies bezieht sich sowohl

auf die Ausläufer, die Tubulin- und Aktin-Filamente besitzen, als auch auf die kleineren Ausläufer, die ausschließlich ein Aktin-Zytoskelett besitzen. Zellen, transfiziert mit *Y508F*, haben meist ausschließlich die kleinen Aktin-gestützten Ausläufer. Die Vergrößerungen zeigen, dass die Lyn Kinase und Aktin in den kleinen Ausläufern eine Co-Verteilung aufweisen (gelb, Pfeile).

Da die Mikrotubuli-gestützten Ausläufer in Oli-*neu* Zellen, je nach *Lyn-GFP*-pCMV Transfektion, Unterschiede aufweisen, sollte dies für primäre Oligodendrozyten ebenfalls überprüft werden (Abb.27).

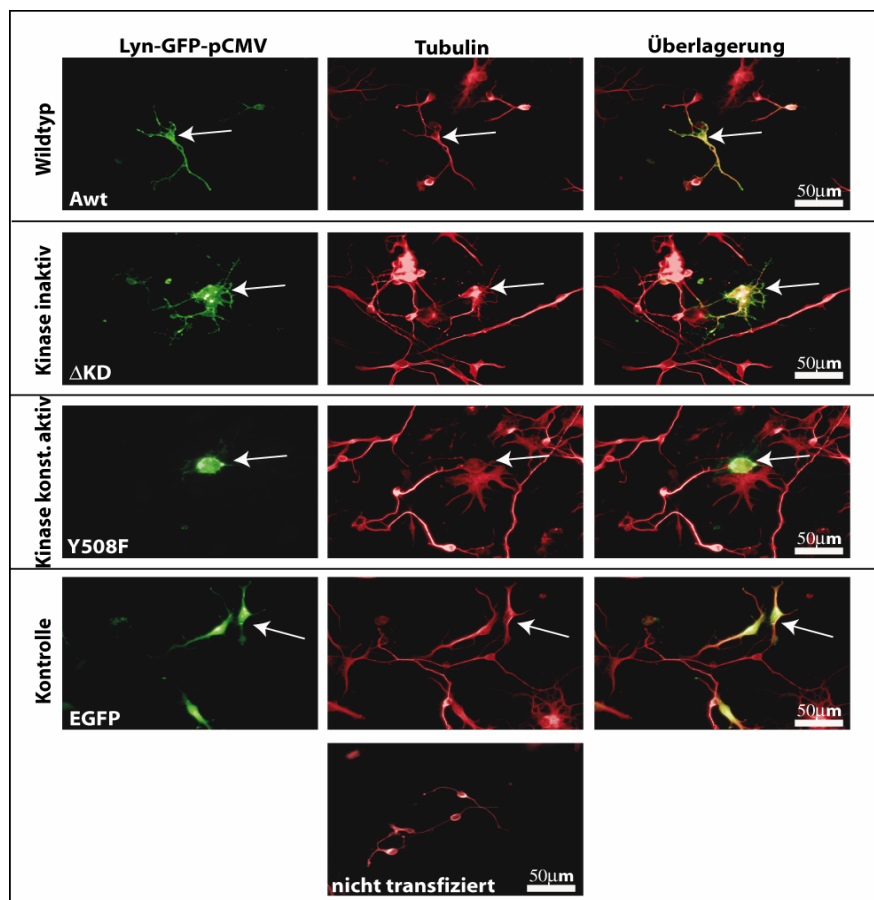


Abbildung 27: Morphologische Veränderungen von primären Oligodendrozyten nach Transfektion mit *Lyn-GFP*-pCMV-Konstrukten und Immunfluoreszenzfärbung mit einem Antikörper gegen α -Tubulin.

Von oben nach unten: pOL transfiziert mit *Awt*, ΔKD und *Y508F*. Der *EGFP*-pCMV Leervektor diente als Kontrollvektor, sowie nicht transfizierte Zellen. Von links nach rechts: GFP (grün) der *Lyn-GFP* Konstrukte, Immunfluoreszenzfärbung gegen α -Tubulin (rot) und eine Überlagerung beider vorherigen Bilder. Die Anzahl der Ausläufer scheint im Vergleich zu nicht transfizierten Zellen unverändert, wenn eine Transfektion mit *Awt* oder *EGFP* stattgefunden hat. Die Anzahl der Ausläufer ist nach Transfektion mit dem inaktiven *Lyn* Konstrukt (ΔKD) erhöht und nach Transfektion mit dem konstitutiv aktiven *Lyn* Konstrukt (*Y508F*) reduziert.

Die Anzahl der Tubulin-gestützten Ausläufer scheint, wie in den *Oli-neu* Zellen, so auch in den primären Oligodendrozyten unverändert zu sein, wenn diese mit dem Wildtyp Konstrukt transfiziert wurden. Zellen, die mit dem inaktiven Konstrukt transfiziert wurden haben mehr Tubulin-gestützte Ausläufer als die Kontrollen, aber auch mehr kleinere Ausläufer, die nicht Tubulin-gestützt sind. Zellen, transfiziert mit dem konstitutiv aktiven Konstrukt, haben deutlich weniger oder gar keine Tubulin-gestützten Ausläufer (Pfeile).

Zur statistischen Auswertung der Zellausläufer Anzahl und Länge von *Oli-neu* Zellen und primären Oligodendrozyten, transfiziert mit den *Lyn-GFP*-pCMV Konstrukten, wurden ausschließlich Ausläufer berücksichtigt, die Mikrotubuli besaßen (3.1.7.1).

Es wurden in drei unabhängigen Experimenten pro Transfektion und Experiment die Ausläufer von jeweils 20 Zellen gezählt und gemessen. Die statistische Analyse wurde mit der Software GraphPad Prism 4 durchgeführt und für die Auswertung der Ausläuferlängen der Mann-Whitney-Test angewandt.

In Abb.28A/B werden die Zellausläufer-Längen der unterschiedlich transfizierten *Oli-neu* Zellen bzw. primären Oligodendrozyten verglichen. Die Zellausläufer-Längen werden in der Anzahl der pixel dargestellt (Y-Achse), auf der X-Achse sind zuerst die Ausläufer-Längen der nicht transfizierten Zellen (Kontrolle) und der *EGFP*-pCMV transfizierten Zellen zu sehen. Anschließend sind in Abb.28A die *Oli-neu* Zellen, die mit den verschiedenen Konstrukten transfiziert wurden, gezeigt. Die Zellausläufer-Länge ist im Vergleich zur Kontrolle in den Zellen transfiziert mit *EGFP*, *Awt*, *Bwt*, ΔKD , *K279R* nicht signifikant unterschiedlich. In *Y508F* transfizierten Zellen ist eine signifikante Verkürzung der Zellausläufer ($p < 0,001$) festzustellen. In Abb.28B werden die Zellausläufer-Längen der unterschiedlich transfizierten primären Oligodendrozyten verglichen. Die Zellausläufer-Länge ist im Vergleich zwischen der Kontrolle und den Zellen transfiziert mit *EGFP*, *Awt* und ΔKD nicht signifikant unterschiedlich. In *Y508F* transfizierten Zellen kann eine signifikante Verkürzung ($p < 0,001$) der Zellausläufer festgestellt werden.

In Abb.28C/D wird die Anzahl der Zellausläufer der unterschiedlich transfizierten *Oli-neu* Zellen und primären Oligodendrozyten verglichen. Die Zellausläufer wurden hierbei gezählt und durch die Gesamtzahl der Zellen geteilt, so daß der Durchschnittswert als Basis für die statistische Auswertung verwendet werden konnte (Y-Achse). Die Darstellung des Experiments in den Grafiken entspricht Abb.28A/B.

Die Anzahl der Zellausläufer von Oli-neu Zellen (Abb.28C) ist im Vergleich zwischen der Kontrolle und den Zellen transfiziert mit *EGFP*, *Awt* und *Bwt* nicht signifikant unterschiedlich. Zellen, transfiziert mit ΔKD und *K279R*, haben eine signifikant höhere Anzahl an Ausläufern. Bei Zellen, die mit dem *Y508F* Konstrukt transfiziert wurden, ist eine signifikant geringere Anzahl an Zellausläufern festzustellen. In beiden Fällen ist die Signifikanz $p < 0,001$.

In Abb.28D wird die Anzahl der Zellausläufer der unterschiedlich transfizierten primären Oligodendrozyten verglichen. Die Anzahl der Zellausläufer ist im Vergleich zwischen der Kontrolle und den Zellen transfiziert mit *EGFP* und *Awt* nicht signifikant unterschiedlich. Die Anzahl der Zellausläufer ist bei Zellen transfiziert mit ΔKD signifikant erhöht ($p < 0,01$). Zellen, die mit *Y508F* transfiziert wurden, weisen eine signifikant geringere Anzahl an Zellausläufern auf ($p < 0,01$).

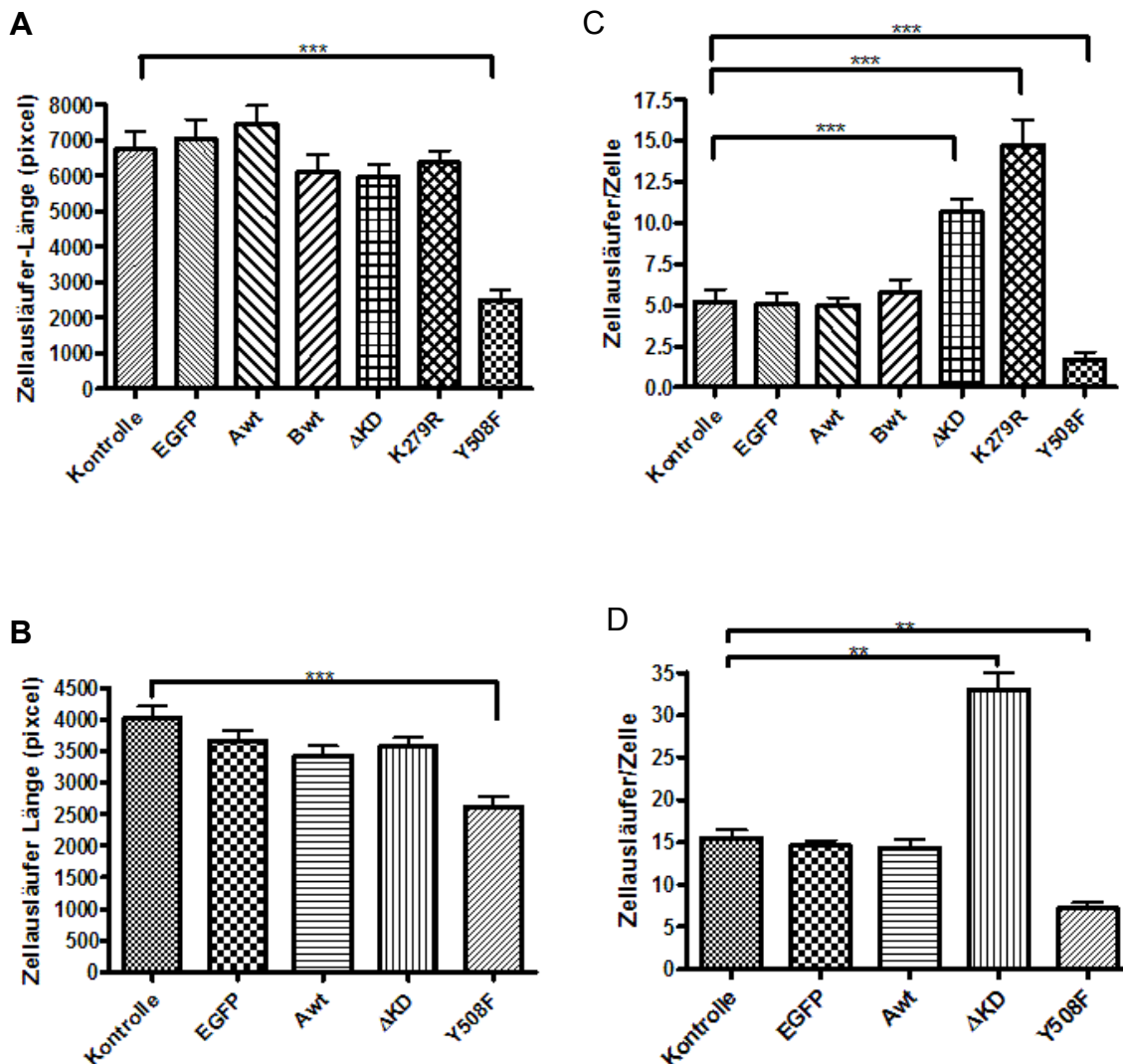


Abbildung 28: Statistische Auswertung der Länge und Anzahl der Zellausläufer von Oli-*neu* Zellen und primären Oligodendrozyten nach Transfektion mit aktiven und inaktiven *Lyn-GFP-pCMV*-Konstrukten.

Die Zellen wurden transfiziert und eine Immunfluoreszenz-Färbung gegen α -Tubulin durchgeführt. Es wurden in drei unabhängigen Experimenten die Ausläufer von jeweils 20 Zellen/Transfektion mit der Software IPLab vermessen und mit GraphPad Prism statistisch ausgewertet. Oli-*neu* Zellen wurden mit *EGFP*, *Awt*, *Bwt*, *K279R*, Δ *KD* und *Y508F* transfiziert, primäre Oligodendrozyten nur mit *EGFP*, *Awt*, Δ *KD* und *Y508F*; nicht transfizierte Zellen dienten als Kontrollen. A: Zellausläufer Länge von Oli-*neu* Zellen; Zellen transfiziert mit *EGFP*, *Awt*, *Bwt*, *K279R* und Δ *KD* haben keine veränderte Zellausläufer Länge im Vergleich zu nicht transfizierten Zellen, *Y508F* hat signifikant kürzere Ausläufer. B: Wie in A, ist auch in primären Oligodendrozyten nur die Ausläufer Länge der Zellen signifikant verändert, die mit *Y508F* transfiziert wurden. C: Anzahl der Zellausläufer/Zelle in Oli-*neu*. Die Anzahl der Ausläufer in Zellen transfiziert mit *EGFP*, *Awt* oder *Bwt* ist im Vergleich zu nicht transfizierten Zellen nicht verändert. Zellen transfiziert mit *K279R* oder Δ *KD* haben signifikant mehr Ausläufer, Zellen transfiziert mit *Y508F* haben signifikant weniger Ausläufer. D: Wie in C, ist auch die Anzahl der Ausläufer von primären Oligodendrozyten in Zellen transfiziert mit Δ *KD* signifikant erhöht und von Zellen transfiziert mit *Y508F* signifikant verkürzt. Analyse der Ausläufer Länge: Mann-Whitney Test, Analyse der Ausläufer Anzahl: Student's t-test; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, $n = 3$

Die Aktivität der Lyn Kinase beeinflusst die Zellausläufer Bildung. Eine aktive Lyn Kinase hemmt die Bildung von Ausläufern in Oligodendrozyten, wohingegen Zellen, deren Lyn Kinase inaktiv ist, viele Zellausläufer bilden können.

Die Bildung von Ausläufern in Oligodendrozyten erfolgt mit der Reifung zu differenzierten Zellen. Beeinflusst die Lyn Kinase ausschließlich die Zellausläufer Bildung oder auch die Reifung der Oligodendrozyten?

Um diese Frage zu beantworten wurde eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Hierbei wurden die, mit den *Lyn-GFP*-pCMV transfizierten, *Oli-neu* Zellen und primären Oligodendrozyten mit Antikörpern gegen entwicklungsspezifische Marker für Oligodendrozyten inkubiert (1.2.2). Es wurde ein früher Oligodendrozyten-Marker gewählt, NG2 (AN2), und ein Marker, der in reifen Oligodendrozyten exprimiert wird, das Myelinprotein MAG.

In Abb.29 sieht man *Oli-neu* Zellen, transfiziert mit den *Lyn-GFP* Konstrukten und nicht transfizierte Zellen. Von links nach rechts ist Lyn grün dargestellt (GFP), AN2 in rot. Das jeweils rechte Bild zeigt eine Überlagerung beider Färbungen mit zusätzlicher Zellkernfärbung mit DAPI (blau). Pfeile zeigen Lyn/NG2 (AN2)-Doppelmarkierungen. Die Anzahl NG2-positiver Zellen nach Transfektion mit einem inaktiven *Lyn-GFP* Konstrukt ist reduziert. Abb.30 zeigt wie in Abb.29 transfizierte *Oli-neu* Zellen, hier wurde jedoch nicht AN2, sondern MAG detektiert. Die Anzahl MAG-positiver Zellen war nach Transfektion mit einem inaktiven *Lyn-GFP* Konstrukt erhöht.

Sowie in den *Oli-neu* Zellen sollten die Ergebnisse auch in den primären Oligodendrozyten überprüft werden. In Abb.31 sind die transfizierten primären Oligodendrozyten mit NG2 (AN2) gefärbt und in Abb.32 mit MAG. Die Anzahl NG2 (AN2)-positiver und MAG-positiver Zellen war in primären Oligodendrozyten genauso beeinflusst wie in *Oli-neu* Zellen.

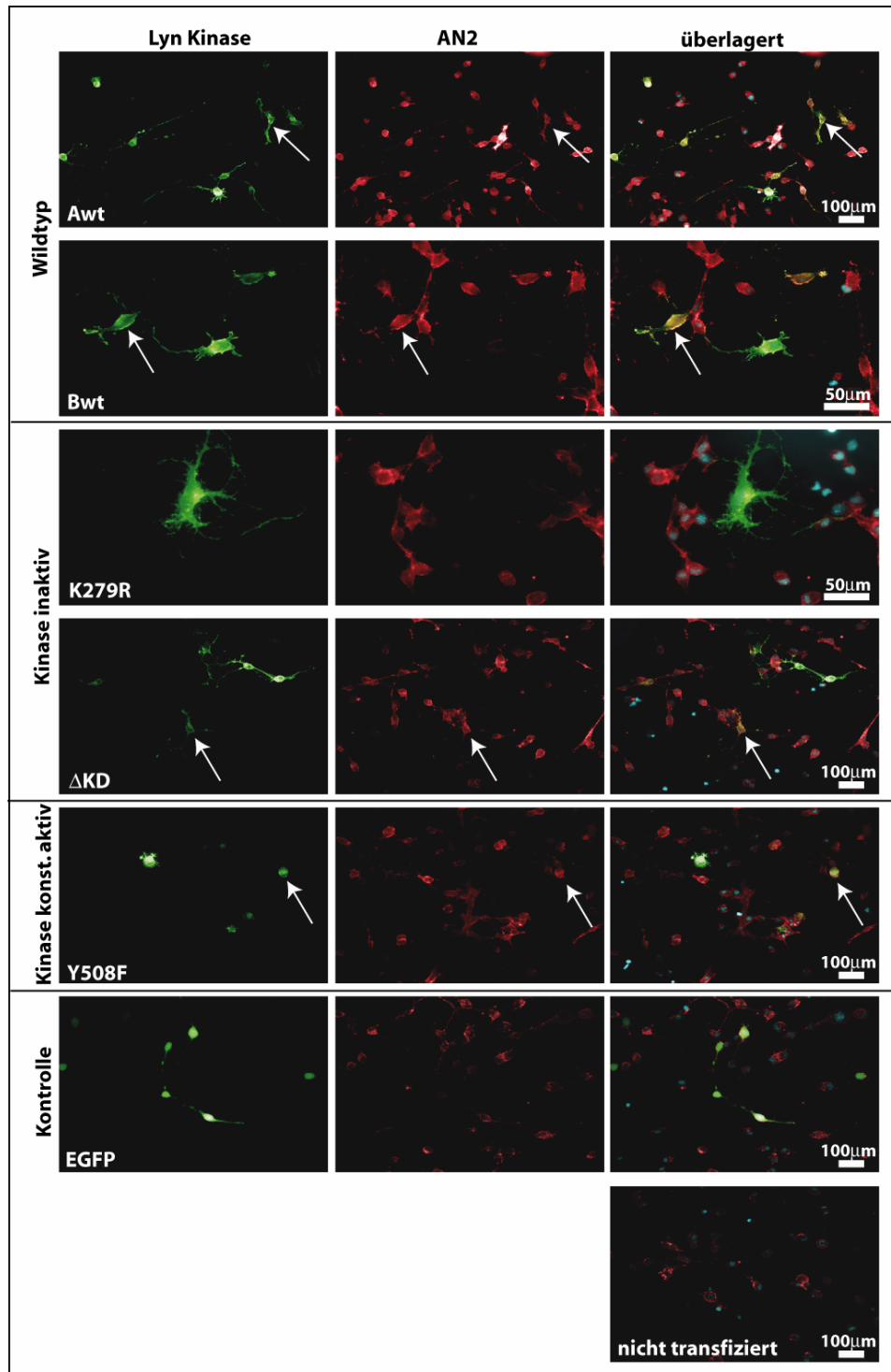


Abbildung 29: Transfektion von Oli-neu Zellen mit *Lyn-GFP*-pCMV Konstrukten und Immunfluoreszenzfärbung mit einem Antikörper gegen NG2 (AN2).

Von oben nach unten: Oli-neu transfiziert mit *Awt*, *Bwt*, *K279R*, *LynΔKD*, *Y508F*, *EGFP* und nicht transfizierte Zellen. Von links nach rechts: GFP (grün) der *Lyn-GFP* Konstrukte, Immunfluoreszenz gegen NG2 (AN2) (rot), Überlagerung beider vorhergehenden Bilder mit zusätzlicher Zellkernfärbung mit DAPI (blau). Oli-neu Zellen transfiziert mit den Wildtyp *Lyn-GFP*-Konstrukten, den inaktiven *Lyn-GFP*-Konstrukten und dem konstitutiv aktiven *Lyn-GFP*-Konstrukt zeigen Co-Expression der Lyn Kinase und NG2 (AN2) (Pfeile). Die Anzahl der NG2-exprimierenden Zellen war bei den Zellen reduziert, die mit einem der inaktiven *Lyn-GFP*-Konstrukte transfiziert wurden.

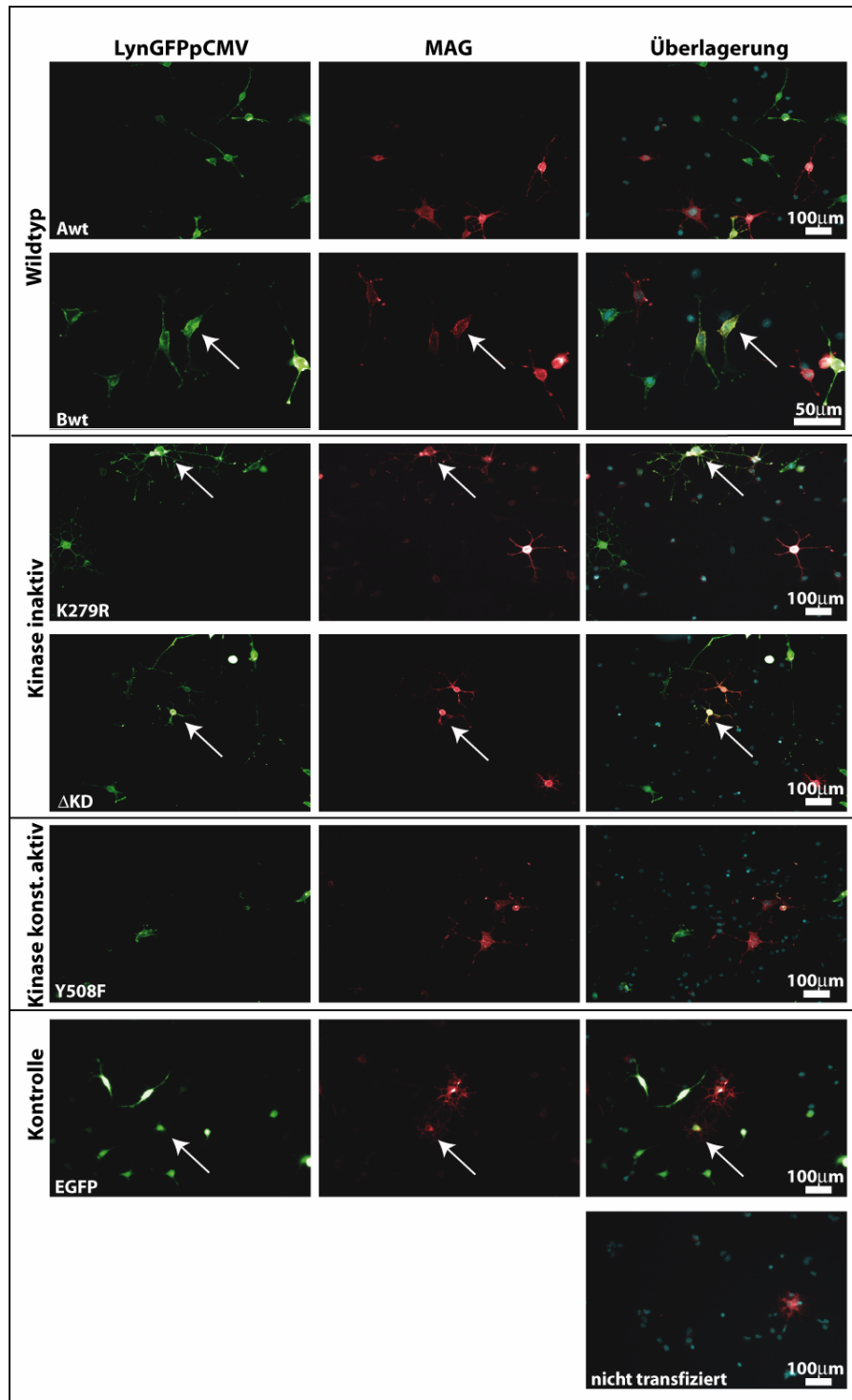


Abbildung 30: Transfektion von Oli-neu Zellen mit *Lyn-GFP*-pCMV Konstrukten und Immunfluoreszenzfärbung mit einem Antikörper gegen MAG.

Von oben nach unten: Oli-neu transfiziert mit *Awt*, *Bwt*, *K279R*, *LynΔKD*, *Y508F*, *EGFP* und nicht transfizierte Zellen. Von links nach rechts: GFP (grün) der *Lyn-GFP* Konstrukte, Immunfluoreszenz gegen MAG (rot), Überlagerung beider vorhergehenden Bilder mit zusätzlicher Zellkernfärbung mit DAPI (blau). Oli-neu Zellen transfiziert mit den Wildtyp *Lyn-GFP*-Konstrukten, den inaktiven *Lyn-GFP*-Konstrukten und dem konstitutiv aktiven *Lyn-GFP*-Konstrukt zeigen Co-Expression von Lyn Kinase und MAG (Pfeile) (für *Y508F* nicht gezeigt). Die Anzahl der MAG-exprimierenden Zellen war bei den Zellen erhöht, die mit einem der inaktiven *Lyn-GFP*-Konstrukte transfiziert wurden.

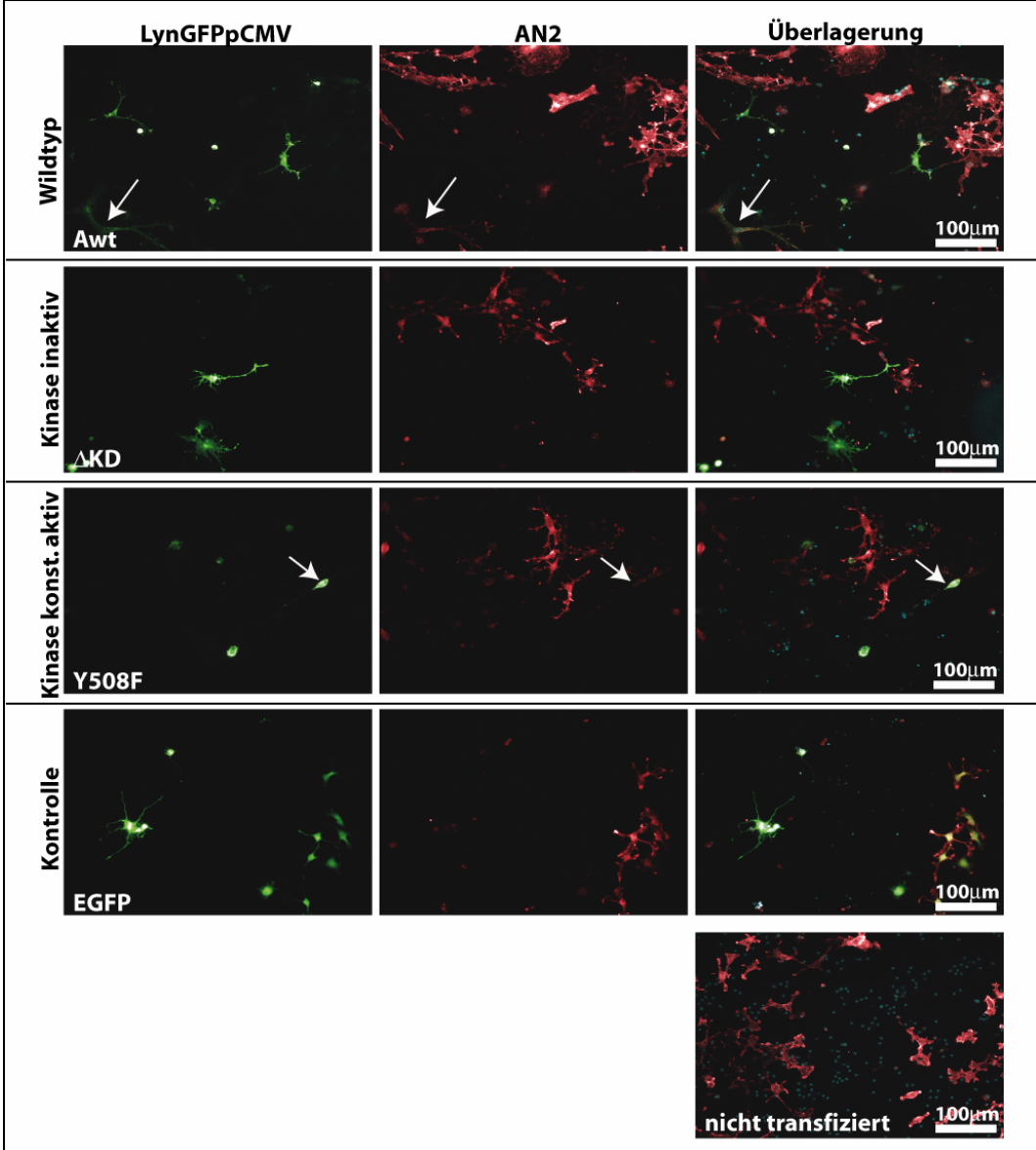


Abbildung 31: Transfektion von primären Oligodendrozyten (pOL) mit *Lyn-GFP-pCMV* Konstrukten und Immunfluoreszenzfärbung mit einem Antikörper gegen NG2 (AN2).

Von oben nach unten: pOL transfiziert mit *Awt*, Δ KD und *Y508F*, *EGFP* und nicht transfizierten Zellen. Von links nach rechts: GFP (grün) der *Lyn-GFP* Konstrukte, Immunfluoreszenz gegen NG2 (AN2) (rot), Überlagerung beider vorhergehenden Bilder mit zusätzlicher Zellkernfärbung mit DAPI (blau). Primäre Oligodendrozyten transfiziert mit den Wildtyp und dem konstitutiv aktiven *Lyn-GFP*-Konstrukt zeigen Co-Expression von Lyn Kinase und NG2 (AN2). Co-Expression von NG2 (AN2) mit dem inaktiven Δ KD waren ebenfalls vorhanden (hier nicht gezeigt). Die Anzahl der NG2-exprimierenden Zellen war in denen, die mit dem inaktiven *Lyn-GFP*-Konstrukt transfiziert waren, reduziert.

Zur statistischen Auswertung der Anzahl NG2 (AN2)-positiver bzw. MAG-positiver Oli-*neu* Zellen und primärer Oligodendrozyten nach der Transfektion mit einem der *Lyn-GFP*-pCMV Konstrukte, wurden in drei unabhängigen Experimenten jeweils 500 Zellen/Transfektion ausgezählt. Die statistische Analyse wurde mit der Software GraphPad Prism 4 durchgeführt und der Student's t-test genutzt.

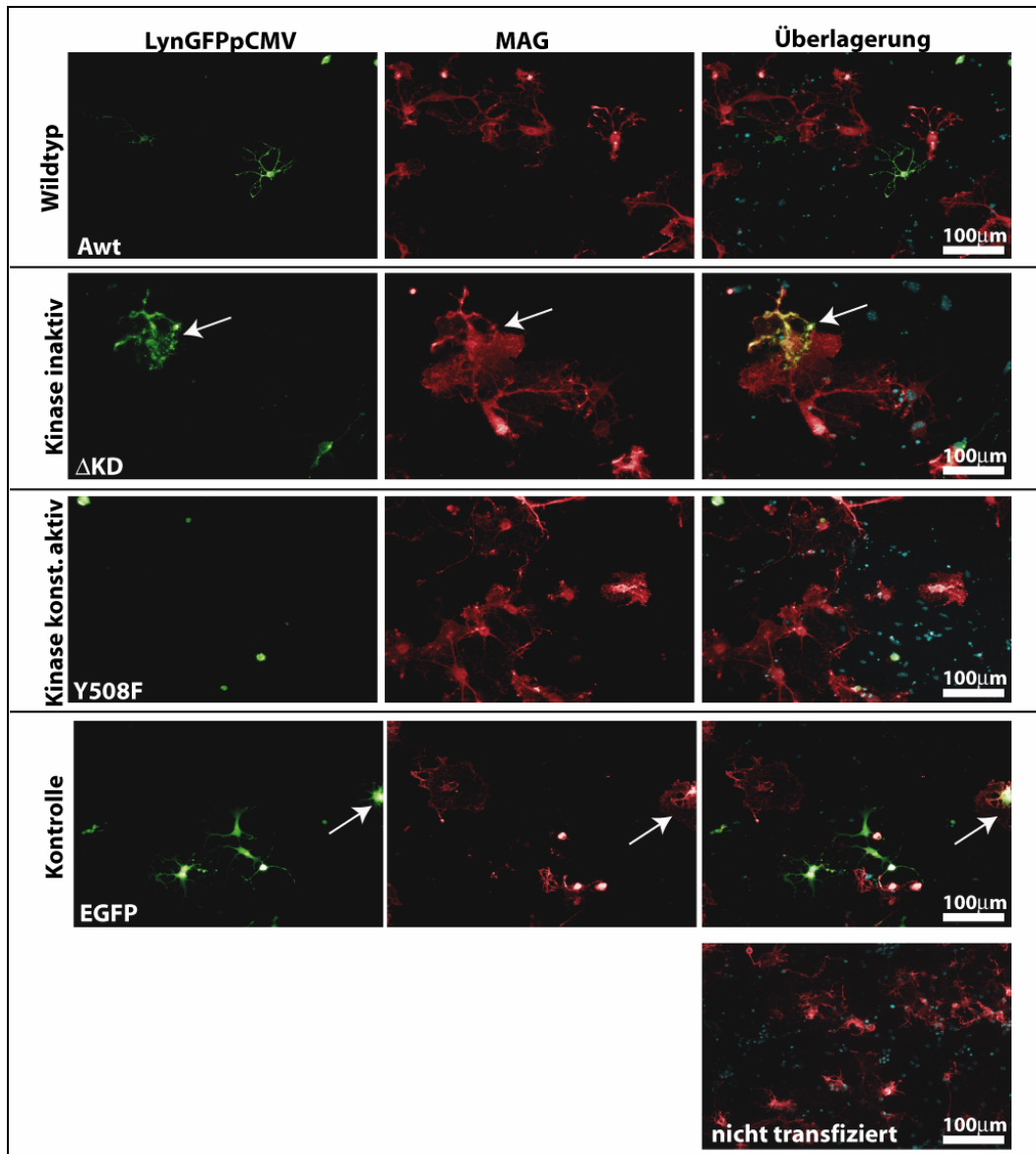


Abbildung 32: Transfektion von primären Oligodendrozyten (pOL) mit *Lyn-GFP-pCMV* Konstrukten und Immunfluoreszenzfärbung mit einem Antikörper gegen MAG.

Von oben nach unten: pOL transfiziert mit *Awt*, *LynΔKD*, *Y508F*, *EGFP* und nicht transfizierten Zellen. Von links nach rechts: GFP (grün) der *Lyn-GFP* Konstrukte, Immunfluoreszenz gegen MAG (rot), Überlagerung beider vorhergehenden Bilder mit zusätzlicher Zellkernfärbung mit DAPI (blau). Primäre Oligodendrozyten transfiziert mit dem inaktiven ΔKD zeigen Co-Expression der Lyn Kinase und MAG. Co-Expression von MAG mit dem Wildtyp-Konstrukt und dem konstitutiv aktiven *Lyn-GFP*-Konstrukt waren ebenfalls vorhanden (hier nicht gezeigt). Die Anzahl der MAG-exprimierenden Zellen war in denen, die mit dem inaktiven *Lyn-GFP*-Konstrukt transfiziert waren, erhöht.

In Abb.33A/B wurde die Anzahl NG2 (AN2)-positiver Zellen in den unterschiedlich transfizierten Oli-*neu* Zellen und primären Oligodendrozyten verglichen. Die Anzahl der NG2 (AN2)-positiven Zellen wurde prozentual zu der Gesamtzellzahl dargestellt (Y-Achse), auf der X-Achse sind zuerst die Anzahl der NG2 (AN2)-positiven Zellen angegeben, die nicht transfiziert wurden (Kontrolle) und die mit der *EGFP-pCMV* Transfektion.

Anschließend sind in Abb.33A die mit den *Lyn-GFP* Konstrukten transfizierten *Oli-neu* Zellen dargestellt. Die Anzahl der NG2 (AN2)-positiven Zellen ist im Vergleich von Kontrolle zu Zellen transfiziert mit *EGFP*, *Awt*, *Bwt* und *Y508F* nicht signifikant unterschiedlich. Zellen, transfiziert mit *K279R* oder ΔKD , bestehen aus einer signifikant geringeren Anzahl NG2 (AN2)-positiver und damit undifferenzierter Zellen. Die Signifikanz beträgt im Vergleich zu nicht transfizierten Zellen bei *K279R* $p < 0,05$ und bei ΔKD $p < 0,01$.

In Abb.33B wurde die Anzahl NG2 (AN2)-positiver Zellen in den unterschiedlich transfizierten primären Oligodendrozyten verglichen. Die Anzahl der NG2 (AN2)-positiven Zellen ist im Vergleich von nicht transfizierten Zellen zu Zellen transfiziert mit *EGFP*, *Awt*, ΔKD und *Y508F* nicht signifikant unterschiedlich.

In Abb.33C/D wurde die Anzahl MAG-positiver Zellen in den unterschiedlich transfizierten *Oli-neu* Zellen und primären Oligodendrozyten verglichen. Die Darstellung der Experimente in den Grafiken entsprechen Abb.33A/B.

Die Anzahl der MAG-positiven *Oli-neu* Zellen (Abb.33C) ist im Vergleich von Kontrolle zu Zellen transfiziert mit *EGFP*, *Awt* und *Bwt* nicht signifikant unterschiedlich. Zellen, transfiziert mit *K279R* oder ΔKD , bestehen aus einer signifikant höheren Anzahl MAG-positiver und damit differenzierter Zellen ($p < 0,05$). Zellen mit dem konstitutiv aktiven *Y508F* Konstrukt haben signifikant weniger MAG-positive Zellen ($p < 0,01$).

In Abb.33D wurde die Anzahl MAG-positiver Zellen in den unterschiedlich transfizierten primären Oligodendrozyten verglichen. Die Anzahl der MAG-positiven Zellen ist im Vergleich von Kontrolle zu Zellen transfiziert mit *EGFP*, *Awt* und *Y508F* nicht signifikant unterschiedlich. Zellen, transfiziert mit ΔKD , besitzen eine signifikant höhere Anzahl MAG-positiver und damit differenzierter Zellen ($p < 0,05$).

Die Aktivität der Lyn Kinase beeinflusst somit die Zellausläufer Bildung und die Differenzierung von Oligodendrozyten. Eine aktive Lyn Kinase hemmt die Ausläufer Bildung und belässt signifikant mehr Zellen in einem undifferenzierten, NG2-positiven Entwicklungsstand. Wird die Aktivität der Lyn Kinase gehemmt, indem, wie in unseren Experimenten, inaktive Lyn-Konstrukte in die Zelle transfiziert werden, kommt es zu einer verstärkten Ausläufer Bildung und die Zellen differenzieren sogar schneller als unbehandelte Oligodendrozyten. In *Oli-neu* Zellen sind diese Tendenzen jedoch deutlicher zu sehen als in primären Oligodendrozyten.

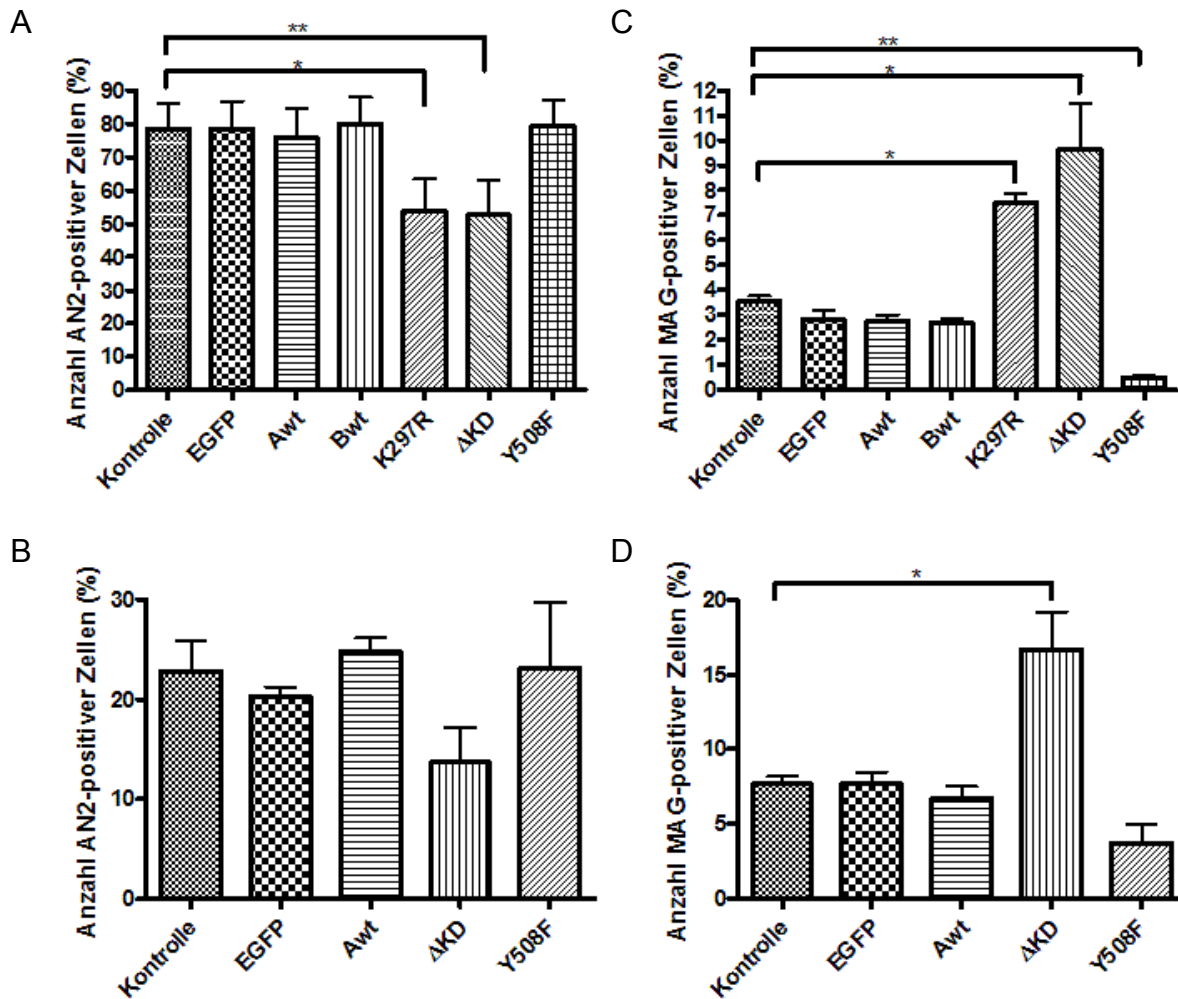


Abbildung 33: Statistische Auswertung des Entwicklungsgrades von Oli-neu Zellen und primärer Oligodendrozyten, transfiziert mit *Lyn-GFP-pCMV* Konstrukten

Die Zellen wurden transfiziert und nach drei Tagen in Kultur eine Immunfluoreszenzfärbung gegen NG2 (AN2) und MAG durchgeführt. Es wurden in drei unabhängigen Experimenten jeweils 500 Zellen/Marker und Transfektion gezählt und mit GraphPad Prism statistisch ausgewertet. Oli-neu Zellen wurden mit *EGFP*, *Awt*, *Bwt*, *K279R*, Δ *KD* und *Y508F* transfiziert, primäre Oligodendrozyten mit *EGFP*, *Awt*, Δ *KD* und *Y508F*. Nicht transfizierte Zellen dienen als Kontrollen. A: Anzahl NG2 (AN2)-positiver Oli-neu Zellen. Zellen transfiziert mit *EGFP*, *Awt*, *Bwt* und *Y508F* zeigen keinen signifikanten Unterschied in der Anzahl NG2 (AN2)-positiver Zellen im Vergleich zu nicht transfizierten Zellen. Zellen, die mit *K279R* oder Δ *KD* transfiziert wurden, haben signifikant weniger NG2 (AN2)-positive Zellen. B: Die Anzahl der NG2 (AN2)-positiven Zellen verändert sich in primären Oligodendrozyten nicht signifikant nach Transfektion eines der *Lyn-GFP-pCMV* Konstrukte. C: Anzahl MAG-positiver Oli-neu Zellen. Zellen transfiziert mit *EGFP*, *Awt* oder *Bwt* zeigen keine veränderte Anzahl MAG-positiver Zellen, Zellen transfiziert mit *K279R* oder Δ *KD* haben signifikant mehr und Zellen transfiziert mit *Y508F* haben signifikant weniger MAG-positive Zellen. D: Die Anzahl der MAG-positiven Zellen in primären Oligodendrozyten ist nur in Zellen, die mit Δ *KD* transfiziert wurden signifikant verändert. Student's t-test, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

4.3 Assoziation und Funktion der Src-Kinase Lyn

4.3.1 Co-Immunpräzipitation der Src-Kinase Lyn zur Klärung möglicher Bindungspartner

Nachdem wir die Expression und Funktion der Lyn Kinase untersucht haben, sollte ermittelt werden mit welchen Proteinen die Lyn Kinase interagiert um eine bessere Vorstellung davon zu bekommen, welche Lyn-abhängige Signal-Kaskade für die Steuerung der Ausläufer-Bildung und Differenzierung der Oligodendrozyten verantwortlich ist. In Neuronen wurde eine Assoziation der Glutamat-Rezeptor B Untereinheit des AMPA-Rezeptors mit der Lyn Kinase beschrieben (Hayashi et al 1999, Wu et al 2004). Da bekannt ist, dass der AMPA-Rezeptor auch in Oligodendrozyten-Vorläufer Zellen und undifferenzierten Oligodendrozyten exprimiert wird (Gallo et al 1996, Patneau et al 1994) sollte untersucht werden, ob der AMPA-Rezeptor auch in Oligodendrozyten mit der Lyn Kinase assoziiert.

Hierfür wurde eine Co-Immunpräzipitation durchgeführt. Es wurde sowohl eine Immunpräzipitation mit einem Antikörper gegen die Lyn Kinase als auch gegen die Glutamat Rezeptor Untereinheiten B und C (GluRB/C) durchgeführt. In Abb.34A ist links die Co-Immunpräzipitation mit einem polyklonalen Antikörper gegen Lyn Kinase dargestellt (IPLyn), daneben ein Gesamt-Lysat der primären Oligodendrozyten (Lysat). Ein monoklonaler Antikörper gegen die Lyn Kinase zeigt, dass Lyn sowohl im Immunpräzipitat, als auch im Gesamt-Lysat zu detektieren ist. Die kleine Lyn Isoform B ist stärker im Präzipitat vertreten. GluRB/C ist ebenfalls im Immunpräzipitat, wie auch im Gesamt-Lysat vertreten. Dies weist auf eine Assoziation der Lyn Kinase mit der AMPA-Rezeptor Untereinheit GluRB/C hin. Es wurde angenommen, dass die zweite Src-Kinase der Oligodendrozyten, die Fyn Kinase, nicht mit Lyn oder dem AMPA Rezeptor assoziiert ist. Aus diesem Grund wurde der Nachweis der Fyn Kinase als Kontrolle verwandt um festzustellen, ob die Assoziation von Lyn Kinase und AMPA Rezeptor spezifisch ist. Die Tatsache, dass die Fyn Kinase im Lysat der Oligodendrozyten nachzuweisen ist, jedoch nicht im Immunpräzipitat (IPLyn), bestätigt diese Annahme. Dasselbe gilt für das Protein NCAM, ein Transmembran Protein, das ebenfalls nur in den Lysaten und nicht im Präzipitat zu detektieren ist. Da die Bindung von GluRB/C und der Lyn Kinase in Neuronen schon bekannt ist, war es von besonderer Bedeutung, dass keine neuronale Kontamination im Lysat vorhanden ist. Ein Antikörper gegen das Neuronen-spezifische Protein L1 zeigt

weder ein Signal im Lysat als auch im Immunpräzipitat, wodurch der Nachweis erbracht ist, dass die Assoziation von Lyn Kinase und GluRB/C nicht durch neuronale Kontamination detektiert wurde.

Eine Co-Immunpräzipitation mit einem Antikörper gegen GluRB/C (IPGluRB/C) bestätigt die Resultate. GluRB/C und Lyn Kinase könne sowohl im Immunpräzipitat als auch im Gesamt-Lysat (Lysat) detektiert werden. Die kleine Lyn-Isoform B ist auch hier verstärkt in Präzipitat zu detektieren. Die Fyn Kinase und NCAM ist vom Immunpräzipitat ausgeschlossen. Der neuronale Marker L1 ist weder im primären Oligodendrozyten-Lysat, noch im Präzipitat zu finden. Im Gehirn-Lysat, indem auch Neurone zu finden sind, sind sämtliche Proteine, inklusive L1 zu detektieren.

Als weitere Kontrolle für neuronale Kontamination wurde ein Teil der Zellen aus der gleichen Kultur mit Antikörpern gegen L1, als neuronaler Marker und Sulfatid (O4), als Oligodendrozyten Marker, gefärbt (Abb.34B). Es konnten keine Zellen detektiert werden, die L1-positiv waren, jedoch viele die den Oligodendrozyten Marker Sulfatid (O4) exprimieren.

Diese Resultate zeigen, dass die Lyn Kinase in Oligodendrozyten mit einem der AMPA-Rezeptor Untereinheiten GluRB oder C assoziiert ist. Da der Antikörper beide Untereinheiten erkennt, kann die Assoziation nicht weiter spezifiziert werden.

Eine Transfektion des *Lyn-GFP*-pCMV Wildtyp Konstrukts *Awf* (GFP) in primäre Oligodendrozyten und anschließende Immunfluoreszenz-Färbung mit dem GluRB/C Antikörper zeigt eine Co-Verteilung der Lyn Kinase (grün) und GluRB/C (rot) an der Plasmamembran (Abb.35). Links in Abb.35 ist GluRB/C dargestellt, daneben die Expression der Lyn Kinase und rechts eine Überlagerung beider Bilder mit zusätzlicher Zellkernfärbung mit DAPI (blau). Die Pfeile zeigen die Stelle an, an der sowohl Lyn Kinase, als auch die GluRB/C Untereinheiten exprimiert werden (gelb).

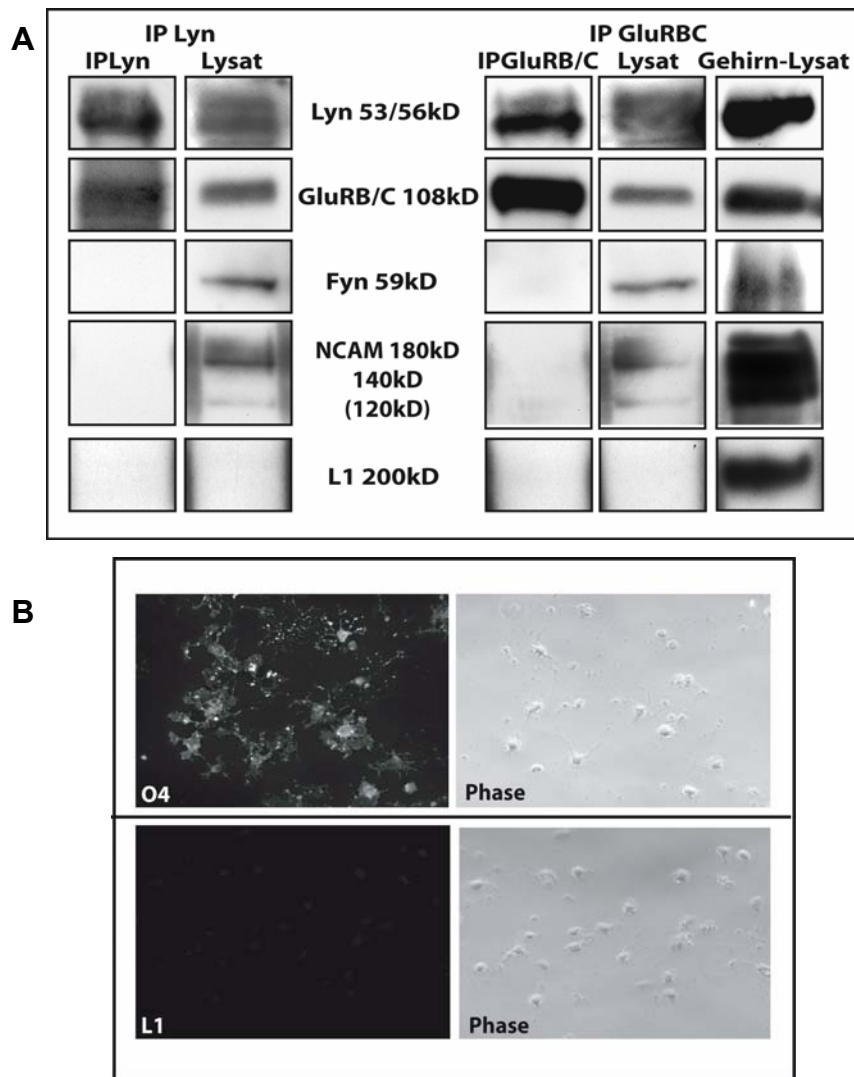


Abbildung 34: A: Immunpräzipitationen (IP) primärer Oligodendrozyten (pOL), Western Blot, B: Immunfluoreszenzfärbung der primären Oligodendrozyten mit Antikörpern gegen O4 und L1

A: Die Zellen wurden nach drei Tagen in Kultur in Tx100-haltigem Puffer lysiert. Eine IP wurde mit einem polyklonalen Lyn Antikörper durchgeführt (links, IPLyn), und mit einem polyklonalen Antikörper gegen GluRB/C (rechts, IPGluRBC). Von links nach rechts: IPLyn, Lysat aus pOL, IPGluRB/C, Lysat aus pOL, Gehirnllysate. Von oben nach unten erfolgte der Nachweis von Lyn Kinase, GluRB/C, Fyn Kinase, NCAM und L1. Sowohl in der IPLyn als auch in der IPGluRBC ist die Lyn Kinase zu detektieren, wie auch in den Lysaten, GluRBC ist ebenfalls in den Präzipitaten und Lysaten nachzuweisen. Dies zeigt eine Assoziation der beiden Proteine. Die Fyn Kinase und NCAM ist nur im Lysat detektierbar und nicht in den Präzipitaten, beide Proteine sind nicht mit dem Lyn Kinase-GluRB/C Komplex assoziiert. L1, ein neuronaler Marker, ist nur im Gehirnllysate nachweisbar, die pOL Lysate und Präzipitate zeigen daher keine neuronalen Kontaminationen.

B: Immunfluoreszenzfärbung der primären Oligodendrozyten Kulturen mit Antikörpern gegen Sulfatid (O4) (Oligodendrozyten-Marker) und L1 (Neuronen-Marker) zur Kontrolle von neuronaler Kontamination. Die Zellen sind O4-positiv und L1-negativ und die Kultur somit nicht neuronal kontaminiert.

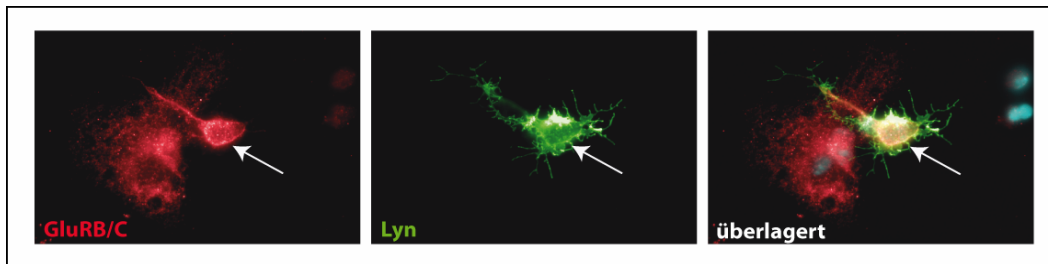


Abbildung 35: Transfektion primärer Oligodendrozyten mit Wildtyp Lyn Awt und Immunfluoreszenzfärbung mit einem Antikörper gegen Glutamat Rezeptor B/C.

In den kleineren Zellausläufern wird nur die Lyn Kinase exprimiert, im Zellkörper und größeren Ausläufern sowohl Lyn als auch die Glutamat Rezeptor Untereinheiten B/C. Die Verteilung beider Proteine ist nicht überall in der Zelle identisch, es gibt jedoch eine Co-Verteilung in der Plasmamembran (Pfeil).

4.3.2 Glutamat Behandlung von Oligodendrozyten zur Aktivierung des AMPA-Rezeptors

Die Lyn Kinase interagiert mit der Glutamat Rezeptor Untereinheit B/C des AMPA Rezeptors. Außerdem beeinflusst die Aktivität der Lyn Kinase die Zellausläufer Bildung und die Differenzierung der Oligodendrozyten. In den nächsten Experimenten soll geklärt werden, ob die Lyn Kinase über den AMPA Rezeptor aktiviert werden kann und ob diese Aktivierung einen Einfluss auf die Differenzierung und Ausläufer Bildung der Oligodendrozyten hat.

Um den AMPA-Rezeptor durch Glutamat zu stimulieren, wurden primäre Oligodendrozyten zuerst mit 1 μ M Aniracetam behandelt und anschließend für 10 Minuten mit 0 μ M, 100 μ M und 500 μ M Glutamat.

Von links nach rechts sind in Abb.36A Lysate primärer Oligodendrozyten zu sehen, die mit keinem, 100 μ M oder 500 μ M Glutamat behandelt wurden. Der Nachweis aktiver Src-Kinasen ist mit dem pY418 Antikörper, der ausschließlich aktive Src-Kinasen erkennt, möglich. Die obere Bande entspricht der Fyn-Kinase, die ihre Aktivität nach Behandlung mit Glutamat nicht verändert. Die untere Bande entspricht der kleineren Lyn Kinase Isoform B (53kD), deren Aktivität nach Behandlung mit Glutamat erhöht ist. Der Nachweis des gesamten Lyn Kinase Proteins erfolgte mit einem Antikörper gegen Lyn (Lyn-AB). Die Menge an Lyn Protein bleibt gleich, die erhöhte Aktivität ist also nicht auf eine gesteigerte Expression der Lyn Kinase zurückzuführen, sondern Glutamat steigert indirekt über den AMPA-Rezeptor die Aktivität der Lyn Kinase.

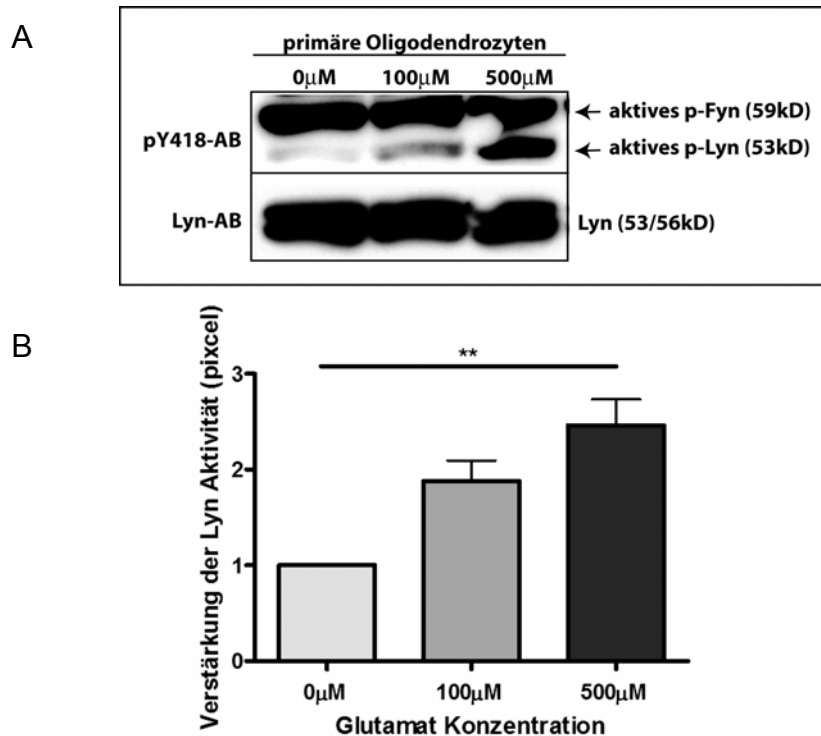


Abbildung 36: Glutamat Behandlung primärer Oligodendrozyten und Detektion der Src Kinase Aktivität, A: Western Blot, B: Statistische Analyse

Primäre Oligodendrozyten, 3-Tage Kultur, sensitiviert mit 1µM Aniracetam, dann, für 10 Minuten, mit 0µM, 100µM und 500µM Glutamat stimuliert und in Tx100-haltigem Puffer lysiert. Auftrennung der Proteine über ein 10%SDS-Gel, Western Blot. A: Ein Antikörper gegen das pY der Aktivierungsschleife bei Src-Kinasen (pY418-AB) zeigt die Aktivität der Src-Kinasen an. Die Aktivität von Fyn Kinase ist gleich bleibend, die der Lyn Kinase steigt nach Glutamat Behandlung an. Der Nachweis des Gesamtproteins Lyn zeigt keine Steigerung der Lyn Kinase Expression. B: Lyn Kinase Aktivitätsbestimmung durch Western Blot Nachweis mit Antikörpern pY418 und Lyn Gesamtprotein-Nachweis mit einem Antikörper gegen Lyn Kinase. Messung der Bandenintensitäten des Western Blot mit AIDA und Normalisierung der Aktivitäts-Intensitäten mit Lyn Gesamtprotein. Die Lyn Aktivität, gemessen in Pixel (Y-Achse) in Abhängigkeit zur Glutamat-Konzentration (X-Achse). Die Lyn Aktivität nimmt mit Erhöhung der Glutamat Konzentration signifikant zu. Zur statistischen Auswertung wurde der One-way ANOVA Test verwendet, $p < 0,01$, $n = 5$.

Für die statistische Auswertung wurde die Aktivität der Lyn Kinase nach Glutamat Behandlung in fünf unabhängigen Experimenten wiederholt. Die Intensitäten der Banden, die mit dem Antikörper pY418 nachgewiesen wurden (aktive Lyn Kinase), wie auch die Banden des Gesamtprotein Lyn, wurden mit der Software AIDA 4.11 gemessen. Die Intensität der aktiven Lyn Kinase wurde gegen das Gesamtprotein normalisiert und dieser Wert in die statistische Analyse einbezogen. Es wurde die Software GraphPad Prism 4 und der One-way ANOVA Test gewählt.

In Abb.36B ist die Quantifizierung der Lyn Kinase Aktivität nach Glutamat Behandlung dargestellt. Die Aktivität der Lyn Kinase steigt mit der Glutamat Konzentration (0µM, 100µM und 500µM) signifikant an ($p < 0,01$).

Eine Immunfluoreszenzfärbung von Oligodendrozyten nach Glutamat Behandlung mit dem pY418 Antikörper bestätigt das vorangegangene Ergebnis. In Abb.37 sind von links nach rechts primäre Oligodendrozyten gezeigt, die, nach einer Prä-Inkubation mit 1 μ M Aniracetam, mit 0 μ M, 100 μ M und 500 μ M Glutamat behandelt wurden. Die aktiven Src-Kinasen sind in rot dargestellt, außerdem wurden die Zellkerne mit DAPI (blau) angefärbt. Die Belichtungszeit ist in jeder Reihe identisch, in der oberen Bilderreihe wurden 50ms gewählt, in der zweiten Reihe 500ms. Die erhöhte Aktivität der Src-Kinasen ist anhand der erhöhten Intensität der Rot-Färbung zu sehen. Der Intensitäts-Unterschied ist nicht groß und damit zu erklären, dass sich die Aktivität der Fyn Kinase, die weitaus stärker in Oligodendrozyten vertreten ist, nicht ändert. Es kann in dieser Abbildung nicht zwischen Lyn und Fyn Kinase unterschieden werden.

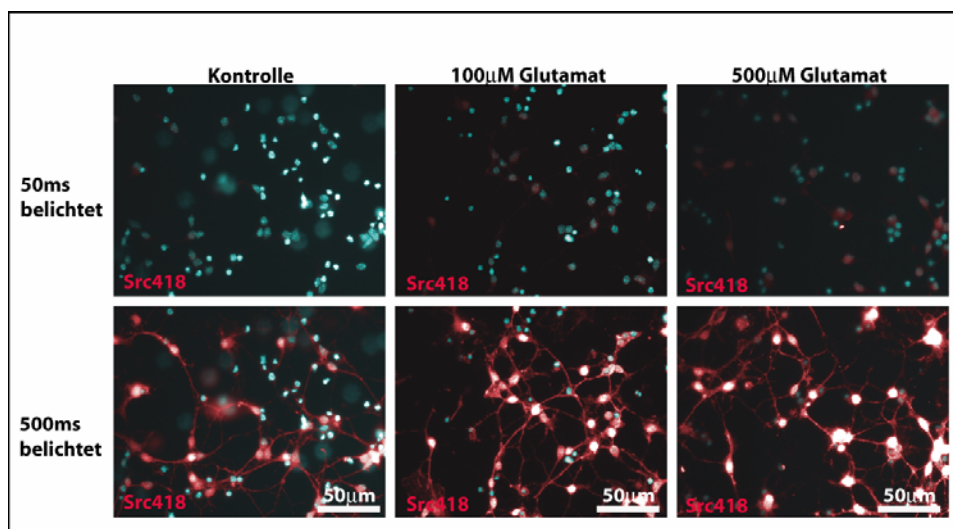


Abbildung 37: Primäre Oligodendrozyten nach Behandlung mit Glutamat, Immunfluoreszenzfärbung

Die Zellen wurden 5min. mit 1 μ M Aniracetam zur Inhibierung der Desensitivierung des AMPA-Rezeptors behandelt und anschließend für 10min. mit 0, 100 oder 500 μ M Glutamat (von links nach rechts) inkubiert. Die Aktivität der Src-Kinasen in den Zellen wurden mit dem Y418-Antikörper nachgewiesen, der das pY418 (bei Lyn: pY397) erkennt. Dieser wurde mit einem Zweitantikörper gekoppelt (rot). Die Belichtungszeiten von 50ms und 500ms zeigen, dass die Src-Kinase-Aktivität von Zellen, die mit Glutamat behandelt wurden ansteigt.

Nachdem gezeigt wurde, dass die Stimulierung des AMPA Rezeptors zu einer Aktivierung der Lyn Kinase führt, bleibt zu beantworten, ob die Aktivierung einen Einfluss auf die Zellausläufer-Bildung und Differenzierung der Oligodendrozyten hat. Die Zählung und Messung der Zellausläufer nach Glutamat Behandlung erwiesen sich als schwierig, da die primären Oligodendrozyten in ihrer Morphologie sehr

heterogen sind und man nicht, wie bei der Transfektion (transfiziert oder nicht transfiziert), deutlich zwischen Zellen unterscheiden kann, die vom Glutamat stimuliert wurden. Aus diesem Grund wurde ausschließlich die Differenzierung der Oligodendrozyten nach Glutamat Behandlung untersucht. Hierfür wurden die Zellen 5 Minuten mit 1µM Aniracetam und anschließend für 24 Stunden mit 0µM, 100µM und 500µM Glutamat behandelt. Anschließend wurden die Zellen mit Antikörpern gegen den frühen Oligodendrozyten Marker NG2 (AN2) und den späten Oligodendrozyten Marker MAG immungefärbt. In Abb.38 sieht man von links nach rechts Zellen, die mit 0µM, 100µM und 500µM Glutamat behandelt wurden. Die obere Reihe zeigt die NG2 (AN2) Färbung (rot) und eine Zellkernfärbung mit DAPI (blau). Die untere Reihe zeigt die MAG Färbung (rot) und ebenfalls eine Färbung der Zellkerne mit DAPI (blau).

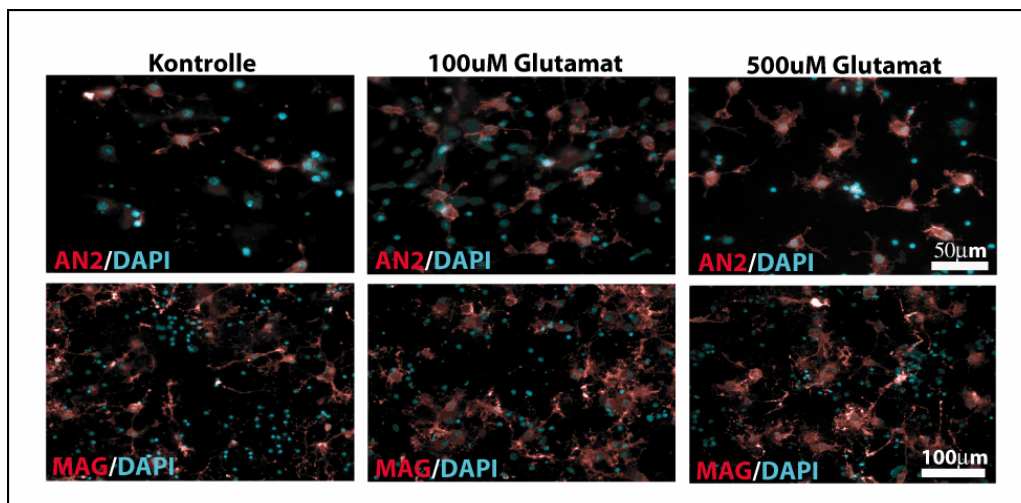


Abbildung 38: Immunfluoreszenzfärbung von primären Oligodendrozyten gegen NG2 (AN2) und MAG nach Glutamat Behandlung

Von links nach rechts: Zellen, sensitiviert mit 1µM Aniracetam und behandelt mit 0µM, 100µM und 500µM Glutamat, obere Reihe: Färbung mit einem Antikörper gegen NG2 (AN2) (rot) und DAPI (blau), untere Reihe: Färbung mit einem Antikörper gegen MAG (rot) und DAPI (blau); Die Anzahl der NG2-positiven Zellen ist nach Glutamat Behandlung erhöht. Die Anzahl der MAG-positiven Zellen ist unverändert.

Zur statistischen Auswertung der Anzahl NG2 (AN2)-positiver bzw. MAG-positiver primärer Oligodendrozyten nach Behandlung mit Glutamat wurden in drei unabhängigen Experimenten jeweils 500 Zellen/Experiment ausgezählt. Die statistische Analyse wurde mit der Software GraphPad Prism 4 durchgeführt und der One-way ANOVA-Test benutzt.

In Abb.39A wurde die Anzahl NG2 (AN2)-positiver Zellen (prozentual zur Gesamtzellzahl) (Y-Achse) nach Behandlung der primären Oligodendrozyten mit

0 μ M, 100 μ M und 500 μ M Glutamat (X-Achse) dargestellt. Die Anzahl der NG2 (AN2)-positiven Zellen steigt nach Behandlung mit Glutamat signifikant an ($p < 0,001$).

In Abb.39B wurde die Anzahl MAG-positiver Zellen (prozentual zur Gesamtzellzahl) (Y-Achse) nach Behandlung der primären Oligodendrozyten mit 0 μ M, 100 μ M und 500 μ M Glutamat (X-Achse) dargestellt. Die Anzahl der MAG-positiven Zellen verändert sich nicht signifikant.

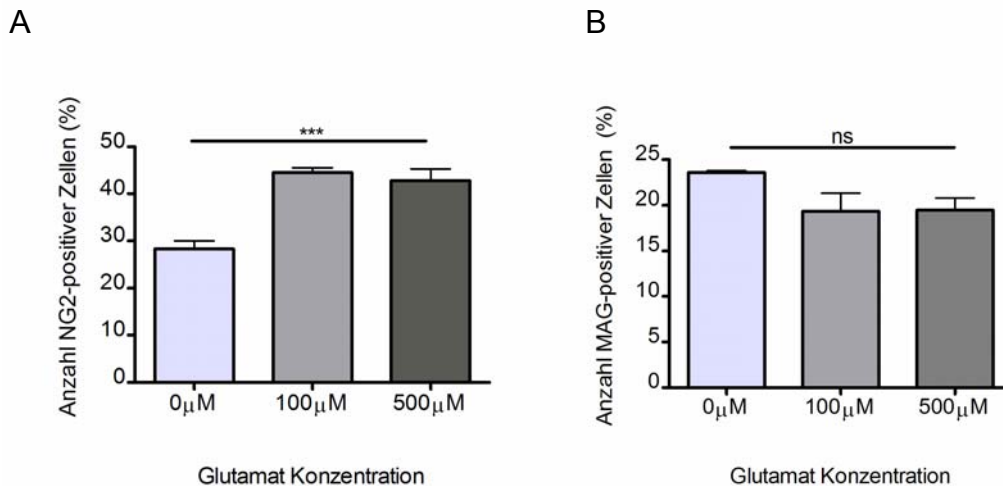


Abbildung 39: Statistische Auswertung des Entwicklungsgrades von Oligodendrozyten nach Glutamat Behandlung.

Die Zellen wurden 5min. mit 1 μ M Aniractam zur Inhibierung der Desensitivierung des AMPA-Rezeptors behandelt und anschließend für 24h mit 0, 100 oder 500 μ M Glutamat inkubiert und anschließend eine Immunfluoreszenzfärbung gegen NG2 (AN2) und MAG durchgeführt. Es wurde in drei unabhängigen Experimenten je Marker 500 Zellen ausgezählt und statistisch analysiert. A: Die Prozentzahl der NG2 (AN2)-positiven Zellen steigt nach Glutamat Behandlung signifikant an B: Die Prozentzahl der MAG-positiven Zellen verändert sich nicht signifikant nach Behandlung mit Glutamat. One-way ANOVA, *** $p < 0,001$.

Die Lyn Kinase ist in Oligodendrozyten mit der Glutamat Rezeptor Untereinheit B/C des AMPA Rezeptors in der Plasmamembran assoziiert. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass durch die Stimulierung des AMPA Rezeptors mit Glutamat die Lyn Kinase aktiviert werden kann. Die Experimente mit den aktiven und inaktiven Lyn-GFP-pCMV Konstrukten zeigten, dass eine aktive Lyn Kinase die Ausläufer Bildung und die Differenzierung der Oligodendrozyten hemmt. Wird die endogene Lyn Kinase von Oligodendrozyten indirekt durch Glutamat aktiviert, wird die Differenzierung ebenfalls gehemmt, signifikant mehr Zellen verbleiben im undifferenzierten NG2 (AN2)-positiven Stadium.

5 Diskussion

In dieser Arbeit wurde die Expression der Lyn Kinase in Oligodendrozyten und Myelin *in vitro* und *in vivo*, sowie die Lokalisation innerhalb und außerhalb von *rafts* charakterisiert. Je älter die Mäuse, desto weniger Lyn wird in Myelin exprimiert und desto stärker ist das verbleibende Lyn in den *rafts* lokalisiert. Die Aktivität von Lyn ist im Myelin 12-Tage alter Mäuse am höchsten. Eine Synchronisation des Zellzyklus in Oli-*neu* Zellen zeigte eine zyklische Expression der Lyn Kinase.

Transfektion aktiver und inaktiver Konstrukte in Oligodendrozyten zeigte, dass Lyn Aktivität die Zellausläufer Bildung, sowie die Differenzierung der Zelle, hemmt.

Immunpräzipitationen konnten eine Assoziation der GluRB/C Untereinheit des AMPA Rezeptors mit Lyn nachweisen.

Stimulierung des AMPA-Rezeptors mit Glutamat führt zu einer Aktivierung der Lyn Kinase und daraus resultierend, zu einer Inhibierung der Zelldifferenzierung.

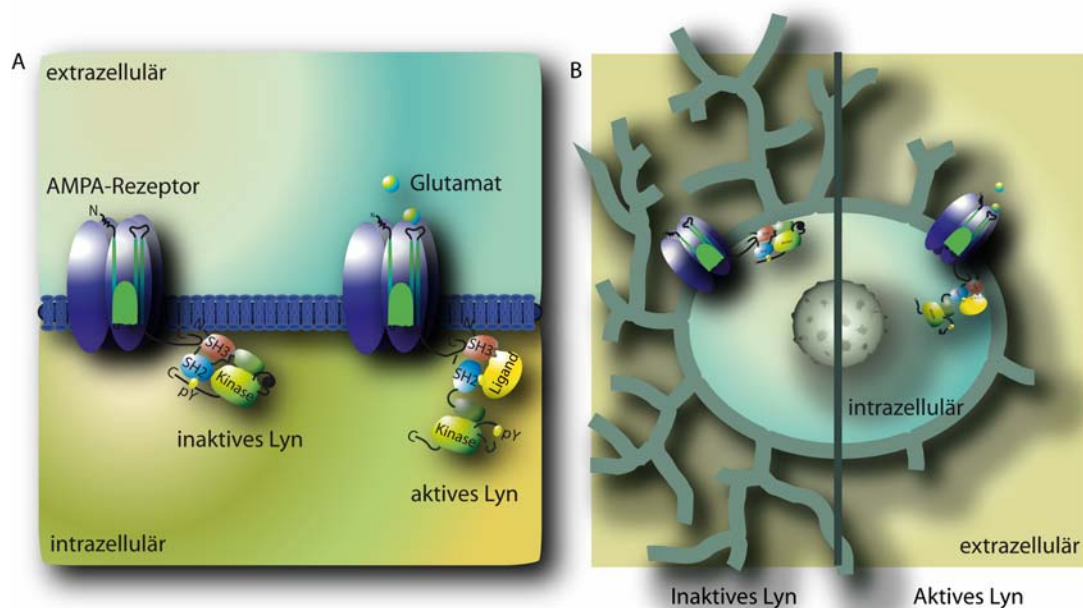


Abbildung 40: Die Lyn Kinase Aktivität inhibiert die Zellausläuferbildung und Zelldifferenzierung in Oligodendrozyten

A: Die Lyn Kinase ist mit der GluRB/C Untereinheit des AMPA Rezeptors assoziiert. Stimulierung des AMPA Rezeptors mit Glutamat aktiviert die Lyn Kinase. **B:** Ist die Lyn Kinase inaktiv, kann die Zelle Zellausläufer bilden und differenzieren. Wird die Lyn Kinase über den AMPA Rezeptor aktiviert, wird die Zellausläuferbildung und die Zelldifferenzierung gehemmt.

5.1 Expression und Aktivität der Lyn Kinase in Oligodendrozyten

5.1.1 Die Lyn Expression und Aktivität nimmt mit Fortentwicklung der Oligodendrozyten und des Myelins ab

Die Lyn Kinase wird im zentralen Nervensystem der Maus sowohl in Oligodendrozyten, als auch in Neuronen und Astrozyten exprimiert. Während die Expression von Lyn in Oligodendrozyten und Neuronen schon beschrieben wurde (Hayashi et al 1999, Kramer et al 1999) gibt es noch keine Publikation über die Lyn Kinase in Astrozyten. Die ubiquitäre Expression von Lyn im ZNS macht eine Untersuchung der Lyn Kinase in Oligodendrozyten schwierig, da eine Kontamination durch Neurone oder Astrozyten die Ergebnisse verfälschen könnten. Aus diesem Grund wurden Neuronen-Zytolysen und Immunfluoreszenz-Färbungen mit Antikörpern gegen Astrozyten- bzw. Neuronen-spezifischen Markern angefertigt, um eine Kontamination auszuschließen.

Die Expression von Lyn nimmt mit der Fortentwicklung der Oligodendrozyten und des Myelins ab. Lyn ist hauptsächlich *in vitro* in oligodendrogialen Vorläuferzellen und im sich bildenden Myelin zu finden. Dies lässt darauf schließen, dass die Funktion von Lyn ebenfalls in der frühen Entwicklung der Oligodendrozyten liegt. Dies könnte die Migration, Proliferation oder die Initiierung der Myelinisierung beinhalten. In Glioma Zellen wurde ein Zusammenhang zwischen der Lyn Kinase und Migration hergestellt (Stettner et al 2005), in Oligodendrozyten mit der Förderung der Proliferation (Colognato et al 2004) und in dieser Arbeit mit der Hemmung der Differenzierung durch den AMPA-Rezeptor. Im Myelin reduziert sich die Lyn Expression nach P16 (Abb.12), die Aktivität nimmt nach P12 ab (Abb.21). Die Myelinisierung im murinen Gehirnen erfolgt von anterior nach posterior und beginnt mit P7, ist P15 am stärksten und ist mit P28 abgeschlossen (Murtie et al 2005). Die Lyn Kinase wird also kurz vor bzw. nach dem Beginn der Myelinisierung herunterreguliert.

In vivo Immunfluoreszenzfärbungen von Gehirnschnitten aus P9-Mäusen zeigten eine Expression von Lyn in Oligodendrozyten. Lyn wurde sowohl in undifferenzierten als auch in differenzierteren Zellen exprimiert (Abb. 15/16). Allerdings scheint es eine unterschiedliche Verteilung der Lyn-positiven Oligodendrozyten zu geben. Im *Corpus Callosum*, z.B. sind zwar undifferenziertere Oligodendrozyten zu finden, allerdings exprimieren sie kein Lyn. Lyn/NG2-positive Zellen konnten im *Corpus Callosum* nicht

detektiert werden. In anderen Bereichen des Gehirns, wie im Bereich des *Thalamus*, wurden Lyn/NG2-positive Zellen entdeckt.

Der *Corpus Callosum* ist Teil der weissen Substanz im Gehirn, da die Axone der Nervenstränge myelinisiert sind (Fields 2005). Möglicherweise ist in den oligodendroglialen Vorläuferzellen des *Corpus Callosum* 9 Tage alter Mäuse die Lyn Expression unterdrückt, damit die Zellen differenzieren und myelinisieren können.

Der *Thalamus* hingegen gehört zur grauen Substanz, d.h. keine oder nur wenige Axone werden in diesem Bereich myelinisiert (Khaleeli et al 2007). Hier könnten die Vorläuferzellen zumindest teilweise Lyn exprimieren und so in ihrer Differenzierung gehemmt werden, um z.B. Neuron-Glia Synapsen zu bilden oder als Reserve im Falle von De- bzw. Remyelinisierung bereit zu stehen.

5.1.2 Lyn wird in der Plasmamembran in Mikrodomänen (*rafts*) exprimiert

Mikrodomänen der Plasmamembran, *rafts*, sind wichtige Signaltransduktionsplattformen, da sie aufgrund ihrer Lipid-Zusammensetzung bestimmte Proteine aus- bzw. einschliessen und so Proteine, die miteinander interagieren in physiologische Nähe zueinander bringen (Simons & Ehehalt 2002). Src-Kinasen, die die Umgebung der *rafts* favorisieren, sind ebenfalls wichtige Elemente von Signaltransduktionswegen (Parsons & Parsons 2004).

Das Lyn in Oligodendrozyten exprimiert wird und sowohl innerhalb, als auch außerhalb von *rafts* in Oligodendrozyten lokalisiert ist wurde bereits gezeigt (Kramer et al 1999) und in dieser Arbeit bestätigt. Im Myelin junger Mäuse wird Lyn ebenfalls sowohl in *rafts* als auch in anderen Bereichen der Plasmamembran exprimiert. Später ist die Lyn Expression insgesamt reduziert und konzentriert sich dann auf die *rafts*. Dies weist darauf hin, dass Lyn in unterschiedlichen Signaltransduktionswegen eine Rolle spielt und Lyn, je nach Lokalisation, mit unterschiedlichen Proteinen in Assoziation gebracht wird. Ob die Lyn Kinase mit dem AMPA-Rezeptor ausserhalb oder innerhalb von *rafts* assoziiert ist, konnte noch nicht geklärt werden. Es ist jedoch bekannt, dass auch der AMPA Rezeptor in *rafts* assoziiert sein kann (Hering et al 2003). Da die Lyn Kinase die Ausläuferbildung hemmt und dies eine Inhibierung von Zytoskelett-Elementen voraussetzt, muß die Lyn Kinase direkt oder indirekt Einfluss auf die Zytoskelett Bildung haben. Zytoskelett-Elemente sind häufig direkt oder über assoziierte Proteine mit *rafts* verbunden (Klein et al 2002, Taguchi et al 2005).

Lyn ist auch mit dem PDGF-Rezeptor und Integrin $\alpha V\beta 3$ assoziiert, wodurch die Proliferation gefördert wird. Diese Assoziation ist ebenfalls in Oligodendrozyten Vorläuferzellen zu detektieren (Colognato et al 2004). Es ist also wahrscheinlich, dass parallel ein Teil der Lyn Kinase mit dem PDGF-Rezeptor-Integrin-Komplex assoziiert ist, während ein anderer Teil an den AMPA-Rezeptor bindet. Da Lyn sowohl innerhalb als auch außerhalb von *rafts* exprimiert wird und so in die Umgebung unterschiedlicher Proteine gebracht werden kann, wäre es möglich, dass die beiden Komplexe in einem der jeweiligen Plasmamembran-Bereiche zu finden sind.

Da Lyn nicht ausschließlich in *rafts* zu detektieren ist, könnte es auch sein, dass bestimmte Ereignisse erst dazu führen, dass Lyn in die *rafts* rekrutiert wird. Dies ist schon aus T-Lymphozyten bekannt (Kovarova et al 2001).

5.2 Transfektion von Oligodendrozyten mit *Lyn*-Mutanten

5.2.1 Translation und Aktivität der *Lyn-GFP* Mutanten in

Oligodendrozyten

Um die Funktion der Lyn Kinase näher zu untersuchen, wurden Plasmide mit unterschiedlichen *Lyn-GFP* Konstrukten in Oli-*neu* Zellen und primären Oligodendrozyten transfiziert. Die Expression von endogenem Lyn scheint ebenfalls nach Transfektion erhöht zu sein. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass das transfizierte Lyn mit hemmenden Proteinen interagiert und so auf die endogene Lyn Expression einen positiven Einfluss hat.

Die Aktivität wurde durch den pY418 Antikörper bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass die beiden Wildtyp Konstrukte, sowie das konstitutiv aktive Konstrukt Aktivität aufweisen.

Die Aktivität zwischen dem Wildtyp und der konstitutiv aktiven Src Kinase zeigt nur einen geringen Unterschied. Die Quantifizierung des Oli-*neu* Blots zeigt eine 1,22fach stärkere Aktivität der konstitutiv aktiven Kinase im Verhältnis zum Wildtyp Konstrukt Bwt (nicht gezeigt). In Makrophagen wurde die Aktivität des konstitutiv aktivem Konstrukts als 4x höher beschrieben (Tolar et al 2004).

Die Tatsache, dass die Wildtyp Konstrukte zu einem hohen Prozentsatz aktiv sind kann durch die vorhandenen Bindungspartner in den Oligodendrozyten erklärt werden. In Makrophagen könnte die Csk-Kinase eine wichtige Rolle spielen und die Wildtyp Lyn-Konstrukte in einem inaktiven Zustand halten oder es gibt in

Oligodendrozyten viele Lyn-spezifische Liganden, die die Kinase aktivieren. Genaue Aktivierungs- und Deaktivierungsmechanismen in Makrophagen und Oligodendrozyten sind noch nicht bekannt.

Es bleibt anzumerken, dass der geringe Aktivitäts-Unterschied des *Y508F* Konstrukts und der Wildtyp-Konstrukte ausreicht, um eine stärkere Hemmung in der Ausläuferbildung und der Zelldifferenzierung zu beobachten.

5.2.2 Lyn Aktivität hemmt die Bildung zytoskelett-gestützter Ausläufer

Die Zellausläufer-Länge der *Y508F* transfizierten Oligodendrozyten ist im Vergleich zu nicht transfizierten Zellen signifikant kürzer. Die anderen Konstrukte zeigen keinen Einfluss auf die Zellausläuferlänge, jedoch auf die Anzahl der Ausläufer. Eine Transfektion mit inaktiven Konstrukten führt zu einer signifikanten Erhöhung der Zellausläufer-Anzahl, die Transfektion mit einem konstitutiv aktiven Konstrukt zu einer signifikanten Reduktion. Die Lyn Aktivität inhibiert also die Ausbildung von Zellausläufern.

Immunfluoreszenzfärbungen von transfizierten Oli-*neu* Zellen mit Tubulin und Aktin zeigen, dass die größeren, verzweigten Ausläufer Mikrotubuli- und Aktin-gestützte Ausläufer sind, wohingegen die kleinen, unverzweigten Ausläufer, die auf den Mikrotubuli Ausläufern und dem Zellkörper aufsitzen, ausschließlich Aktin besitzen. Bereits veröffentlichte Daten unterstützen diese Beobachtung. In Vorläuferzellen ist hauptsächlich Aktin zu finden, dass sich in den vielen feinen Fortsätzen konzentriert, Mikrotubuli sind nur im Zellkörper lokalisiert (Wilson & Brophy 1989). Die Filopodien des Aktin Zytoskeletts sind sehr dynamisch und wichtig für die Migration und den ersten Axon Kontakt (Collinson et al 1998, Simpson & Armstrong 1999). Während der Reifung der Oligodendrozyten entstehen größere Zellausläufer, die sich verzweigen und ein Mikrotubuli Zytoskelett besitzen. Dieses Zytoskelett ist für die Entstehung der Myelin-bildenden Ausläufer und für den Transport von Myelin-Komponenten zur Myelinisierungsstelle wichtig (Richter-Landsberg 2000).

Die Färbungen zeigen, dass die Lyn-Aktivität die Mikrotubuli-gestützten Ausläufer hemmt, wohingegen kleine Aktin-gestützte Ausläufer auch nach der Transfektion mit dem konstitutiv aktiven Konstrukt festzustellen sind. Hemmung der Lyn Aktivität führt zu einer stark vermehrten Bildung von Mikrotubuli Ausläufern. In diesen Zellen ist zwar auch die Anzahl an Aktin-gestützten Ausläufern erhöht, allerdings lässt sich dies auf die, durch die Mikrotubuli Ausläufer bedingte, größere Oberfläche zurückführen.

Wie die Lyn Kinase die Zellausläufer Bildung in Oligodendrozyten hemmt (Abb.28) kann unterschiedliche Gründe haben. Die Lyn Kinase könnte die Bildung filamentösen Tubulins oder Aktins durch Hemmung der Polymerisierung erreichen oder die Translation bzw. Aktivierung Tubulin- oder Aktin- depolymerisierender Proteine fördern. Studien oligodendroglialer Vorläuferzellen aus Ratten zeigen, dass die Hemmung der Ausläuferbildung in Oligodendrozyten durch die verstärkte Expression Mikrotubuli- und Mikrofilament-depolarisierender Proteine erreicht wird (Liu et al 2003). Leider gibt es noch keine konkreten Untersuchungen, welche Proteine dabei in Oligodendrozyten involviert sein könnten.

Mikrodomänen der Plasmamembran (*rafts*), in denen auch Lyn lokalisiert ist (Abb.19/20), sind sowohl mit Mikrotubuli, also auch mit Mikrofilamenten assoziiert (Klein et al 2002, Taguchi et al 2005) und können auf beide Zytoskelett Komponenten sowohl bildungsfördernd, als auch inhibierend wirken (Boggs & Wang 2004, Taguchi et al 2005).

In Oligodendrozyten ist bekannt, dass die Fyn Kinase die Zellausläuferbildung positiv beeinflusst und dabei sowohl mit dem Aktin- (über das Protein Mayven) (Jiang et al 2005) als auch mit dem Mikrotubuli-Zytoskelett (über das Protein Tau) (Klein et al 2002) assoziiert ist. Eine Assoziation der Lyn Kinase mit dem Zytoskelett wurde für Oligodendrozyten noch nicht beschrieben. Der AMPA-Rezeptor, mit dem Lyn assoziiert ist (Abb. 34), hat, wie auch die anderen Glutamat-Rezeptoren, in Neuronen einen Einfluss auf die Organisation des Aktin-Zytosketts. Calcium Einstrom in die Zelle führt zu einer Depolarisierung filamentösen Aktins (Cristofanilli & Akopian 2006, Slemmer et al 2005). In Oligodendrozyten ist der AMPA Rezeptor auch über Grip1 mit NG2 assoziiert (Stegmuller et al 2003). NG2 hat einen positiven Einfluss auf die Migration (Makagiansar et al 2007, Niehaus et al 1999) und ist mit dem Aktin-Zytoskelett verbunden (Fang et al 1999). Desweiteren wirken Matrix-Metalloproteinase-9 (Oh et al 1999), Neuroglycan C (Ichihara-Tanaka et al 2006), WAVE1 (Kim et al 2006) und Simvastatin (Miron et al 2007) positiv auf die Ausläuferbildung in Oligodendrozyten.

In anderen Zelltypen ist ein Einfluss der Lyn Kinase auf das Zytoskelett schon beschrieben. So aktiviert die Lyn Kinase indirekt MAP (microtubule-associated protein) in eosinophilen Granulozyten (Pazdrak et al 1995) und B-Zellen (Pleiman et al 1993) und beeinflusst so das Mikrotubuli Zytoskelett. In B-Zellen wird jedoch auch die Bindung des BC-Rezeptors an das Aktin-Zytoskelett durch die Lyn Kinase

vermittelt (Cheng et al 2001). In Makrophagen ist es an der Bildung des phagozytotischen *cups* beteiligt, dass mit einer Umstrukturierung des Aktin-Zytoskeletts einhergeht (Dombrosky-Ferlan et al 2003, Kwiatkowska et al 2003). In Zellen des zentralen Nervensystems wurde in Ratten eine Assoziation der Lyn Kinase mit dem Zytoskelett im Wachstumskegel von Neuronen nachgewiesen (Helmke & Pfenninger 1995). Lyn beeinflusst also, je nach Zelltyp, beide Zytoskelett Elemente.

Die Literatur gibt also keine eindeutigen Hinweise auf den möglichen Zytoskelett Partner von Lyn, der für die Hemmung der Ausläuferbildung verantwortlich sein könnte. Unsere ersten Beobachtungen deuten auf eine Inhibierung des Mikrotubuli Zytoskeletts hin, allerdings sind dies nur erste Hinweise, die durch weitere Experimente bestätigt werden müssen.

5.2.3 Lyn Aktivität hemmt die Differenzierung und Ausläuferbildung

Die Aktivität der Lyn Kinase beeinflusst jedoch nicht nur die Zellausläufer Bildung, sondern auch die Reifung der Oligodendrozyten (früher Marker NG2 (AN2), später Marker MAG). Ein Teil der Oli-*neu* Zellen zeigen *in vitro* eine spontane Differenzierung und exprimieren Proteine, die reife Oligodendrozyten markieren, wie PLP und MAG (Jung et al 1995). Die Lyn Aktivität hemmt diese spontane Differenzierung der Oli-*neu* Zellen. Signifikant weniger Zellen sind im reiferen MAG-positiven Stadium zu verzeichnen. Allerdings ist keine erhöhte Anzahl von stark NG2-positiven Zellen zu detektieren. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass Oli-*neu* Zellen zu einem hohen Prozentsatz NG2-positiv sind und die Hemmung der Differenzierung durch eine Lyn Aktivität keinen weiteren Einfluss auf die Anzahl der NG2-positiven Zellen haben kann. Inhibierung dieser Aktivität durch die Transfektion inaktiver Konstrukte fördert dagegen die Differenzierung in MAG-positive Zellen.

In primären Oligodendrozyten ist nach Transfektion des inaktiven Konstrukts eine erhöhte Anzahl MAG-positiver Zellen festzustellen, jedoch keine Reduktion von NG2-positiven Zellen. Außerdem zeigt das konstitutiv aktive Lyn-Konstrukt keine Hemmung der Differenzierung. Die primären Zellen sind sehr heterogen und die meisten Zellen haben den NG2-positiven Entwicklungsgrad zu Beginn des Experiments schon verlassen, wohingegen die Mehrzahl der Oli-*neu* Zellen vor der Transfektion NG2-positiv waren. Hierdurch kann es nach der Transfektion zu einer stärkeren und deutlicheren Verschiebung des Entwicklungsgrades kommen.

Außerdem könnten andere Mechanismen, die in den Oli-*neu* Zellen nicht vorhanden sind oder nicht aktiviert werden, in primären Zellen die reduzierte Aktivität von Lyn ausgleichen. Man kann davon ausgehen, dass unterschiedliche Signal Kaskaden für die Zellausläufer Bildung und Differenzierung der Oligodendrozyten verantwortlich sind.

So ist z.B. die Regulierung der Transkription bestimmter Proteine während der Oligodendrozyten Reifung von besonderer Bedeutung (Marin-Husstege et al 2002).

Neben intrazellulären sind auch extrazelluläre Mechanismen grundlegend für die Ausläuferbildung und Reifung der Oligodendrozyten wichtig. Adhesionmoleküle der Axone, wie L1 spielen hier genauso eine Rolle wie diffusionsfähige Moleküle, wie Wachstumsfaktoren. So haben z.B. auch Astrozyten einen positiven Einfluss auf die Ausläuferbildung der Oligodendrozyten durch die Sekretion von Wachstumsfaktoren, wie bFGF (Oh & Yong 1996). Von aktiven Neuronen freigesetztes Adenosin fördert die Differenzierung und Myelinisierung von Oligodendrozyten direkt (Stevens et al 2002) bzw. ATP steigert die Freisetzung von LIF (cytokine leukemia inhibitory factor) aus Astrozyten, dass seinerseits die Reifung der Oligodendrozyten fördert (Ishibashi et al 2006).

Auf eines dieser vielen Mechanismen zur Regulation der Ausläuferbildung und Reifung könnte Lyn inhibierend wirken.

Des Weiteren gibt es Signal-Kaskaden, die Einfluss auf die Ausläuferbildung und Reifung haben, jedoch in Oligodendrozyten noch nicht aufgedeckt wurden. So beeinflusst IGF-1 und der PI3K-Akt Signaltransduktionsweg die Ausläuferbildung in Neuronen, indem aktives PI3K an Tubulin bindet (Laurino et al 2005). In Oligodendrozyten ist bekannt, dass die Lyn Kinase sowohl mit IGF-1, als auch mit der PI3K-Kaskade interagiert (Colognato et al 2004, Cui et al 2005). IGF-1-defiziente Mäuse haben ein Defizit in der Myelinisierung, so dass IGF-1 ebenfalls eine wichtige Rolle in der die Ausläuferbildung der Oligodendrozyten spielt (Ye et al 2002).

Es war bis jetzt nicht bekannt, dass die Lyn Kinase die Ausläuferbildung in Oligodendrozyten inhibiert. Allerdings wurde die Inhibierung der Ausläuferbildung nach Stimulierung des AMPA-Rezeptors in Oligodendrozyten bestätigt (Gallo et al 1996). Weitere Untersuchungen müssen folgen, die zusätzliche Partner dieser Signal-Kaskade aufdecken.

5.3 Lyn Kinase und AMPA Rezeptor sind assoziiert

5.3.1 Die Lyn Kinase ist mit der GluRB/C Untereinheit des AMPA Rezeptors assoziiert

Aus Abb. 34 wird ersichtlich, dass die GluRB/C Untereinheit des AMPA-Rezeptors mit der Lyn Kinase assoziiert ist. Eine Assoziation beider Proteine wurde schon in Neuronen beschrieben (Hayashi et al 1999), deshalb war es von besonderer Bedeutung jegliche neuronale Kontamination auszuschließen. Eine zweifache Immunzytolyse von Neuronen in der Primärkultur, sowie negative Immunfluoreszenzfärbungen mit neuronenspezifischen Markern und die fehlende Detektion neuronaler Marker in der Immunpräzipitation und dem Gesamtlisat der Primärkultur schließen jegliche Kontamination aus. Lyn ist nicht nur in Neuronen, sondern auch in Oligodendrozyten mit dem AMPA-Rezeptor assoziiert.

Es sind beide Isoformen sowohl im Lysat als auch im Präzipitat zu sehen, allerdings ist ein weitaus größerer Teil der kleinen Lyn-Isoform B mit dem AMPA-Rezeptor assoziiert. Die beiden Isoformen unterscheiden sich ausschließlich in der „Unique“ Domäne (Xu et al 2005), die Bindung der Lyn Kinase an den AMPA-Rezeptor erfolgt jedoch über die SH3-Domäne (Hayashi et al 1999). Zusätzliche Assoziationen der „Unique“ Domäne an den AMPA-Rezeptor erhöhen möglicherweise die Affinität der kleinen Lyn Isoform B gegenüber der Isoform A.

Eine Transfektion von Lyn und Immunfluoreszenzfärbung gegen den AMPA-Rezeptor zeigt keine vollständige Co-Verteilung beider Proteine (Abb.35). In Neuronen wurde beschrieben, dass nur ca. 1-2% der Lyn Kinase mit dem AMPA Rezeptor im *Cerebellum* assoziiert ist (Hayashi et al 1999). In dieser Arbeit wurde keine Quantifizierung durchgeführt, jedoch scheint der Anteil assoziierten Lyn Proteins größer zu sein (Abb.34/35). Es wurden drei Tage alte Primär-Kulturen gewählt, die hauptsächlich aus undifferenzierten Oligodendrozyten und Vorläuferzellen bestehen, da die Expression der Lyn Kinase zu diesem Zeitpunkt am höchsten ist (Abb.12/14). Der AMPA-Rezeptor wird ebenfalls in oligodendroglialen Vorläuferzellen exprimiert und ist in differenzierten Oligodendrozyten nicht mehr zu detektieren (Bergles et al 2000, Borges & Kettenmann 1995, Gallo et al 1996). Die Funktion, die dieser Assoziation von AMPA-Rezeptor und Lyn Kinase zugrunde liegt, muss also in oligodendroglialen Vorläuferzellen liegen.

5.3.2 Stimulierung des Glutamat Rezeptors aktiviert die Lyn Kinase

In Abb.36 wird deutlich, dass es durch die Behandlung der Zellen mit Glutamat zu einer signifikanten Erhöhung der Lyn Kinase Aktivität kommt, während die Aktivität der Fyn Kinase gleich bleibt. Fyn wird also nicht durch Glutamat beeinflusst, wohingegen Lyn aktiviert wird. Da Lyn mit dem Glutamat Rezeptor AMPA assoziiert ist, kann angenommen werden, dass Lyn über den AMPA Rezeptor aktiviert wird. Die Calcium-unabhängige Aktivierung von Lyn durch den AMPA-Rezeptor wurde auch schon für Neuronen beschrieben (Hayashi et al 1999). Detektion des Gesamtproteins der Lyn Kinase macht jedoch deutlich, dass nur die kleinere Lyn-Isoform B (53kD) aktiviert wird, wohingegen keinerlei Aktivität der größeren Isoform A (56kD) vorhanden zu sein scheint. Die Lyn-Isoform B ist hauptsächlich mit GluRB/C assoziiert (Abb. 34) Es ist also wahrscheinlich, dass die kleine Lyn-Isoform B aus diesem Grund durch die Glutamat Behandlung aktiviert wird, während die Lyn-Isoform A andere Assoziationspartner besitzt.

Die Tatsache, dass beide transfizierten Isoformen eine Hemmung der Ausläuferbildung und Differenzierung herbeiführen können, kann dadurch erklärt werden, dass bei einer Transfektion die artifiziell exprimierten Proteine in sehr hohen Konzentrationen in der Zelle vorhanden sind und aus diesem Grund endogene Proteine verdrängen. Dadurch kann es dazu kommen, dass die Lyn-Isoform A, die in endogenen Konzentrationen keine Bindung mit dem AMPA-Rezeptor eingeht, dies im Falle der Überexpression tut und denselben Effekt erzielt.

5.3.3 Der AMPA Rezeptor inhibiert die Zelldifferenzierung

In Abb.38/39 wird deutlich, dass Glutamat nicht nur die Lyn Kinase aktiviert, sondern auch die Fortentwicklung der Oligodendrozyten hemmt. Die Anzahl undifferenzierter Oligodendrozyten Vorläuferzellen, die NG2 (AN2) exprimieren, ist nach Glutamat Behandlung signifikant erhöht ($p < 0,001$). Die Anzahl differenzierter MAG-positiver Zellen ist jedoch nicht verändert. Die Zellen, die nicht mit Glutamat behandelt wurden, werden auch nicht in ihrer Fortentwicklung behindert. Ein Teil der Zellen kann also das NG2 (AN2)-positive Stadium verlassen. Es kann jedoch sein, dass diese Zellen zum Zeitpunkt der Zellfixierung noch nicht den MAG-positiven Status erreicht haben. Dies würde erklären, warum nach Glutamat Behandlung signifikant mehr NG2-positive Zellen zu verzeichnen sind, jedoch nicht signifikant weniger MAG-positive Zellen.

Die vermehrte Anzahl NG2-positiver Zellen könnte man auch auf eine erhöhte Proliferationsrate zurückführen. Dieser Erklärungsansatz ist jedoch unwahrscheinlich, da Glutamat in Oligodendrozyten eher die Proliferation hemmt als fördert (Gallo et al 1996).

Das Glutamat, dass Lyn über den AMPA-Rezeptor aktiviert, kann sowohl von den Synapsen oder Axonen der Neurone freigesetzt werden (Gallo & Ghiani 2000), als auch von Astrozyten (Fellin et al 2006). Welchen Ursprungs das Glutamat *in vivo* ist, dass für die Hemmung der Oligodendrozyten Entwicklung verantwortlich ist, kann in dieser Arbeit nicht geklärt werden und wird in den Hypothesen (Abb.41) weitergehend diskutiert.

Welche weiteren Proteine in der GluRB/C-Lyn Signal-Kaskade in Oligodendrozyten involviert sind, ist noch nicht vollständig geklärt. Da die Ausläuferbildung Veränderungen im Zytoskelett voraussetzt, müssen Zytoskelett-Elemente oder dessen assoziierte Proteine in die Kaskade involviert sein (Wilson & Brophy 1989). Das die Stimulierung des AMPA Rezeptors sowohl die Ausläuferbildung als auch die Differenzierung in Oligodendrozyten durch die Blockade von K⁺-Kanälen inhibiert wurde schon gezeigt (Gallo et al 1996, Yuan et al 1998). Allerdings wurde erst in dieser Arbeit ein Zusammenhang zur Lyn Kinase hergestellt. Es wurde beschrieben, dass Lyn durch den AMPA-Rezeptor in Neuronen Calcium-unabhängig aktiviert wird (Hayashi et al 1999). Die AMPA-Rezeptor-abhängige Inhibierung der Ausläuferbildung und Differenzierung in Oligodendrozyten wurde ebenfalls als Calcium-unabhängig beschrieben (Gallo et al 1996, Yuan et al 1998).

Lyn könnte nach Aktivierung durch den AMPA-Rezeptor die K⁺-Kanäle blockieren und hierdurch die Inhibierung herbeiführen. Während die Blockade der K⁺-Kanäle eine Anreicherung von Zyklin-abhängigen Kinase-Inhibitoren p27(Kip1) und p21(CIP1) bedingt und es so zu einer Inhibierung der Proliferation durch Hemmung des Zellzyklus in der G1-Phase kommt, ist der Mechanismus der Hemmung der Differenzierung weiterhin nicht bekannt (Ghiani et al 1999b).

In Neuronen wird durch die Aktivierung der Lyn Kinase sowohl die MAPK als auch die PI3K Kaskade aktiviert (Hayashi et al 1999, Wu et al 2004). In Oligodendrozyten wurde bis jetzt noch kein Zusammenhang zwischen der MAPK Kaskade und Lyn festgestellt. Die MAPK-Kaskade fördert über BDNF (Du et al 2006) bzw. durch den Fyn-Integrin $\alpha 6\beta 1$ -Komplex (Colognato et al 2004) die Differenzierung von Oligodendrozyten. Die PI3K Kaskade, aktiviert durch IGF-1, spielt eine wichtige Rolle

im Fortbestand von Oligodendrozyten. Die Lyn Kinase könnte in dieser Signal-Kaskade involviert sein (Cui et al 2005). Es ist jedoch nicht bekannt, dass die MAPK oder PI3K Kaskade in der Hemmung der Zelldifferenzierung involviert sind.

Inhibierende Funktionen der Lyn Kinase können auch in anderen Zellen, besonders des Immunsystems festgestellt werden. So kommt es in Lyn-defizienten Mäusen durch die fehlende Lyn Aktivität in B-Zellen, Mastzellen und Makrophagen zu Autoimmunkrankheiten (Crowley et al 1997, Enyedy et al 2001, Xu et al 2005). Die demyelinisierende Autoimmunkrankheit EAE in Mäusen erreicht in Lyn-defizienten Mäusen schneller einen erhöhten Schweregrad unter Anderem aufgrund von einer reduzierten Produktion von Zytokinen (Du & Sriram 2002).

5.4 Die Lyn Expression in der Zelllinie Oli-*neu* verläuft zyklisch

Die Detektion der Lyn Kinase in Oli-*neu* Zellen gestaltete sich während des Projektes als schwierig, da die Expression sehr schwach und zeitlich unterschiedlich ist (Abb.10/11/17). Adhesive Zellen einer Zelllinie können aufgrund von Kontakt Inhibierung (nach Trypsinierung) und wechselnden Serum Konzentrationen zur Synchronisation des Zell Zyklus gebracht werden (Hill et al 1977, Schorl & Sedivy 2007). Oli-*neu* Zellen, die nach der Trypsinierung und vor der erneuten Aussaat in Kulturschalen, in ihrem Zellzyklus synchronisiert wurden, zeigen eine zyklische Expression der Lyn Kinase (Abb.18). Die zyklische Expression wiederholt sich in etwa alle 24h und entspricht damit der Dauer eines Zellzyklus (Shi et al 1998). Dies könnte bedeuten, dass die Funktion der Lyn Kinase in bestimmten Zeiten des Zellzyklus eine Rolle spielt. Hierbei könnte die Lyn Kinase selbst den Zellzyklus Verlauf fördern oder inhibieren oder andere Funktionen übernehmen, die jedoch Zellzyklus-abhängig sind.

In anderen Zellen beeinflusst die Lyn Kinase ebenfalls den Zellzyklus. In B-Zellen interagiert Lyn mit Shc, Cbl und Vav, die ebenfalls den Zellzyklus und das Zytoskelett regulieren, sowie Felc, ein Protein nahe verwandt mit dem Protein CIP4 (cdk-interacting protein) (Dombrosky-Ferlan et al 2003). Shc, Cbl und Vav sind an der Regulierung von Proliferation und Differenzierung in B-Zellen beteiligt (Smit et al 1996). In HL60 Zellen führt eine Lyn Aktivität ebenfalls zu einer Arrestierung des Zellzyklus in der G1-Phase (Wang et al 2000) und auch in Mastzellen wird die Proliferation durch Lyn inhibiert (Hernandez-Hansen et al 2004). Auch der AMPA-Rezeptor wirkt hemmend auf die Proliferation von Zellen. Retinale Vorläuferzellen

können z.B. durch Glutamat-abhängige Stimulierung des AMPA-Rezeptors in der Proliferation gehemmt werden (Martins et al 2006).

In Oligodendrozyten inhibiert der AMPA-Rezeptor über die Blockierung von K⁺-Kanälen sowohl die Differenzierung als auch die Proliferation (Gallo et al 1996). Die Anhäufung von p27/Kip1 fördert hierbei die Inhibierung der Proliferation (Gallo & Ghiani 2000, Ghiani et al 1999a, Ghiani et al 1999b, Nguyen et al 2006). Es ist bekannt, dass die Lyn Kinase p27/Kip1 in einigen Zelllinien reguliert und die Proliferation inhibiert (Grimmler et al 2007, Niv et al 2004). Da Lyn mit dem AMPA-Rezeptor assoziiert ist, könnte die Lyn Kinase für diese Zellzyklus-abhängige Aufgabe entscheidend sein und die Zelle in der G1-Phase inhibieren, so dass es zu keiner weiteren Proliferation mehr kommt. Die Zyklin-abhängigen Kinasen, die für die Regulation des Zellzyklus in Oligodendrozyten wichtig sind, sowie für den Übergang von Proliferation zu Differenzierung sind ZyklinE/Zyklin-abhängige Kinase 2. Sie könnten außerdem eine Rolle in der Verlangsamung der Proliferation in adulten OPC's spielen (Belachew et al 2002, Ghiani & Gallo 2001).

Eine zyklische Expression findet man auch bei Proteinen, die in der Regulierung der „inneren Uhr“ involviert sind. Hier ist der typische Expressionszyklus, wie bei der Lyn Kinase, ebenfalls 24h, da er vom Tag-Nacht-Zyklus abhängig ist (Hastings & Maywood 2000). Lichtempfindliche Zellen im suprachiasmatischen Kern des Gehirns sind für die exakte Anpassung des Zyklus an den Tag-Nacht-Rhythmus zuständig und geben diesen an die übrigen Zellen des Organismus durch Hormonausschüttungen oder durch neuronale Kommunikation weiter (Kalsbeek et al 2006, Kavakli & Sancar 2002). In den Zellen sorgt ein komplexer autonomer Mechanismus, der Protein-Expressionen durch negative und positive feedback-loops reguliert, für die Einhaltung dieses speziellen, auf die Funktion der Zelle abgestimmten Rhythmus. Wichtigste Komponenten dieses Mechanismus sind die Proteine Clock, BMAL1, Per und Cry (Kavakli & Sancar 2002).

Viele Zellen beenden ihre Proliferationsphase nach einer bestimmten Anzahl an Zellzyklen oder einer bestimmten Zeit. Diese Regulation könnte durch die innere Uhr bestimmt werden (Roussel 2000). Oligodendrozyten proliferieren ebenfalls innerhalb einer bestimmten Zeit, um dann von der Proliferationsphase in die Differenzierungsphase überzugehen. PDGF und TH sind an dieser Regulation beteiligt (Barres et al 1994). Außerdem erhöht sich mit jedem Proliferationszyklus die Konzentration von p27/Kip1 in der Zelle, so dass auch dieser Zyklin-abhängige

Kinase-Inhibitor in den Zeitmechanismus involviert zu sein scheint und den Übergang von Proliferation zu Differenzierung mitreguliert. p27^{-/-} Mäuse sind besonders groß und unterstützen so die These (Durand et al 1997, Gao et al 1997).

Die Lyn- und AMPA-Rezeptor Expression wird schließlich herunterreguliert und bestimmte Faktoren, wie Signale von Axonen oder Astrozyten müssen hinzukommen um die Differenzierung einzuleiten.

In dieser Arbeit wurde die Funktion der Lyn Kinase in der Proliferation nicht weitergehend untersucht. Es sollten jedoch Experimente folgen, so z.B. ein Proliferations-Assay mittels BrdU nach Transfektion der Lyn-Mutanten in Oligodendrozyten.

5.5 Hypothese 1: Die Lyn Kinase reguliert die zeitliche Entwicklung von Oligodendrozyten

Perinatale oligodendrogliale Vorläuferzellen (OPC) migrieren und proliferieren, bis sie zu einem bestimmten Zeitpunkt differenzieren. Mit der Differenzierung verlieren sie die Möglichkeit der Proliferation. Bestimmte Wachstumsfaktoren, wie PDGF oder cAMP sind für die Proliferation wichtig. Für den Übergang von Proliferation zu Differenzierung scheinen intrinsische Faktoren eine Rolle zu spielen, die zeitlich abgestimmt die Proliferation und/oder Differenzierung hemmen bzw. fördern (Shi et al 1998). In diesem Prozess könnte auch Lyn eine Rolle spielen und im Komplex mit dem AMPA-Rezeptor eine ähnliche Funktion übernehmen wie der Notch-Jagged1 Komplex (Abb.41, Hypothese 1).

Für den Notch-Jagged1 Komplex wurde eine Hemmung der Differenzierung bei perinatalen OPC's am optischen Nerv beschrieben (Wang et al 1998) (1.2.4).

Der AMPA-Rezeptor und die Lyn Kinase werden ebenfalls nur bzw. hauptsächlich in OPC's exprimiert. Die Inhibierung der Differenzierung durch diesen Komplex könnte hier auch über die Axone erfolgen, indem diese Glutamat freisetzen (Gallo & Ghiani 2000). Nach der Herunterregulierung der Lyn und AMPA-Rezeptor Expression kann dann ebenfalls die Differenzierung einsetzen. Die Expression der Lyn Kinase im Myelin wird ab P16 herunterreguliert (Abb.12), die Aktivität der Lyn Kinase in rafts des Myelins ist schon nach P12 stark reduziert (Abb.21). Da die Myelinisierung im murinen Gehirn mit P7 beginnt, P15 am stärksten ist und ab P28 abgeschlossen (Murtie et al 2005), wird Lyn nur zu Beginn der Differenzierung exprimiert und die Aktivität nimmt schon sehr schnell nach der Initiierung der Myelinisierung ab. An dem

Tag, an dem die Myelinisierung seinen Höhepunkt erreicht, ist kaum noch Lyn Aktivität zu messen. Die verbleibende Lyn Aktivität und Expression könnte sich auf die Zellen beschränken, die im OPC Stadium verbleiben und später die Gruppe der adulten OPC's bilden.

Ein weiteres Argument für diese Hypothese ist die zyklische Expression der Lyn Kinase alle 24h, die in *Oli-neu* Zellen beobachtet werden kann. Dies könnte darauf hinweisen, dass die Lyn Kinase den Zellzyklus reguliert und in einem Zeitmechanismus involviert ist, der für einen zeitlich genauen Übergang von Proliferation zu Differenzierung sorgt. Der AMPA-Rezeptor hemmt in Oligodendrozyten die Proliferation über die Cdk's p27/Kip1, Zyklin-Inhibitoren (Ghiani et al 1999a, Ghiani et al 1999b). Die Konzentration dieser Inhibitoren erhöht sich mit jedem Proliferationszyklus, so dass auch dieser Zyklin-abhängige Kinase-Inhibitor in den Zeitmechanismus involviert zu sein scheint und den Übergang von Proliferation zu Differenzierung mitreguliert (Durand et al 1997, Gao et al 1997). Lyn könnte hier involviert sein und so den Entwicklungsstillstand der Zellen hervorrufen bis die Lyn Expression herunterreguliert wird und andere Faktoren die Differenzierung einleiten.

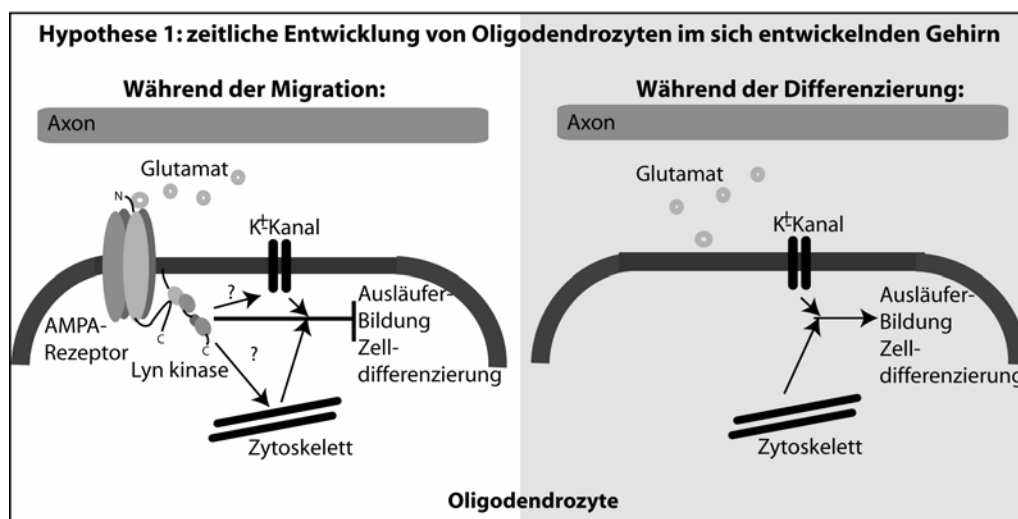


Abbildung 41: Schemazeichnung der Hypothese „zeitliche Entwicklung“

Hypothese1: Die Lyn Kinase in perinatalen Oligodendrozyten Vorläuferzellen unterdrückt die Differenzierung und reguliert damit die zeitliche Abfolge von Migration, Proliferation und Differenzierung.

5.6 Hypothese 2: Die Lyn Kinase reguliert den Fortbestand von Oligodendrozyten Vorläuferzellen im adulten Gehirn

Im adulten Gehirn verbleiben oligodendrogliale Vorläuferzellen (OPC), die im Vergleich zu perinatalen OPC's in Anwesenheit von PDGF langsamer proliferieren. Im Gegensatz zu perinatalen OPC's wird die Proliferationsrate adulter OPC's nur erhöht, wenn GGF2, cAMP und PDGF zur Verfügung stehen (Shi et al 1998). Des Weiteren sind auch Migrationsrate und Differenzierungsdauer in adulten OPC's verlangsamt (Wolswijk & Noble 1989). Alle drei Wachstumsfaktoren könnten im adulten Gehirn dann von Axonen sekretiert werden, wenn es zu einer Demyelinisierung kommt und die Axone keine Myelinschicht mehr besitzen. Dies könnte bedeuten, dass die Erhöhung der Proliferationsrate und die spätere Differenzierung und Myelinisierung eine wichtige Rolle bei der Remyelinisierung spielt. In diesem Prozess könnte auch die Lyn Kinase eine Rolle spielen und im Komplex mit dem AMPA-Rezeptor eine ähnliche Funktion übernehmen wie der Notch-Jagged1 Komplex (Abb.41, Hypothese 2) (1.2.4).

Der Notch-Jagged1 Signaltransduktionsweg inhibiert sowohl die Differenzierung von perinatalen als auch adulten Oligodendrozyten (Hu et al 2004, Wang et al 1998).

Anders als bei vielen Wachstumsfaktoren wie PDGF und GGF2, die die Proliferation fördern und dadurch die Differenzierung indirekt hemmen, kann man bei der Hemmung durch die Aktivierung des Notch-Rezeptors keinen Zusammenhang zur Proliferation erkennen. Sie wird weder gefördert noch hat der Jagged1-Notch Komplex einen Einfluss auf die Wachstumsfaktoren (Wang et al 1998).

Da Lyn im Komplex mit dem AMPA-Rezeptor ebenfalls die Differenzierung hemmt, könnte Lyn in dem Mechanismus der Remyelinisierung ebenfalls eine regulierende Funktion übernehmen. Dies könnte sicherstellen, dass die Zellen nicht differenzieren, solange keine Remyelinisierung notwendig ist. Außerdem müssen die Zellen vor der Remyelinisierung proliferieren (Gensert & Goldman 1997), es soll also zu keiner verfrühten Differenzierung kommen. GGF2 greift hier ebenfalls ein und fördert nicht nur die Proliferation, sondern hemmt auch die Differenzierung (Shi et al 1998). Als dritter Punkt könnte von Bedeutung sein, dass nicht alle Zellen für die Remyelinisierung bereit stehen sollen, sondern einige im undifferenzierten Zustand verbleiben um zu einem späteren Zeitpunkt für eine Remyelinisierung bereit zu stehen. Dies benötigt einen komplexen, vielschichtigen Regulierungsapparat, indem Lyn zeitweise in die Inhibierung der Differenzierung involviert sein könnte, bis die Lyn

Kinase deaktiviert bzw. die Expression der Lyn Kinase unterdrückt wird. Das Glutamat, dass Lyn über den AMPA-Rezeptor aktiviert, könnte von Astrozyten (Fellin et al 2006) sowie Axonen stammen, die aufgrund ihres Durchmessers nicht myelinisiert wurden (Gallo & Ghiani 2000, Kukley et al 2007, Ziskin et al 2007).

Argumente für die Hypothese sind die Ergebnisse, dass die Lyn Kinase Aktivität und Expression in Oligodendrozyten des adulten Gehirns zwar stark reduziert ist, jedoch nie ganz verschwindet. Die Aktivität und Expression könnte sich auf die adulten OPC's beschränken. Diese sind NG2-positiv und *in vitro* Untersuchungen haben gezeigt, dass signifikant viele Lyn-positive Zellen auch NG2-positiv sind. In *in vivo* Untersuchungen konnten keine Lyn/NG2-positiven Zellen im *Corpus Callosum* 9 Tage alter Mäuse gefunden werden, vielleicht weil die NG2-positiven Zellen dort im Begriff waren zu differenzieren. Im *Thalamus*, eine Region in der wenige Axone myelinisiert werden, konnten jedoch Lyn/NG2-positive Zellen detektiert werden.

Ob die Aktivität der Lyn Kinase die Proliferation positiv oder negativ beeinflusst, wurde in diesem Projekt nicht untersucht. Allerdings inhibiert die Aktivität des AMPA-Rezeptor nicht nur die Differenzierung, sondern auch die Proliferation in Oligodendrozyten (Gallo et al 1996, Yuan et al 1998). Außerdem wird die Lyn Kinase zyklisch exprimiert, ein Hinweis darauf, dass sie in den Zellzyklus involviert ist. Man kann also annehmen, dass der AMPA-Lyn Komplex ähnlich wie der Jagged1-Notch Komplex wirkt und eine ähnliche Aufgabe hat. Die Zellen werden zeitweise in einen Ruhezustand versetzt bis bestimmte andere Mechanismen einsetzen, wie die Freisetzung von GGF2, PDGF und cAMP durch demyelinisierte Axone. Intrinsische Mechanismen sind nun wichtig für die Überleitung in den Differenzierungsmodus, indem z.B. TH eine Rolle spielt (Casaccia-Bonofil et al 1997, Raff et al 1998, Tang et al 2000, Tokumoto et al 2001). Die Lyn Kinase, der AMPA-Rezeptor und auch die Jagged1 Expression wird schließlich herunterreguliert und die Inhibierung der Differenzierung dadurch aufgehoben.

5.7 Hypothese 3: Die Lyn Kinase spielt eine Rolle in der Neuron-Glia Synapsenbildung

Im adulten Gehirn gibt es sowohl in der weißen als auch in der grauen Substanz NG2-positive Zellen. Da die NG2-positiven Zellen heterogen zu sein scheinen und teilweise eventuell gar nicht alle zu den Oligodendrozyten Vorläuferzellen gehören, werden sie auch Synantozysten genannt (Butt et al 2005). Ein Teil dieser Zellen bilden

Synapsen mit Neuronen (Abb.41, Hypothese 3) (Lin et al 2005, Ziskin et al 2007). Glutamat, freigesetzt von Neuronen, stimuliert den AMPA-Rezeptor dieser Synantozysten, und dies führt zu einer Erhöhung der Calcium-Konzentration in der Zelle (Bergles et al 2000, Butt et al 2005, Chittajallu et al 2004). Da sie K^+ - und Na^+ -Kanäle besitzen, sind sie in der Lage unreife Aktionspotentiale zu initiieren (Butt et al 2005, Wigley et al 2007).

In unseren Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass ein besonders hoher Anteil NG2-positiver Zellen in Kultur auch Lyn exprimiert. Dabei kann es sich neben den beschriebenen adulten OPC's auch um die NG2-positiven Zellen handeln, die Synapsen mit Neuronen bilden. Die Aktivierung der Lyn Kinase durch den AMPA-Rezeptor belässt diese Zellen in einem Vorläuferstadium, wie man nach Transfektion mit Lyn-Mutanten sehen kann.

Wenn es zu einer Synapsenbildung zwischen Neuron und Synantozyt kommt, könnte es sein, dass diese NG2-positive Zelle nicht zu einer myelinisierenden Oligodendrozyte heranreift, sondern in einem undifferenzierten Zustand verbleibt um die Aufgabe der Synapsenbildung und Weiterleitung von Aktionspotentialen zu übernehmen. Deshalb löst die Stimulierung des AMPA-Rezeptors nicht nur Aktionspotentiale aus, sondern es aktiviert auch die Lyn Kinase um die Zelle in diesem Zustand zu belassen.

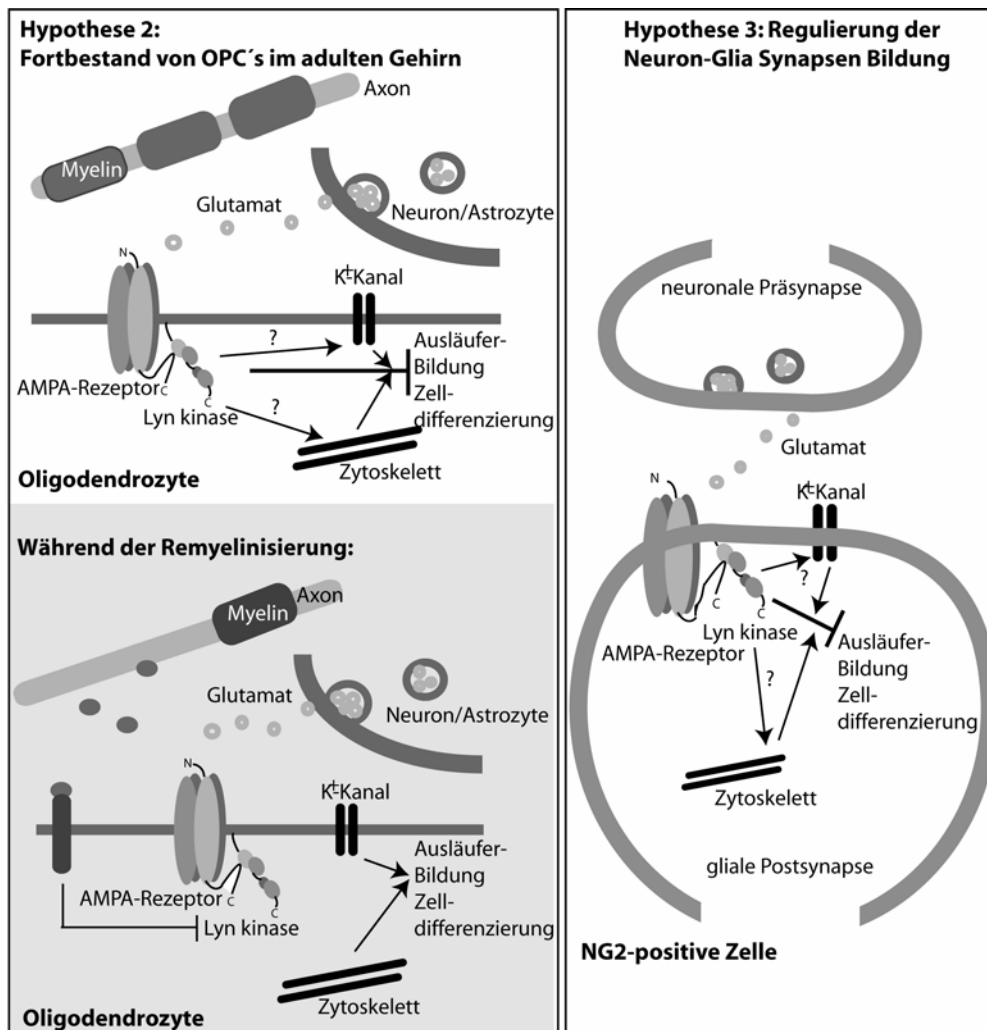


Abbildung 42: Schemazeichnungen der Hypothesen: Remyelinisierung und Neuron-Glia-Synapse

Hypothese 2: Remyelinisierung; die Lyn Kinase unterdrückt die Differenzierung von adulten Oligodendrozyten Vorläuferzellen, die als Stammzellen fungieren und somit im Falle einer Demyelinisierung für eine Remyelinisierung bereit zu stehen. **Hypothese 3: Neuron-Glia Synapse;** Die Lyn Kinase unterdrückt die Differenzierung von Oligodendrozyten um die Bildung von Glia-Neuron Synapsen zu ermöglichen.

5.8 Überblick und Ausblick

Die Ergebnisse dieses Projektes machen deutlich, dass die Lyn Kinase, genau wie der AMPA-Rezeptor, in undifferenzierten Oligodendrozyten exprimiert wird. Hierfür kommen sowohl perinatale als auch adulte OPC's bzw. Synantozysten in Frage. Expression und Aktivität findet man jedoch hauptsächlich in Gehirnen junger Mäuse kurz vor und während der Myelinisierung. Die Tatsache, dass Lyn sowohl innerhalb als auch ausserhalb von *rafts* in der Plasmamembran zu finden ist zeigt, dass die Kinase, je nach Umfeld, in unterschiedlichen Signalkaskaden involviert sein könnte. Die zyklische Expression der Lyn Kinase von 24h in Oli-*neu* Zellen ist ein Hinweis

darauf, dass Lyn in der Regulierung des Zellzyklus involviert sein könnte. Expression von Lyn-Mutanten in Oligodendrozyten zeigen eine Funktion der Lyn Kinase in der Ausläuferbildung und Differenzierung. Lyn Aktivität hemmt beide Vorgänge. Aktivierung von Lyn durch den AMPA-Rezeptor zeigt ebenfalls eine Inhibierung der Differenzierung. Welche Zytoskelett-Elemente hier beeinflusst werden bleibt unbeantwortet, jedoch deuten erste Ergebnisse auf die Inhibierung des Mikrotubuli Zytoskeletts.

Welche biologische Relevanz könnte die Inhibierung der Ausläuferbildung und Differenzierung haben? Welche Bedeutung könnte die zyklische Expression der Lyn Kinase hierbei haben? Drei Hypothesen wurden aufgezeigt, die alle möglich sind und durch weitere Experimente belegt werden müssen. Zum einen könnte die Lyn Kinase den zeitlichen Übergang von Proliferation und Differenzierung in Oligodendrozyten regulieren und zwar sowohl in perinatalen oligodendrogialen Vorläuferzellen, als auch, unter besonderen Umständen, in adulten oligodendrogialen Vorläuferzellen. Des Weiteren könnte die Lyn Kinase auch eine Rolle in der Neuron-Glia-Synapsenbildung spielen.

Die Fragestellung dieses Projekts wurde weitestgehend beantwortet. Die Expression und Aktivität der Lyn Kinase wurde charakterisiert, die Hemmung der Zellausläuferbildung und Differenzierung aufgedeckt und die Assoziation mit dem AMPA-Rezeptor dargelegt und dessen Einflussnahme auf die Inhibierung gezeigt. Trotzdem bleiben noch viele Fragen offen.

Es sollten weitere Proteine, die in der Lyn-AMPA-Rezeptor Signalkaskade involviert sind durch Immunpräzipitationen aufgedeckt werden. Insbesondere die Zytoskelett-Elemente, die für die Hemmung der Zellausläuferbildung verantwortlich sind, sind von besonderem Interesse. Hier könnte man, nach Transfektion mit inaktiven *Lyn* Mutanten, das Tubulin- bzw. Aktin-Zytoskelett durch die Inhibitoren Colchicin und Cytochalasin hemmen und die Zellausläufer-Bildung untersuchen.

Besonders wichtig wäre auch herauszufinden, ob Lyn die Proliferation oder Migration beeinflusst, da AMPA neben der Differenzierung auch die Proliferation hemmt und die Migration reguliert. Migrations-Assays und Proliferations-Assay mittels BrdU nach Transfektion der *Lyn*-Mutanten in Oligodendrozyten könnten diese Frage beantworten.

Die genaue Bestimmung der Lyn Expression während des Zellzyklus in *Oli-neu* könnte ebenfalls zur Aufklärung beitragen, inwieweit Lyn in die Regulation des

Zellzyklus involviert ist. Die Detektion von Zyklinen und Lyn mittels Western Blot ermöglicht eine genaue Bestimmung der Zellzyklus-Phase in der Lyn exprimiert wird. Außerdem sollte überprüft werden, ob Lyn einen direkten Einfluss auf die Expression von p27/Kip1 hat.

Um die Hypothesen weitergehend zu überprüfen sollten auch *in vivo* Untersuchungen folgen. Wann genau findet man im Gehirn Lyn/NG2-positive Zellen? In welchen Regionen des Gehirns sind sie? Bilden sie Synapsen, migrieren sie verstärkt zu Läsionen, findet man sie während der Gehirnentwicklung am optischen Nerv? Immunfärbungen von Oligodendrozyten Vorläuferzellen in verschiedenen Bereichen (weiße/graue Substanz) und zu verschiedenen Zeitpunkten (Kurz vor der Differenzierung/im adulten Gehirn) sollte einen besseren Überblick über die möglichen Aufgaben geben.

Außerdem sollten Lyn-defiziente Mäuse noch einmal unter neuen Gesichtspunkten untersucht werden, z.B. ob die zeitliche Regulation von Proliferation und Differenzierung verändert ist und ob die Anzahl von adulten OPC's bzw. Synantozysten erhöht ist, sowie die Anzahl von Neuron-Glia Synapsen.

6 Zusammenfassung

Die Bildung, Aufrechterhaltung und die Funktionalität von Oligodendrozyten, den myelinisierenden Zellen des ZNS, bedarf einer präzisen Regulation von Ereignissen wie Migration, Proliferation und Differenzierung. Die Src-Kinasen spielen in vielen Signalkaskaden eine zentrale Rolle. In murinen Oligodendrozyten werden die beiden Src-Kinasen Fyn und Lyn exprimiert, diese Arbeit konzentriert sich auf die Analyse der Lyn Kinase.

Es konnte die Expression von Lyn in Oligodendrozyten und Myelin *in vitro* und *in vivo* bestätigen werden, sowie die Lokalisation innerhalb und außerhalb von *rafts*. Je älter die Mäuse, desto weniger Lyn wird in Myelin exprimiert und desto stärker ist das verbleibende Lyn in den *rafts* lokalisiert. Die Aktivität von Lyn ist im Myelin 12-Tage alter Mäuse am höchsten. Synchronisation des Zellzyklus in Oli-*neu* Zellen zeigte eine zyklische Expression von Lyn. Transfektion aktiver und inaktiver Konstrukte machte deutlich, dass eine Lyn Aktivität die Zellausläufer Bildung, sowie die Differenzierung der Zelle, hemmt. Es konnte eine Assoziation der GluRB/C Untereinheit des AMPA Rezeptors mit Lyn nachgewiesen werden. Stimulierung des AMPA-Rezeptors mit Glutamat führte zu einer Aktivierung der Lyn Kinase und daraus resultierend, zu einer Inhibierung der Zelldifferenzierung.

Welche biologische Relevanz diese Ergebnisse haben könnten, wurde in drei Hypothesen festgehalten. Zum einen könnte die Lyn Kinase den zeitlichen Übergang von Proliferation und Differenzierung in Oligodendrozyten regulieren und zwar sowohl in perinatalen oligodendroglialen Vorläuferzellen, als auch, unter besonderen Umständen, in adulten oligodendroglialen Vorläuferzellen. Des Weiteren könnte die Lyn Kinase auch eine Rolle in der Neuron-Glia-Synapsenbildung spielen. Weitere Versuche, insbesondere *in vivo*, müssen folgen, um diese Hypothesen zu bestätigen oder zu widerlegen.

7 Literatur

- Arroyo EJ, Scherer SS.** 2000. On the molecular architecture of myelinated fibers. *Histochem Cell Biol* 113: 1-18
- Arudchandran R, Brown MJ, Song JS, Wank SA, Haleem-Smith H, Rivera J.** 1999. Polyethylene glycol-mediated infection of non-permissive mammalian cells with semliki forest virus: application to signal transduction studies. *J Immunol Methods* 222: 197-208
- Arvanitis DN, Min W, Gong Y, Heng YM, Boggs JM.** 2005. Two types of detergent-insoluble, glycosphingolipid/cholesterol-rich membrane domains from isolated myelin. *J Neurochem* 94: 1696-710
- Baron W, Colognato H, ffrench-Constant C.** 2005. Integrin-growth factor interactions as regulators of oligodendroglial development and function. *Glia* 49: 467-79
- Barres BA, Lazar MA, Raff MC.** 1994. A novel role for thyroid hormone, glucocorticoids and retinoic acid in timing oligodendrocyte development. *Development* 120: 1097-108
- Baumann N, Pham-Dinh D.** 2001. Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiol Rev* 81: 871-927
- Belachew S, Aguirre AA, Wang H, Vautier F, Yuan X, et al.** 2002. Cyclin-dependent kinase-2 controls oligodendrocyte progenitor cell cycle progression and is downregulated in adult oligodendrocyte progenitors. *J Neurosci* 22: 8553-62
- Bergles DE, Roberts JD, Somogyi P, Jahr CE.** 2000. Glutamatergic synapses on oligodendrocyte precursor cells in the hippocampus. *Nature* 405: 187-91
- Bewarder N, Weinrich V, Budde P, Hartmann D, Flaswinkel H, et al.** 1996. In vivo and in vitro specificity of protein tyrosine kinases for immunoglobulin G receptor (FcγRII) phosphorylation. *Mol Cell Biol* 16: 4735-43
- Boggon TJ, Eck MJ.** 2004. Structure and regulation of Src family kinases. *Oncogene* 23: 7918-27
- Boggs JM, Wang H.** 2004. Co-clustering of galactosylceramide and membrane proteins in oligodendrocyte membranes on interaction with polyvalent carbohydrate and prevention by an intact cytoskeleton. *J Neurosci Res* 76: 342-55
- Bogler O, Wren D, Barnett SC, Land H, Noble M.** 1990. Cooperation between two growth factors promotes extended self-renewal and inhibits differentiation of oligodendrocyte-type-2 astrocyte (O-2A) progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 6368-72
- Boiko T, Winckler B.** 2006. Myelin under construction -- teamwork required. *J Cell Biol* 172: 799-801

- Borges K, Kettenmann H.** 1995. Blockade of K⁺ channels induced by AMPA/kainate receptor activation in mouse oligodendrocyte precursor cells is mediated by Na⁺ entry. *J Neurosci Res* 42: 579-93
- Bottenstein JE, Sato GH.** 1979. Growth of a rat neuroblastoma cell line in serum-free supplemented medium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76: 514-7
- Bradford MM.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-54
- Braithwaite SP, Meyer G, Henley JM.** 2000. Interactions between AMPA receptors and intracellular proteins. *Neuropharmacology* 39: 919-30
- Brown MT, Cooper JA.** 1996. Regulation, substrates and functions of src. *Biochim Biophys Acta* 1287: 121-49
- Butt AM.** 2006. Neurotransmitter-mediated calcium signalling in oligodendrocyte physiology and pathology. *Glia* 54: 666-75
- Butt AM, Hamilton N, Hubbard P, Pugh M, Ibrahim M.** 2005. Synantocytes: the fifth element. *J Anat* 207: 695-706
- Cambier JC, Jensen WA.** 1994. The hetero-oligomeric antigen receptor complex and its coupling to cytoplasmic effectors. *Curr Opin Genet Dev* 4: 55-63
- Casaccia-Bonofil P, Tikoo R, Kiyokawa H, Friedrich V, Jr., Chao MV, Koff A.** 1997. Oligodendrocyte precursor differentiation is perturbed in the absence of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1. *Genes Dev* 11: 2335-46
- Chatterjee S, Smith ER, Hanada K, Stevens VL, Mayor S.** 2001. GPI anchoring leads to sphingolipid-dependent retention of endocytosed proteins in the recycling endosomal compartment. *Embo J* 20: 1583-92
- Chen S, Bing R, Rosenblum N, Hillman DE.** 1996. Immunohistochemical localization of Lyn (p56) protein in the adult rat brain. *Neuroscience* 71: 89-100
- Cheng PC, Brown BK, Song W, Pierce SK.** 2001. Translocation of the B cell antigen receptor into lipid rafts reveals a novel step in signaling. *J Immunol* 166: 3693-701
- Chittajallu R, Aguirre A, Gallo V.** 2004. NG2-positive cells in the mouse white and grey matter display distinct physiological properties. *J Physiol* 561: 109-22
- Collinson JM, Marshall D, Gillespie CS, Brophy PJ.** 1998. Transient expression of neurofascin by oligodendrocytes at the onset of myelinogenesis: implications for mechanisms of axon-glial interaction. *Glia* 23: 11-23
- Colognato H, French-Constant C.** 2004. Mechanisms of glial development. *Curr Opin Neurobiol* 14: 37-44

- Colognato H, Ramachandrapappa S, Olsen IM, ffrench-Constant C.** 2004. Integrins direct Src family kinases to regulate distinct phases of oligodendrocyte development. *J Cell Biol* 167: 365-75
- Cristofanilli M, Akopian A.** 2006. Calcium channel and glutamate receptor activities regulate actin organization in salamander retinal neurons. *J Physiol* 575: 543-54
- Crowley MT, Costello PS, Fitzer-Attas CJ, Turner M, Meng F, et al.** 1997. A critical role for Syk in signal transduction and phagocytosis mediated by Fcgamma receptors on macrophages. *J Exp Med* 186: 1027-39
- Cui QL, Zheng WH, Quirion R, Almazan G.** 2005. Inhibition of Src-like kinases reveals Akt-dependent and -independent pathways in insulin-like growth factor I-mediated oligodendrocyte progenitor survival. *J Biol Chem* 280: 8918-28
- DeBruin LS, Haines JD, Wellhauser LA, Radeva G, Schonmann V, et al.** 2005. Developmental partitioning of myelin basic protein into membrane microdomains. *J Neurosci Res* 80: 211-25
- Decker L, ffrench-Constant C.** 2004. Lipid rafts and integrin activation regulate oligodendrocyte survival. *J Neurosci* 24: 3816-25
- Demerens C, Stankoff B, Logak M, Anglade P, Allinquant B, et al.** 1996. Induction of myelination in the central nervous system by electrical activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 9887-92
- Ding Q, Stewart J, Jr., Olman MA, Klobe MR, Gladson CL.** 2003. The pattern of enhancement of Src kinase activity on platelet-derived growth factor stimulation of glioblastoma cells is affected by the integrin engaged. *J Biol Chem* 278: 39882-91
- Dombrosky-Ferlan P, Grishin A, Botelho RJ, Sampson M, Wang L, et al.** 2003. Felic (CIP4b), a novel binding partner with the Src kinase Lyn and Cdc42, localizes to the phagocytic cup. *Blood* 101: 2804-9
- Du C, Sriram S.** 2002. Increased severity of experimental allergic encephalomyelitis in lyn-/- mice in the absence of elevated proinflammatory cytokine response in the central nervous system. *J Immunol* 168: 3105-12
- Du Y, Lercher LD, Zhou R, Dreyfus CF.** 2006. Mitogen-activated protein kinase pathway mediates effects of brain-derived neurotrophic factor on differentiation of basal forebrain oligodendrocytes. *J Neurosci Res* 84: 1692-702
- Dubois-Dalcq M, Behar T, Hudson L, Lazzarini RA.** 1986. Emergence of three myelin proteins in oligodendrocytes cultured without neurons. *J Cell Biol* 102: 384-92
- Durand B, Gao FB, Raff M.** 1997. Accumulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27/Kip1 and the timing of oligodendrocyte differentiation. *Embo J* 16: 306-17
- Dyer CA.** 2002. The structure and function of myelin: from inert membrane to perfusion pump. *Neurochem Res* 27: 1279-92

- Eiseman E, Bolen JB.** 1992. Engagement of the high-affinity IgE receptor activates src protein-related tyrosine kinases. *Nature* 355: 78-80
- Eisenbarth GS, Walsh FS, Nirenberg M.** 1979. Monoclonal antibody to a plasma membrane antigen of neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76: 4913-7
- Enyedy EJ, Mitchell JP, Nambiar MP, Tsokos GC.** 2001. Defective FcγRIIb1 signaling contributes to enhanced calcium response in B cells from patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol* 101: 130-5
- Fang X, Burg MA, Barritt D, Dahlin-Huppe K, Nishiyama A, Stallcup WB.** 1999. Cytoskeletal reorganization induced by engagement of the NG2 proteoglycan leads to cell spreading and migration. *Mol Biol Cell* 10: 3373-87
- Fellin T, Gomez-Gonzalo M, Gobbo S, Carmignoto G, Haydon PG.** 2006. Astrocytic glutamate is not necessary for the generation of epileptiform neuronal activity in hippocampal slices. *J Neurosci* 26: 9312-22
- French-Constant C, Colognato H.** 2004. Integrins: versatile integrators of extracellular signals. *Trends Cell Biol* 14: 678-86
- Fields RD.** 2005. Myelination: an overlooked mechanism of synaptic plasticity? *Neuroscientist* 11: 528-31
- Fields RD, Stevens-Graham B.** 2002. New insights into neuron-glia communication. *Science* 298: 556-62
- Gallo V, Ghiani CA.** 2000. Glutamate receptors in glia: new cells, new inputs and new functions. *Trends Pharmacol Sci* 21: 252-8
- Gallo V, Zhou JM, McBain CJ, Wright P, Knutson PL, Armstrong RC.** 1996. Oligodendrocyte progenitor cell proliferation and lineage progression are regulated by glutamate receptor-mediated K⁺ channel block. *J Neurosci* 16: 2659-70
- Gao FB, Durand B, Raff M.** 1997. Oligodendrocyte precursor cells count time but not cell divisions before differentiation. *Curr Biol* 7: 152-5
- Gauld SB, Cambier JC.** 2004. Src-family kinases in B-cell development and signaling. *Oncogene* 23: 8001-6
- Gensert JM, Goldman JE.** 1997. Endogenous progenitors remyelinate demyelinated axons in the adult CNS. *Neuron* 19: 197-203
- Ghiani C, Gallo V.** 2001. Inhibition of cyclin E-cyclin-dependent kinase 2 complex formation and activity is associated with cell cycle arrest and withdrawal in oligodendrocyte progenitor cells. *J Neurosci* 21: 1274-82
- Ghiani CA, Eisen AM, Yuan X, DePinho RA, McBain CJ, Gallo V.** 1999a. Neurotransmitter receptor activation triggers p27(Kip1) and p21(CIP1) accumulation and G1 cell cycle arrest in oligodendrocyte progenitors. *Development* 126: 1077-90

- Ghiani CA, Yuan X, Eisen AM, Knutson PL, DePinho RA, et al.** 1999b. Voltage-activated K⁺ channels and membrane depolarization regulate accumulation of the cyclin-dependent kinase inhibitors p27(Kip1) and p21(CIP1) in glial progenitor cells. *J Neurosci* 19: 5380-92
- Gotz M, Sommer L.** 2005. Cortical development: the art of generating cell diversity. *Development* 132: 3327-32
- Gouaux E.** 2004. Structure and function of AMPA receptors. *J Physiol* 554: 249-53
- Grimmler M, Wang Y, Mund T, Cilensek Z, Keidel EM, et al.** 2007. Cdk-inhibitory activity and stability of p27Kip1 are directly regulated by oncogenic tyrosine kinases. *Cell* 128: 269-80
- Gudz TI, Komuro H, Macklin WB.** 2006. Glutamate stimulates oligodendrocyte progenitor migration mediated via an α 5 integrin/myelin proteolipid protein complex. *J Neurosci* 26: 2458-66
- Gupta N, DeFranco AL.** 2003. Visualizing lipid raft dynamics and early signaling events during antigen receptor-mediated B-lymphocyte activation. *Mol Biol Cell* 14: 432-44
- Hartline DK, Colman DR.** 2007. Rapid conduction and the evolution of giant axons and myelinated fibers. *Curr Biol* 17: R29-35
- Hastings M, Maywood ES.** 2000. Circadian clocks in the mammalian brain. *Bioessays* 22: 23-31
- Hayashi T, Umemori H, Mishina M, Yamamoto T.** 1999. The AMPA receptor interacts with and signals through the protein tyrosine kinase Lyn. *Nature* 397: 72-6
- Helmke S, Pfenninger KH.** 1995. Growth cone enrichment and cytoskeletal association of non-receptor tyrosine kinases. *Cell Motil Cytoskeleton* 30: 194-207
- Hering H, Lin CC, Sheng M.** 2003. Lipid rafts in the maintenance of synapses, dendritic spines, and surface AMPA receptor stability. *J Neurosci* 23: 3262-71
- Hernandez-Hansen V, Mackay GA, Lowell CA, Wilson BS, Oliver JM.** 2004. The Src kinase Lyn is a negative regulator of mast cell proliferation. *J Leukoc Biol* 75: 143-51
- Hibbs ML, Dunn AR.** 1997. Lyn, a src-like tyrosine kinase. *Int J Biochem Cell Biol* 29: 397-400
- Hibbs ML, Stanley E, Maglitta R, Dunn AR.** 1995. Identification of a duplication of the mouse Lyn gene. *Gene* 156: 175-81
- Hill BT, Whelan RD, Hemmings VJ, Franks LM.** 1977. A method of synchronization of normal and malignant human cells in culture. *Cell Biol Int Rep* 1: 379-84
- Holowka D, Sheets ED, Baird B.** 2000. Interactions between Fc(ϵ)RI and lipid raft components are regulated by the actin cytoskeleton. *J Cell Sci* 113 (Pt 6): 1009-19

- Honda Z, Suzuki T, Kono H, Okada M, Yamamoto T, et al.** 2000. Sequential requirements of the N-terminal palmitoylation site and SH2 domain of Src family kinases in the initiation and progression of FcepsilonRI signaling. *Mol Cell Biol* 20: 1759-71
- Hu QD, Cui XY, Ng YK, Xiao ZC.** 2004. Axoglial interaction via the notch receptor in oligodendrocyte differentiation. *Ann Acad Med Singapore* 33: 581-8
- Ichihara-Tanaka K, Oohira A, Rumsby M, Muramatsu T.** 2006. Neuroglycan C is a novel midkine receptor involved in process elongation of oligodendroglial precursor-like cells. *J Biol Chem* 281: 30857-64
- Ishibashi T, Dakin KA, Stevens B, Lee PR, Kozlov SV, et al.** 2006. Astrocytes promote myelination in response to electrical impulses. *Neuron* 49: 823-32
- Jacobson G, Karsnas P.** 1990. Important parameters in semi-dry electrophoretic transfer. *Electrophoresis* 11: 46-52
- Jessen KR, Mirsky R.** 2002. Signals that determine Schwann cell identity. *J Anat* 200: 367-76
- Jiang S, Avraham HK, Park SY, Kim TA, Bu X, et al.** 2005. Process elongation of oligodendrocytes is promoted by the Kelch-related actin-binding protein Mayven. *J Neurochem* 92: 1191-203
- Jiang X, Zhu D, Okagaki P, Lipsky R, Wu X, et al.** 2003. N-methyl-D-aspartate and TrkB receptor activation in cerebellar granule cells: an in vitro model of preconditioning to stimulate intrinsic survival pathways in neurons. *Ann N Y Acad Sci* 993: 134-45; discussion 59-60
- Jung M, Kramer E, Grzenkowski M, Tang K, Blakemore W, 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
- Kalia LV, Salter MW.** 2003. Interactions between Src family protein tyrosine kinases and PSD-95. *Neuropharmacology* 45: 720-8
- Kalsbeek A, Palm IF, La Fleur SE, Scheer FA, Perreau-Lenz S, et al.** 2006. SCN outputs and the hypothalamic balance of life. *J Biol Rhythms* 21: 458-69
- Karadottir R, Cavalier P, Bergersen LH, Attwell D.** 2005. NMDA receptors are expressed in oligodendrocytes and activated in ischaemia. *Nature* 438: 1162-6
- Karram K, Chatterjee N, Trotter J.** 2005. NG2-expressing cells in the nervous system: role of the proteoglycan in migration and glial-neuron interaction. *J Anat* 207: 735-44
- Katsura H, Obata K, Mizushima T, Sakurai J, Kobayashi K, et al.** 2006. Activation of Src-family kinases in spinal microglia contributes to mechanical hypersensitivity after nerve injury. *J Neurosci* 26: 8680-90

- Kavakli IH, Sancar A.** 2002. Circadian photoreception in humans and mice. *Mol Interv* 2: 484-92
- Kew JN, Kemp JA.** 2005. Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. *Psychopharmacology (Berl)* 179: 4-29
- Khaleeli Z, Cercignani M, Audoin B, Ciccarelli O, Miller DH, Thompson AJ.** 2007. Localized grey matter damage in early primary progressive multiple sclerosis contributes to disability. *Neuroimage*
- Kim HJ, DiBernardo AB, Sloane JA, Rasband MN, Solomon D, et al.** 2006. WAVE1 is required for oligodendrocyte morphogenesis and normal CNS myelination. *J Neurosci* 26: 5849-59
- Klein C, Kramer EM, Cardine AM, Schraven B, Brandt R, Trotter J.** 2002. Process outgrowth of oligodendrocytes is promoted by interaction of fyn kinase with the cytoskeletal protein tau. *J Neurosci* 22: 698-707
- Koegl M, Zlatkine P, Ley SC, Courtneidge SA, Magee AI.** 1994. Palmitoylation of multiple Src-family kinases at a homologous N-terminal motif. *Biochem J* 303 (Pt 3): 749-53
- Kovarova M, Tolar P, Arudchandran R, Draberova L, Rivera J, Draber P.** 2001. Structure-function analysis of Lyn kinase association with lipid rafts and initiation of early signaling events after Fcepsilon receptor I aggregation. *Mol Cell Biol* 21: 8318-28
- Kramer-Albers EM, Gehrig-Burger K, Thiele C, Trotter J, Nave KA.** 2006. Perturbed interactions of mutant proteolipid protein/DM20 with cholesterol and lipid rafts in oligodendroglia: implications for dysmyelination in spastic paraplegia. *J Neurosci* 26: 11743-52
- Kramer EM, Klein C, Koch T, Boytinck M, Trotter J.** 1999. Compartmentation of Fyn kinase with glycosylphosphatidylinositol-anchored molecules in oligodendrocytes facilitates kinase activation during myelination. *J Biol Chem* 274: 29042-9
- Kramer EM, Koch T, Niehaus A, Trotter J.** 1997. Oligodendrocytes direct glycosyl phosphatidylinositol-anchored proteins to the myelin sheath in glycosphingolipid-rich complexes. *J Biol Chem* 272: 8937-45
- Kramer EM, Schardt A, Nave KA.** 2001. Membrane traffic in myelinating oligodendrocytes. *Microsc Res Tech* 52: 656-71
- Kuhlmann-Krieg S, Sommer I, Schachner M.** 1988. Ultrastructural features of cultured oligodendrocytes expressing stage-specific cell-surface antigens. *Brain Res* 467: 269-80
- Kukley M, Capetillo-Zarate E, Dietrich D.** 2007. Vesicular glutamate release from axons in white matter. *Nat Neurosci* 10: 311-20

- Kwiatkowska K, Frey J, Sobota A.** 2003. Phosphorylation of FcγRIIA is required for the receptor-induced actin rearrangement and capping: the role of membrane rafts. *J Cell Sci* 116: 537-50
- Laemmli UK.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-5
- Laurino L, Wang XX, de la Houssaye BA, Sosa L, Dupraz S, et al.** 2005. PI3K activation by IGF-1 is essential for the regulation of membrane expansion at the nerve growth cone. *J Cell Sci* 118: 3653-62
- Le Bras B, Chatzopoulou E, Heydon K, Martinez S, Ikenaka K, et al.** 2005. Oligodendrocyte development in the embryonic brain: the contribution of the plp lineage. *Int J Dev Biol* 49: 209-20
- Lee AG.** 2001. Myelin: Delivery by raft. *Curr Biol* 11: R60-2
- Lin SC, Huck JH, Roberts JD, Macklin WB, Somogyi P, Bergles DE.** 2005. Climbing fiber innervation of NG2-expressing glia in the mammalian cerebellum. *Neuron* 46: 773-85
- Lindner J, Rathjen FG, Schachner M.** 1983. L1 mono- and polyclonal antibodies modify cell migration in early postnatal mouse cerebellum. *Nature* 305: 427-30
- Liu A, Muggironi M, Marin-Husstege M, Casaccia-Bonnel P.** 2003. Oligodendrocyte process outgrowth in vitro is modulated by epigenetic regulation of cytoskeletal severing proteins. *Glia* 44: 264-74
- Makagiansar IT, Williams S, Mustelin T, Stallcup WB.** 2007. Differential phosphorylation of NG2 proteoglycan by ERK and PKC{α} helps balance cell proliferation and migration. *J Cell Biol* 178: 155-65
- Mallon BS, Shick HE, Kidd GJ, Macklin WB.** 2002. Proteolipid promoter activity distinguishes two populations of NG2-positive cells throughout neonatal cortical development. *J Neurosci* 22: 876-85
- Marin-Husstege M, Muggironi M, Liu A, Casaccia-Bonnel P.** 2002. Histone deacetylase activity is necessary for oligodendrocyte lineage progression. *J Neurosci* 22: 10333-45
- Martins RA, Linden R, Dyer MA.** 2006. Glutamate regulates retinal progenitors cells proliferation during development. *Eur J Neurosci* 24: 969-80
- Matthieu JM, Reier PJ, Sawchak JA.** 1975. Proteins of rat brain myelin in neonatal hypothyroidism. *Brain Res* 84: 443-51
- Matute C, Domercq M, Sanchez-Gomez MV.** 2006. Glutamate-mediated glial injury: mechanisms and clinical importance. *Glia* 53: 212-24
- Mayer BJ, Baltimore D.** 1993. Signalling through SH2 and SH3 domains. *Trends Cell Biol* 3: 8-13
- Mayer ML.** 2005. Glutamate receptor ion channels. *Curr Opin Neurobiol* 15: 282-8
- Mayer ML.** 2006. Glutamate receptors at atomic resolution. *Nature* 440: 456-62

- Mayer ML, Armstrong N.** 2004. Structure and function of glutamate receptor ion channels. *Annu Rev Physiol* 66: 161-81
- McDonald JW, Belegu V.** 2006. Demyelination and remyelination after spinal cord injury. *J Neurotrauma* 23: 345-59
- Menon K, Rasband MN, Taylor CM, Brophy P, Bansal R, Pfeiffer SE.** 2003. The myelin-axolemmal complex: biochemical dissection and the role of galactosphingolipids. *J Neurochem* 87: 995-1009
- Michaelis EK.** 1998. Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging. *Prog Neurobiol* 54: 369-415
- Micu I, Jiang Q, Coderre E, Ridsdale A, Zhang L, et al.** 2006. NMDA receptors mediate calcium accumulation in myelin during chemical ischaemia. *Nature* 439: 988-92
- Miron VE, Rajasekharan S, Jarjour AA, Zamvil SS, Kennedy TE, Antel JP.** 2007. Simvastatin regulates oligodendroglial process dynamics and survival. *Glia* 55: 130-43
- Morest DK, Silver J.** 2003. Precursors of neurons, neuroglia, and ependymal cells in the CNS: what are they? Where are they from? How do they get where they are going? *Glia* 43: 6-18
- Murtie JC, Zhou YX, Le TQ, Armstrong RC.** 2005. In vivo analysis of oligodendrocyte lineage development in postnatal FGF2 null mice. *Glia* 49: 542-54
- Nguyen L, Borgs L, Vandenbosch R, Mangin JM, Beukelaers P, et al.** 2006. The Yin and Yang of cell cycle progression and differentiation in the oligodendroglial lineage. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 12: 85-96
- Niehaus A, Stegmüller J, Diers-Fenger M, Trotter J.** 1999. Cell-surface glycoprotein of oligodendrocyte progenitors involved in migration. *J Neurosci* 19: 4948-61
- Nishiyama A, Yang Z, Butt A.** 2005. Astrocytes and NG2-glia: what's in a name? *J Anat* 207: 687-93
- Niv MY, Rubin H, Cohen J, Tsirolnikov L, Licht T, et al.** 2004. Sequence-based design of kinase inhibitors applicable for therapeutics and target identification. *J Biol Chem* 279: 1242-55
- Norton WT, Poduslo SE.** 1973. Myelination in rat brain: method of myelin isolation. *J Neurochem* 21: 749-57
- Oh LY, Larsen PH, Krekoski CA, Edwards DR, Donovan F, et al.** 1999. Matrix metalloproteinase-9/gelatinase B is required for process outgrowth by oligodendrocytes. *J Neurosci* 19: 8464-75
- Oh LY, Yong VW.** 1996. Astrocytes promote process outgrowth by adult human oligodendrocytes in vitro through interaction between bFGF and astrocyte extracellular matrix. *Glia* 17: 237-53

- Ozkirimli E, Post CB.** 2006. Src kinase activation: A switched electrostatic network. *Protein Sci* 15: 1051-62
- Palmer CL, Cotton L, Henley JM.** 2005. The molecular pharmacology and cell biology of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptors. *Pharmacol Rev* 57: 253-77
- Parsons SJ, Parsons JT.** 2004. Src family kinases, key regulators of signal transduction. *Oncogene* 23: 7906-9
- Patneau DK, Wright PW, Winters C, Mayer ML, Gallo V.** 1994. Glial cells of the oligodendrocyte lineage express both kainate- and AMPA-preferring subtypes of glutamate receptor. *Neuron* 12: 357-71
- Pazdrak K, Schreiber D, Forsythe P, Justement L, Alam R.** 1995. The intracellular signal transduction mechanism of interleukin 5 in eosinophils: the involvement of lyn tyrosine kinase and the Ras-Raf-1-MEK-microtubule-associated protein kinase pathway. *J Exp Med* 181: 1827-34
- Pleiman CM, Clark MR, Gauen LK, Winitz S, Coggeshall KM, et al.** 1993. Mapping of sites on the Src family protein tyrosine kinases p55blk, p59fyn, and p56lyn which interact with the effector molecules phospholipase C-gamma 2, microtubule-associated protein kinase, GTPase-activating protein, and phosphatidylinositol 3-kinase. *Mol Cell Biol* 13: 5877-87
- Polito A, Reynolds R.** 2005. NG2-expressing cells as oligodendrocyte progenitors in the normal and demyelinated adult central nervous system. *J Anat* 207: 707-16
- Pringle NP, Mudhar HS, Collarini EJ, Richardson WD.** 1992. PDGF receptors in the rat CNS: during late neurogenesis, PDGF alpha-receptor expression appears to be restricted to glial cells of the oligodendrocyte lineage. *Development* 115: 535-51
- Rabinowich H, Manciulea M, Metes D, Sulica A, Herberman RB, et al.** 1996. Physical and functional association of Fc mu receptor on human natural killer cells with the zeta- and Fc epsilon RI gamma-chains and with src family protein tyrosine kinases. *J Immunol* 157: 1485-91
- Raff MC, Durand B, Gao FB.** 1998. Cell number control and timing in animal development: the oligodendrocyte cell lineage. *Int J Dev Biol* 42: 263-7
- Raff MC, Miller RH, Noble M.** 1983. A glial progenitor cell that develops in vitro into an astrocyte or an oligodendrocyte depending on culture medium. *Nature* 303: 390-6
- Rajendran L, Simons K.** 2005. Lipid rafts and membrane dynamics. *J Cell Sci* 118: 1099-102
- Reynolds R, Hardy R.** 1997. Oligodendroglial progenitors labeled with the O4 antibody persist in the adult rat cerebral cortex in vivo. *J Neurosci Res* 47: 455-70

- Reynolds R, Wilkin GP.** 1988. Development of macroglial cells in rat cerebellum. II. An in situ immunohistochemical study of oligodendroglial lineage from precursor to mature myelinating cell. *Development* 102: 409-25
- Richter-Landsberg C.** 2000. The oligodendroglia cytoskeleton in health and disease. *J Neurosci Res* 59: 11-8
- Rickles RJ, Botfield MC, Zhou XM, Henry PA, Brugge JS, Zoller MJ.** 1995. Phage display selection of ligand residues important for Src homology 3 domain binding specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 10909-13
- Robbins SM, Quintrell NA, Bishop JM.** 1995. Myristoylation and differential palmitoylation of the HCK protein-tyrosine kinases govern their attachment to membranes and association with caveolae. *Mol Cell Biol* 15: 3507-15
- Roskoski R, Jr.** 2004. Src protein-tyrosine kinase structure and regulation. *Biochem Biophys Res Commun* 324: 1155-64
- Roussel MR.** 2000. An autonomous cell-cycle oscillator involved in the coordination of G1 events. *Bioessays* 22: 3-5
- Rudd CE, Trevillyan JM, Dasgupta JD, Wong LL, Schlossman SF.** 1988. The CD4 receptor is complexed in detergent lysates to a protein-tyrosine kinase (pp58) from human T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 5190-4
- Schnitzer J, Schachner M.** 1981. Developmental expression of cell type-specific markers in mouse cerebellar cells in vitro. *J Neuroimmunol* 1: 471-87
- Schorl C, Sedivy JM.** 2007. Analysis of cell cycle phases and progression in cultured mammalian cells. *Methods* 41: 143-50
- Scolding NJ, Frith S, Linington C, Morgan BP, Campbell AK, Compston DA.** 1989. Myelin-oligodendrocyte glycoprotein (MOG) is a surface marker of oligodendrocyte maturation. *J Neuroimmunol* 22: 169-76
- Sherman DL, Brophy PJ.** 2005. Mechanisms of axon ensheathment and myelin growth. *Nat Rev Neurosci* 6: 683-90
- Shi J, Marinovich A, Barres BA.** 1998. Purification and characterization of adult oligodendrocyte precursor cells from the rat optic nerve. *J Neurosci* 18: 4627-36
- Simons K, Ehehalt R.** 2002. Cholesterol, lipid rafts, and disease. *J Clin Invest* 110: 597-603
- Simons K, Ikonen E.** 1997. Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387: 569-72
- Simons K, Toomre D.** 2000. Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1: 31-9
- Simons M, Kramer EM, Thiele C, Stoffel W, Trotter J.** 2000. Assembly of myelin by association of proteolipid protein with cholesterol- and galactosylceramide-rich membrane domains. *J Cell Biol* 151: 143-54
- Simpson PB, Armstrong RC.** 1999. Intracellular signals and cytoskeletal elements involved in oligodendrocyte progenitor migration. *Glia* 26: 22-35

- Slemmer JE, De Zeeuw CI, Weber JT.** 2005. Don't get too excited: mechanisms of glutamate-mediated Purkinje cell death. *Prog Brain Res* 148: 367-90
- Smit L, van der Horst G, Borst J.** 1996. Sos, Vav, and C3G participate in B cell receptor-induced signaling pathways and differentially associate with Shc-Grb2, Crk, and Crk-L adaptors. *J Biol Chem* 271: 8564-9
- Sommer I, Schachner M.** 1981. Monoclonal antibodies (O1 to O4) to oligodendrocyte cell surfaces: an immunocytological study in the central nervous system. *Dev Biol* 83: 311-27
- Songyang Z, Carraway KL, 3rd, Eck MJ, Harrison SC, Feldman RA, et al.** 1995. Catalytic specificity of protein-tyrosine kinases is critical for selective signalling. *Nature* 373: 536-9
- Spaargaren M, Beuling EA, Rurup ML, Meijer HP, Klok MD, et al.** 2003. The B cell antigen receptor controls integrin activity through Btk and PLCgamma2. *J Exp Med* 198: 1539-50
- Sperber BR, Boyle-Walsh EA, Engleka MJ, Gadue P, Peterson AC, et al.** 2001. A unique role for Fyn in CNS myelination. *J Neurosci* 21: 2039-47
- Stegmuller J, Werner H, Nave KA, Trotter J.** 2003. The proteoglycan NG2 is complexed with alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptors by the PDZ glutamate receptor interaction protein (GRIP) in glial progenitor cells. Implications for glial-neuronal signaling. *J Biol Chem* 278: 3590-8
- Steinhauser C, Gallo V.** 1996. News on glutamate receptors in glial cells. *Trends Neurosci* 19: 339-45
- Stensbol TB, Madsen U, Krosgaard-Larsen P.** 2002. The AMPA receptor binding site: focus on agonists and competitive antagonists. *Curr Pharm Des* 8: 857-72
- Stettner MR, Wang W, Nabors LB, Bharara S, Flynn DC, et al.** 2005. Lyn kinase activity is the predominant cellular SRC kinase activity in glioblastoma tumor cells. *Cancer Res* 65: 5535-43
- Stevens B, Porta S, Haak LL, Gallo V, Fields RD.** 2002. Adenosine: a neuron-glial transmitter promoting myelination in the CNS in response to action potentials. *Neuron* 36: 855-68
- Superti-Furga G, Courtneidge SA.** 1995. Structure-function relationships in Src family and related protein tyrosine kinases. *Bioessays* 17: 321-30
- Taguchi K, Yoshinaka K, Yoshino K, Yonezawa K, Maekawa S.** 2005. Biochemical and morphologic evidence of the interaction of oligodendrocyte membrane rafts with actin filaments. *J Neurosci Res* 81: 218-25

- Takahashi K, Mouri T, Yamamoto T, Itoi K, Murakami O, et al.** 1989. Corticotropin-releasing hormone in the human hypothalamus. Free-floating immunostaining method. *Endocrinol Jpn* 36: 275-80
- Tang DG, Tokumoto YM, Raff MC.** 2000. Long-term culture of purified postnatal oligodendrocyte precursor cells. Evidence for an intrinsic maturation program that plays out over months. *J Cell Biol* 148: 971-84
- Tatosyan AG, Mizenina OA.** 2000. Kinases of the Src family: structure and functions. *Biochemistry (Mosc)* 65: 49-58
- Thoenen H.** 1995. Neurotrophins and neuronal plasticity. *Science* 270: 593-8
- Thomas SM, Brugge JS.** 1997. Cellular functions regulated by Src family kinases. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13: 513-609
- Tkaczyk C, Gilfillan AM.** 2001. Fc(epsilon)RI-dependent signaling pathways in human mast cells. *Clin Immunol* 99: 198-210
- Tokumoto YM, Tang DG, Raff MC.** 2001. Two molecularly distinct intracellular pathways to oligodendrocyte differentiation: role of a p53 family protein. *Embo J* 20: 5261-8
- Tolar P, Draberova L, Tolarova H, Draber P.** 2004. Positive and negative regulation of Fc epsilon receptor I-mediated signaling events by Lyn kinase C-terminal tyrosine phosphorylation. *Eur J Immunol* 34: 1136-45
- Trotter J.** 2005. NG2-positive cells in CNS function and the pathological role of antibodies against NG2 in demyelinating diseases. *J Neurol Sci* 233: 37-42
- Trotter J, Schachner M.** 1989. Cells positive for the O4 surface antigen isolated by cell sorting are able to differentiate into astrocytes or oligodendrocytes. *Brain Res Dev Brain Res* 46: 115-22
- Umemori H, Ogura H, Tozawa N, Mikoshiba K, Nishizumi H, Yamamoto T.** 2003. Impairment of N-methyl-D-aspartate receptor-controlled motor activity in LYN-deficient mice. *Neuroscience* 118: 709-13
- Umemori H, Wanaka A, Kato H, Takeuchi M, Tohyama M, Yamamoto T.** 1992. Specific expressions of Fyn and Lyn, lymphocyte antigen receptor-associated tyrosine kinases, in the central nervous system. *Brain Res Mol Brain Res* 16: 303-10
- Wang QM, Studzinski GP, Chen F, Coffman FD, Harrison LE.** 2000. p53/56(lyn) antisense shifts the 1,25-dihydroxyvitamin D3-induced G1/S block in HL60 cells to S phase. *J Cell Physiol* 183: 238-46
- Wang S, Sdrulla AD, diSibio G, Bush G, Nofziger D, et al.** 1998. Notch receptor activation inhibits oligodendrocyte differentiation. *Neuron* 21: 63-75
- Weng Z, Thomas SM, Rickles RJ, Taylor JA, Brauer AW, et al.** 1994. Identification of Src, Fyn, and Lyn SH3-binding proteins: implications for a function of SH3 domains. *Mol Cell Biol* 14: 4509-21

- Wigley R, Hamilton N, Nishiyama A, Kirchhoff F, Butt AM.** 2007. Morphological and physiological interactions of NG2-glia with astrocytes and neurons. *J Anat* 210: 661-70
- Wilson R, Brophy PJ.** 1989. Role for the oligodendrocyte cytoskeleton in myelination. *J Neurosci Res* 22: 439-48
- Wolswijk G, Noble M.** 1989. Identification of an adult-specific glial progenitor cell. *Development* 105: 387-400
- Wu X, Zhu D, Jiang X, Okagaki P, Mearow K, et al.** 2004. AMPA protects cultured neurons against glutamate excitotoxicity through a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent activation in extracellular signal-regulated kinase to upregulate BDNF gene expression. *J Neurochem* 90: 807-18
- Xu W, Harrison SC, Eck MJ.** 1997. Three-dimensional structure of the tyrosine kinase c-Src. *Nature* 385: 595-602
- Xu Y, Harder KW, Huntington ND, Hibbs ML, Tarlinton DM.** 2005. Lyn tyrosine kinase: accentuating the positive and the negative. *Immunity* 22: 9-18
- Yamanashi Y, Fukushima S, Semba K, Sukegawa J, Miyajima N, et al.** 1987. The yes-related cellular gene lyn encodes a possible tyrosine kinase similar to p56lck. *Mol Cell Biol* 7: 237-43
- Yan H, Rivkees SA.** 2002. Hepatocyte growth factor stimulates the proliferation and migration of oligodendrocyte precursor cells. *J Neurosci Res* 69: 597-606
- Ye P, Li L, Richards RG, DiAugustine RP, D'Ercole AJ.** 2002. Myelination is altered in insulin-like growth factor-I null mutant mice. *J Neurosci* 22: 6041-51
- Yuan X, Eisen AM, McBain CJ, Gallo V.** 1998. A role for glutamate and its receptors in the regulation of oligodendrocyte development in cerebellar tissue slices. *Development* 125: 2901-14
- Ziskin JL, Nishiyama A, Rubio M, Fukaya M, Bergles DE.** 2007. Vesicular release of glutamate from unmyelinated axons in white matter. *Nat Neurosci* 10: 321-30

8 Abkürzungsverzeichnis

A	<u>A</u> mpere
Abb	<u>A</u> bbildung
AMPA-R	α - <u>a</u> mino-3-hydroxy-5- <u>m</u> ethyl-4-isoaxole- <u>p</u> ropion <u>a</u> te <u>R</u> ezeptor
ATP	<u>A</u> denosin <u>t</u> riphosphat
BCR	<u>B</u> - <u>c</u> ell <u>R</u> ezeptor
BDNF	Gehirn-abgeleiteter Neurotrophischer Faktor (<u>b</u> rain- <u>d</u> erived <u>n</u> eurotrophic <u>f</u> actor)
bFGF	Elementarer Fibroblasten Wachstumsfaktor (<u>b</u> asic <u>f</u> ibroblast <u>g</u> rowth <u>f</u> actor)
BME	<u>B</u> alanced <u>M</u> edium <u>E</u> agle
BMP	Knochenmatrix Protein (<u>B</u> one <u>m</u> orphogen <u>p</u> rotein)
BSA	Albumin von Kälberserum (<u>b</u> ovine <u>s</u> erum <u>a</u> lbumin)
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat (<u>c</u> yclic- <u>a</u> denosin- <u>m</u> onophosphate)
Caspr	<u>C</u> ontactin- <u>a</u> ssoziiertes <u>P</u> rotein
CD	<u>C</u> o-Receptor <u>D</u> omäne
Cdk	Zyclin-abhängige Kinase (<u>c</u> yclin- <u>d</u> ependent <u>k</u> inase)
CIP	Intestinale Phosphatase des Kalbs (<u>c</u> alve <u>i</u> ntestinal <u>p</u> hosphatase)
CIP4	<u>c</u> dk- <u>i</u> nteragierendes <u>P</u> rotein
CNF	Ziliarer Neurotrophischer Faktor (<u>c</u> iliary <u>n</u> eurotrophic <u>f</u> actor)
CNP	Zyklische Nukleotid-Phosphodiesterase (2',3'- <u>c</u> yclic- <u>n</u> ucleotide 3'- <u>p</u> hosphodiesterase)
Csk	<u>c</u> -Src- <u>T</u> yrosin <u>K</u> inase
Cx-32	<u>C</u> onnexin
Cy	<u>C</u> ytochrom
dH ₂ O	<u>D</u> eionisiertes Wasser
DMEM	<u>D</u> ulbecco's <u>m</u> odifiziertes <u>E</u> agle <u>M</u> edium
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<u>D</u> esoxyribo <u>n</u> ucleic <u>a</u> cid)
dNTP's	<u>D</u> esoxynukleotid <u>t</u> riphosphate
E	Embryonaler Tag

E.coli	<u>E</u> scherichia <u>c</u> oli
EAE	<u>E</u> xperimentelle <u>a</u> llergische <u>E</u> ncephalomyelitis
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (<u>e</u> thylene <u>d</u> iamine <u>t</u> etra <u>a</u> cetic <u>a</u> cid)
EGFP	Verstärktes grünes Fluoreszenz-Protein (<u>e</u> nhanced <u>g</u> reen <u>f</u> luorescent <u>p</u> rotein)
F	<u>F</u> arad
F1-6	<u>F</u> raktion <u>1</u> - <u>6</u>
FGF	Fibroblasten Wachstumsfaktor (<u>f</u> ibroblast <u>g</u> rowth <u>f</u> actor)
G	Relative Zentrifugalbeschleunigung
G1-Phase	Wachstumsphase 1 (<u>g</u> rowth <u>p</u> hase <u>1</u>)
GD3	Gangliosid-induziertes Differenzierungs-assoziiertes Protein (<u>g</u> anglioside-induced <u>d</u> ifferentiation-associated-protein)
GFAP	Saures fibrilläres Gliaprotein (<u>g</u> lial <u>f</u> ibrillary <u>a</u> cidic <u>p</u> rotein)
GFP	Grünes Fluoreszenz-Protein (<u>g</u> reen <u>f</u> luorescent <u>p</u> rotein)
GGF	Glialer Wachstumsfaktor (<u>g</u> lial <u>g</u> rowth <u>f</u> actor)
GluR	<u>G</u> lutamat- <u>R</u> ezeptor
GPI	<u>G</u> lycosyl- <u>p</u> hosphatidyl <u>i</u> nositol
Grip1	Glutamat Rezeptor interagierendes Protein (<u>g</u> lutamate <u>r</u> eceptor <u>i</u> nteracting <u>p</u> rotein)
h	Stunde (<u>h</u> our)
HBSS	Hanks' gepufferte Salzlösung (<u>H</u> ank's <u>b</u> uffered <u>s</u> alt <u>s</u> olution)
HGF	Hepatozyten Wachstumsfaktor (<u>h</u> epatocyte <u>g</u> rowth <u>f</u> actor)
HRP	Meerrettich Peroxidase (<u>h</u> orse <u>r</u> adish <u>p</u> eroxidase)
HS	Pferdeserum (<u>h</u> orse <u>s</u> erum)
IGF-1	Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor (<u>i</u> nsulin-like <u>g</u> rowth <u>f</u> actor)
IP	<u>I</u> mmunpräzipitation
kB	<u>k</u> ilo <u>B</u> asen
kD	<u>k</u> ilo <u>D</u> alton
LB-Medium	<u>L</u> uria- <u>B</u> ertani <u>M</u> edium
LIF	Leukämie inhibitorischer Faktor (<u>l</u> eukemia <u>i</u> nhibitory <u>f</u> actor)
MAG	<u>M</u> yelin- <u>a</u> ssoziiertes <u>G</u> lykoprotein
MAP	<u>M</u> ikrotubuli- <u>a</u> ssoziiertes <u>P</u> rotein
MAPK	<u>M</u> itogen- <u>a</u> ktivierte <u>P</u> rotein <u>K</u> inase

MBP	Elementares Myelin Protein (<i>myelin basic protein</i>)
min	<u>Minute</u>
MMLV	Moloney Maus Leukämie Virus (<i>moloney murine leukemia virus</i>)
MOG	<u>Myelin-Oligodendrozyten Glykoprotein</u>
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (<i>messenger Ribonucleic acid</i>)
NCAM	Neurales Zell-Adhensions Molekül (<i>neural cell adhesion molecule</i>)
NG2	<u>Neuron-Glia Antigen 2</u>
NGF	Nerven-Wachstumsfaktor (<i>nerve growth factor</i>)
NGS	Normales Ziegen Serum (<i>normal goat serum</i>)
NMDA-R	<u>N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor</u>
NMRI	<u>Naval Medical Research Institute</u>
NT-3	<u>Neurotrophin</u>
Olig	Oligodendrozyten Transkriptionsfaktor (<i>oligodendrocyte transcription factor</i>)
OPC	Oligodendrogliale Vorläuferzelle (<i>oligodendroglial precursor cell</i>)
OSP	<u>Oligodendrozyten-spezifisches Protein</u> , Claudin-11
P	Postnataler Tag
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung (<i>phosphate-buffered salt-solution</i>)
pCMV	<u>Plasmid cytomegalovirus</u>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase-chain-reaction</i>)
PDGF	Thrombozyten-abgeleiteter Wachstumsfaktor (<i>platelet derived growth factor</i>)
PFA	<u>Paraformaldehyd</u>
PI3K	<u>Phosphoinositid-3-Kinase</u>
PKC	<u>Protein Kinase C</u>
PLL	<u>Poly-L-Lysin</u>
PLP	<u>Proteolipid Protein</u>
pMN	Motorneuron-Vorläufer Domäne (<i>motorneuron-precursor domain</i>)
pOL	<u>Primäre Oligodendrozyten</u>
PSD	<u>Postsynaptische Dichte</u>
pSFV	<u>Plasmid semiliki forest virus</u>
PVDF	<u>Polyvinyliden Difluorid</u>

SDS	Natriumdodecylsulfat (<u>S</u> odium <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulfate)
SH	<u>S</u> rc- <u>H</u> omologie Domäne
Shh	<u>S</u> onic <u>h</u> edge <u>h</u> og
siRNA	Kleine interferierende RNA (<u>s</u> mall <u>i</u> nterfering <u>R</u> NA)
Src	Sarcoma Virus Onkogen Homolog (<u>s</u> ar <u>c</u> oma viral oncogene homolog)
Tab	<u>T</u> abelle
TBS	Tris gepufferte Salzlösung (<u>T</u> ris- <u>b</u> uffered <u>s</u> alt-solution)
TH	Schilddrüsenhormon (<u>t</u> hyroid <u>h</u> ormone)
TOAD-64	<u>t</u> urned <u>o</u> n <u>a</u> fter <u>d</u> ivision
TrkB-R	<u>T</u> yrosin <u>K</u> inase <u>B</u> - <u>R</u> ezeptor
Tx-100	TritonX-100
V	<u>V</u> olt
ZNS	<u>z</u> entrales <u>N</u> ervens <u>s</u> ystem

Chemische Elemente wurden gemäß dem Periodensystem nach Mendelejew und Meyer abgekürzt (Beispiel: Kalium: K⁺), Aminosäuren entsprechend der allgemein anerkannten Ein- oder Drei-Buchstaben-Kodierung (Beispiel: Tyrosin: Tyr oder Y), ein p zeigt phosphorylierte Aminosäuren an.

Längen- und Gewichtsmaß entspricht europäischen Maßeinheiten und wurde in allgemein üblichen Kürzeln angegeben (Beispiel: cm: Centimeter, g: Gramm), Konzentrationen wurden in Gewicht/Volumen oder in Mol-Einheiten (Beispiel: M: Mol) angegeben.