

**Die Interaktion zwischen OMI/HtrA2 und NG2
in oligodendroglialen Vorläuferzellen:
NG2 und Homöostase?**

Dissertation zur Erlangung des Grades:

Doktor der Naturwissenschaften

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz

von

Frank Maus

geboren am 10.12.1973 in Saarbrücken

Mainz, Oktober 2012

Inhalt

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	2
2.1	ZNS.....	2
2.2	Die oligodendroglialen Zellen	5
2.3	Das NG2-Proteoglykan.....	9
2.4	NG2-positive Glioma	11
2.5	Zelltod	12
2.6	Apoptose.....	13
2.7	Die Serinprotease OMI/HtrA2.....	19
2.7.1	OMI/HtrA2 Funktion im mitochondrialen Intermembranraum.....	21
2.7.2	OMI/HtrA2 Funktion in der Apoptose.....	22
2.8	Oxidativer Stress in oligodendroglialen Zellen	24
2.9	Fragestellung der Arbeit	26
3	Material und Methoden	27
3.1	Materialien	27
3.2	Technische Geräte	27
3.3	Chemikalien	28
3.4	Kits	29
3.5	Puffer, Nährmedien und Lösungen.....	30
3.6	Primäre Antikörper	31
3.7	Sekundäre Antikörper	32
3.8	Plasmide	33
3.8.1	OMI/HtrA2-FLAG Plasmid	33
3.8.2	NG2del Plasmid.....	33
3.9	Primer	34
3.10	Small-interfering-RNAs	35

3.11	Die NG2-EYFP-Knockout Maus	35
3.12	Zellkultur	35
3.12.1	Die Zelllinie Oli-neu.....	36
3.12.2	Die Zelllinie HEK 293T.....	36
3.12.3	Cerebellum Kulturen	37
3.12.4	Transiente Transfektion von Plasmiden	37
3.12.5	Transfektion von Small-Interfering-RNAs mit AMAXA-Nukleofektion	39
3.12.6	Behandlung von Kulturen mit H ₂ O ₂ und UCF-101	39
3.12.7	Färbung des mitochondrialen Membranpotentials	40
3.12.8	MTT Assay.....	41
3.13	Molekularbiologie.....	41
3.13.1	Transformation.....	41
3.13.2	Isolierung der Plasmid-DNA	41
3.13.3	Restriktionsverdau	42
3.13.4	Konzentrationsbestimmung der Plasmid-DNA	42
3.13.5	Yeast-Two-Hybrid Analyse	42
3.14	Proteinbiochemie	42
3.14.1	Zelllyse.....	42
3.14.2	Co-Immunpräzipitation.....	43
3.14.3	SDS-Page, Westernblot und Immundetektion.....	44
3.14.4	Coomassie- und Silberfärbung	46
3.14.5	Immunzytochemische Färbungen	46
3.14.6	Immunhistochemische Färbungen	46
3.14.7	Zell-ELISA (Co-IP-Zell-ELISA)	47
3.14.8	Aufreinigung von Proteinen über den HIS-Tag	49
3.14.9	Protease Assay.....	50
3.14.10	Mikroskopie.....	52
3.15	Datenanalyse.....	52
3.15.1	Quantifizierung.....	52

3.15.2	Statistik	52
3.15.3	Software.....	52
4	Ergebnisse.....	53
4.1	Ist die mitochondriale Serinprotease OMI/HtrA2 ein Interaktions-partner von NG2?	53
4.1.1	Die Y2H-Analyse identifiziert OMI/HtrA2 als möglichen Bindungspartner von NG2	53
4.1.2	Co-Immunpräzipitationen bestätigen die Resultate der Y2H-Analyse	55
4.2	Unter oxidativem Stress bindet OMI/HtrA2 an NG2 in lebenden Zellen	57
4.3	NG2 ist kein Substrat der Serinprotease OMI/HtrA2.....	61
4.4	Das NG2 Protein besitzt einen protektiven Effekt unter oxidativem Stress	62
4.4.1	siRNA-Knockdown von NG2 erhöht die Apoptoserate unter oxidativem Stress	62
4.4.2	Unter oxidativem Stress zeigen NG2-positive-HEK Zellen erhöhte Zellviabilität	66
4.5	NG2-Knockout OPC zeigen in gemischten Kulturen verstärkte Apoptose.....	68
4.6	Die verstärkte Apoptose in NG2-Knockout-Kulturen korreliert mit OMI/HtrA2.....	72
4.7	Die Interaktion mit NG2 reduziert die Proteaseaktivität von OMI/HtrA2.....	76
4.8	Astrogliose im Gehirn von NG2-EYFP-Knockout Maus	80
5	Diskussion	82
5.1	Oxidativer Stress in OPC.....	82
5.2	Interaktion zwischen OMI/HtrA2 und NG2	82
5.3	NG2 übt in OPC nach oxidativem Stress einen antiapoptotischen Effekt aus	84
5.4	Der antiapoptotische Effekt von NG2 korreliert mit OMI/HtrA2	86
5.5	Die Interaktion mit NG2 reguliert die Proteaseaktivität von OMI/HtrA2.....	88
5.6	Gliose in der NG2-Knockout Maus	90
5.7	Apoptose in OPC und Oligodendrozyten	91
6	Ausblick	93
7	Referenzen	94
8	Anhang	113
8.1	Sequenzen.....	113
8.2	Verzeichnisse	115
8.2.1	Abkürzungsverzeichnis.....	115

8.2.2	Abbildungsverzeichnis	118
8.2.3	Tabellenverzeichnis	119
8.3	Publikationen	120
8.4	Kongressbeiträge.....	120
8.5	Curriculum Vitae	122
8.6	Eidesstattliche Erklärung	123

1 Zusammenfassung

Myelinisierende Oligodendrozyten im ZNS entwickeln sich aus NG2-positiven OPC. NG2 ist ein Transmembranprotein der Zytoplasmamembran. Der intrazelluläre Teil besitzt ein PDZ-Bindemotiv am C-Terminus, das im Hefemodell (Y2H-Analyse) mit der PDZ-Domäne der mitochondrialen Serinprotease OMI/HtrA2 interagiert. OMI/HtrA2 ist unter normalen physiologischen Bedingungen in dem Intermembranraum der Mitochondrien lokalisiert. Unter oxidativem Stress bzw. während der Apoptose findet eine Translokation durch die permeabilisierte mitochondriale Membran in das Zytosol statt. Dort übt OMI/HtrA2 eine proapoptotische Funktion aus.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Interaktion von OMI/HtrA2 und NG2 in OPC unter physiologischen Bedingungen untersucht und die zelluläre Funktion geklärt werden. Die Ergebnisse der Y2H-Analyse konnten mit Co-Immunpräzipitationen verifiziert werden. Da die beiden Proteine unter normalen physiologischen Bedingungen räumlich getrennt sind, wurde in den OPC oxidativer Stress simuliert. Dadurch konnte die mitochondriale Membran permeabilisiert werden, was eine Voraussetzung für die Interaktion der beiden Proteine darstellt. Mit einem neu etablierten Zell-ELISA konnte gezeigt werden, dass unter oxidativen Stressbedingungen OMI/HtrA2 in das Zytosol translokalisiert wird und an NG2 bindet. Versuche mit OPC zeigten, dass NG2 eine antiapoptotische Funktion unter oxidativem Stress ausübt. Die Deletion des PDZ-Bindemotivs von NG2, über das OMI/HtrA2 gebunden wird, führt zu einer erhöhten Sensibilität gegenüber oxidativem Stress. Außerdem konnte mit einem spezifischen OMI/HtrA2-Inhibitor die erhöhte Anfälligkeit der NG2-defizienten Zellen annähernd ausgeglichen werden. Weiterhin wird die Proteaseaktivität von OMI/HtrA2 durch die Interaktion vermindert. Dadurch wird die proapoptotische Funktion von OMI/HtrA2 im Zytosol gehemmt. Zusammengefasst reduziert die Interaktion von OMI/HtrA2 und NG2 die Apoptoserate in OPC unter oxidativem Stress.

In der NG2-Knockout Maus konnte eine gesteigerte Gliose-Entwicklung mit zunehmendem Alter beobachtet werden, die möglicherweise mit dem Verlust der protektiven Funktion von NG2 in Verbindung steht.

2 Einleitung

2.1 ZNS

Das Nervensystem der Vertebraten ist ein komplexes System, das für die Aufnahme, Weiterleitung und Verarbeitung von Reizen verantwortlich ist. Auch die Innervierung von Muskeln, sowie die Koordination und Aufrechterhaltung der Organfunktionen erfolgt über das Nervensystem. Eine prinzipielle Unterscheidung erfolgt in der Einteilung zwischen dem peripheren Nervensystem (PNS) und dem zentralen Nervensystem (ZNS). Das PNS überträgt sensorische Informationen zum ZNS und umgekehrt werden Effektoren wie z. B. Motorneurone des PNS von dem ZNS innerviert. Das ZNS besteht aus dem Rückenmark und dem Gehirn. Auf zellulärer Ebene besteht das Nervensystem aus zwei Hauptzelltypen, den Neuronen und den Gliazellen. Die Gliazellen werden aufgrund ihrer funktionellen Ausrichtung in folgende Subpopulationen unterteilt: Astrozyten, Oligodendrozyten und Mikroglia.

Neurone sind auf der zellulären Basis die Grundeinheit der Signalübertragung im Nervensystem und darauf spezialisiert elektrische Impulse oder Aktionspotentiale weiterzuleiten. Ein Neuron besteht aus einem Zellkörper (Soma), den Dendriten und dem Axon. Je nach Synapsentyp empfängt ein Neuron Signale, die erregend (EPSP) oder inhibitorisch (IPSP) sein können, von anderen Neuronen über ein verzweigtes System an Dendriten, die das Signal zum Soma weiterleiten. Dort wird das Signal mit anderen Signalen verarbeitet bzw. „verrechnet“ und durch die elektrische Erregbarkeit der Nervenzelle kann am Axonhügel durch eine Depolarisation im Soma ein Aktionspotential generiert werden. Das Aktionspotential wird über das Axon zu der präsynaptischen Endigung weitergeleitet. Am Ende des Axons fusionieren Vesikel mit Neurotransmittern an der präsynaptischen Membran durch die Depolarisation und das Signal wird zur nächsten Nervenzelle transformiert. An der postsynaptischen Membran öffnen dann die Neurotransmitter über die Aktivierung von Rezeptoren Ionenkanäle. Dies führt zu einer Depolarisation in der nachfolgenden Nervenzelle.

Astrozyten regeln das chemische Milieu im ZNS. Sie umschließen die Blutkapillaren, sind ein Bestandteil der Blut-Hirn-Schranke und regulieren den Stoffaustausch des ZNS (Abbott 2002, Ricci, Volpi et al. 2009). Außerdem sind Astrozyten an vielen interzellulären Austauschvorgängen beteiligt. Sie segregieren Enzyme für metabolische Stoffwechselfvorgänge, die z. B. von Neuronen nicht exprimiert werden. So unterstützen Astrozyten die neuronale Stoffwechselphysiologie (Kirchhoff, Dringen et al. 2001, Gourine and Kasparov 2011). Auch in der Regulation der Ionenkonzentrationen im extrazellulären Raum spielen Astrozyten eine entscheidende Rolle. So wird über Kalzium-Kanäle (Kir) verhindert, dass im synaptischen Spalt, während der neuronalen Aktivität, Kalziumionen akkumulieren (Kofuji and Newman 2004). Weiterhin wird über Glutamatfreisetzung von Astrozyten durch TNF- α die neuronale Aktivität moduliert (Santello and Volterra 2012).

Eine wichtige Rolle spielen Astrozyten in der Eliminierung von oxidativem Stress. Im Nervensystem entstehen im Vergleich zu anderen Organen, hohe Konzentrationen an ROS (Reactive-Oxygen-Species), obwohl die Kapazität an Antioxidantien eher gering ist. Astrozyten unterstützen andere Zellen des ZNS in der Beseitigung von ROS (Dringen, Gutterer et al. 2000). Vor allem Vorstufen des Glutathion-Systems, die durch die Astrozyten synthetisiert und sezerniert werden, können andere Zellen des ZNS zur Eliminierung von oxidativem Stress nutzen (Dringen, Pfeiffer et al. 1999, Dringen, Gutterer et al. 2000).

Bei vielen ZNS-Pathologien, wie z. B. Schlaganfall, Traumata oder neurodegenerative Erkrankungen, werden Astrozyten reaktiv und bilden eine Gliose aus, charakterisiert u. a. durch Hypertrophie und gesteigerter Proliferation. In reaktiven Astrozyten verändern sich eine Vielzahl an biochemischen und zellulären Prozessen, wie z. B. die verstärkte Expression der Intermediärfilamente GFAP und Vimentin (Hernandez, Agapova et al. 2002, Sofroniew 2009, Sofroniew and Vinters 2010). Der Grad der Astrogliose kann bis zu sklerotischem Gewebe führen, wie in chronischen Läsionen der Multiplen Sklerose (MS). Die funktionellen Aspekte der Gliose sind bisher nur unzureichend geklärt, so ist z. B. ein Einfluss auf die inflammatorischen Prozesse möglich (Fitch and Silver 2008). Eine Astrogliose kann sekundäre Gewebeschädigungen durch Abgrenzung der Läsion verhindern und durch die Bereitstellung von verschiedenen Faktoren zur Regeneration beitragen. Allerdings

kann eine Gliose auch Regenerationsvorgänge blockieren (Karimi-Abdolrezaee and Billakanti 2012).

Oligodendrozyten sind die myelinisierenden Zellen des ZNS. Ein Oligodendrozyt kann mit seinen Fortsätzen bis zu 40 Axone myelinisieren (Baumann and Pham-Dinh 2001). Myelin ist eine lipidreiche Biomembran und die Abschnitte der Myelinscheide bilden eine elektrische Isolierung um das Axon, so dass die Erregung über die nicht myelinisierten Ranvier-Schnürringe saltatorisch weitergeleitet wird. Weiterhin unterstützen die Oligodendrozyten die Integrität der Axone und damit auch die Viabilität der Neurone (Nave and Trapp 2008, Nave 2010). Oligodendrozyten unterstützen den neuronalen bzw. den axonalen Energiemetabolismus durch den Transfer von Lactat durch den Monocarboxylat-Transporter-1 (Lee, Morrison et al. 2012). So kann eine dauerhafte Demyelinisierung auch zu neuronaler Degeneration führen. Auch das Auswachsen von Axonen wird durch Oligodendrozyten reguliert bzw. limitiert (Sandvig, Berry et al. 2004, Schwab 2004, Huang, Phillips et al. 2005).

Weitere Zellen des ZNS sind Mikroglia und Ependymzellen. Erstere sind mobile Zellen und stellen spezialisierte Makrophagen des ZNS dar, die in der Immunabwehr bzw. in der Beseitigung von Zellresten fungieren und Regenerationsprozesse fördern können (Barron 2003). Ependymzellen kleiden die inneren Flüssigkeitsräume des ZNS aus, wie den Zentralkanal und die Ventrikel. Sie regulieren auch die Zusammensetzung und den Fluss der Cerebrospinalflüssigkeit (CSF) (Del Bigio 1995).

Auch die Blut-Hirn-Schranke (BBB) ist ein wichtiger Bestandteil des ZNS. Sie stellt einen selektiven Filter dar, über den Moleküle ausgetauscht werden. Sie wird durch Endothelzellen, Astrozyten und Perizyten aufgebaut. Endothelzellen bilden die innere Wand der Blutgefäße. Perizyten sind an der Außenseite der Gefäßwände lokalisiert und umschließen sie mit ihren Fortsätzen. Sie sind am Aufbau und der Aufrechterhaltung der BBB sowie in der Angiogenese neuer Gefäße beteiligt. Auch der Blutfluss kann durch kontraktile Bewegungen der Perizyten reguliert werden (Dalkara, Gursoy-Ozdemir et al. 2011).

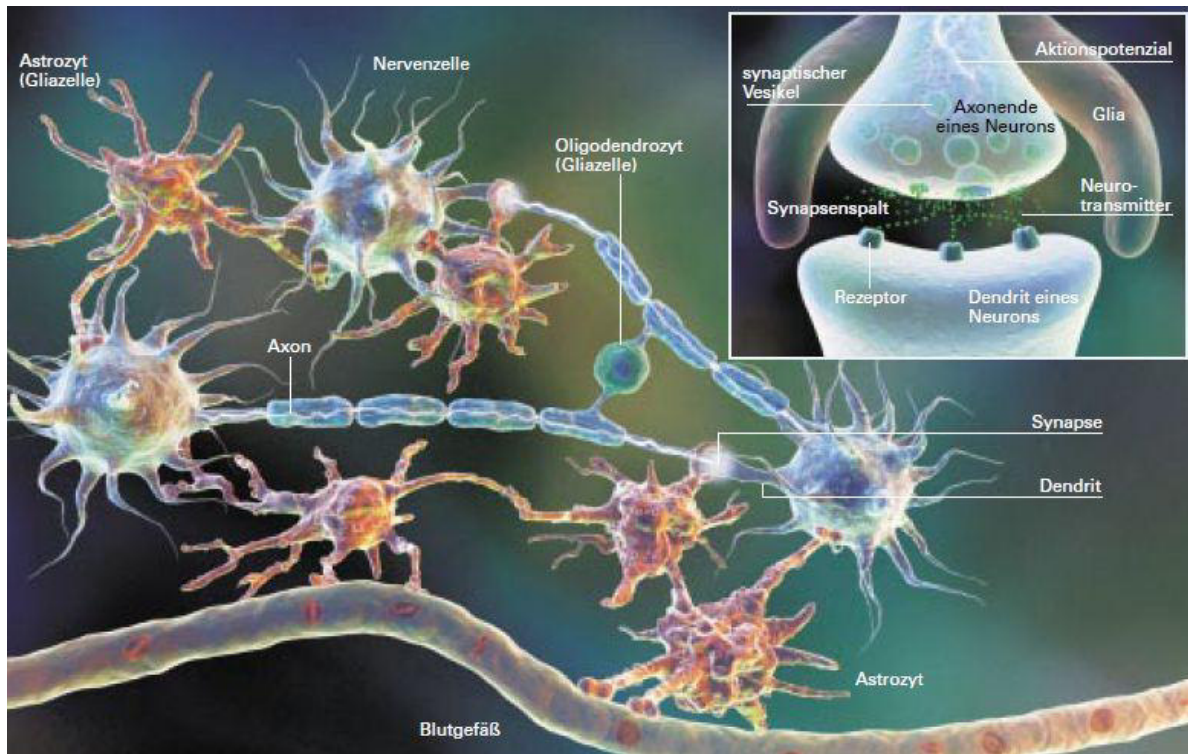


Abbildung 2-1: Verschiedene Zelltypen im ZNS

Glia- und Nervenzellen mit Ausschnitt einer Synapse (Spektrum der Wissenschaft 09/04).

2.2 Die oligodendroglialen Zellen

Während der Entwicklung des ZNS entstehen frühe gliale Vorläuferzellen aus neuroepithelialen Stammzellen des Neuralrohrs, die als GRP-Zellen (Glial-Restricted-Precursors) oder Glioblasten bezeichnet werden. Während der weiteren Entwicklung entstehen aus den Glioblasten oligodendrogliale Vorläuferzellen (OPC). Im Rückenmark entstehen proliferierende OPC in der ventralen Mitte, die sowohl lateral als auch dorsal migrieren und in der grauen und weißen Substanz die myelinisierenden Oligodendrozyten bilden (Warf, Fok-Seang et al. 1991). Auch in einer dorsalen Region entstehen OPC, die sich zu Oligodendrozyten entwickeln können. (Cai, Qi et al. 2005, Vallstedt, Klos et al. 2005). Im Gehirn entstehen OPC in der ventralen Zone, vorwiegend in der Subventrikularen-Zone (SVZ). Diese mitotischen Vorläuferzellen können sich nach der Migration zu ihrem Bestimmungsort, zu Oligodendrozyten differenzieren. In der weiteren Entwicklung entstehen OPC auch aus dorsalen Radial-Glia-Zellen (Richardson, Kessarar et al.

2006, Nishiyama 2007, Ventura and Goldman 2007). Jedoch differenzieren während der Entwicklung wesentlich mehr Oligodendrozyten, als für die Myelinisierung der Axone benötigt werden. Diese werden über den programmierten Zelltod (Apoptose) eliminiert. Während der Entwicklung des optischen Nervs konnte gezeigt werden, dass ca. 50% der Zellen der entstehenden Oligodendrozyten über Apoptose entfernt werden (Barres, Hart et al. 1992, Raff, Barres et al. 1993, Raff 1996). Ähnlich sind auch die Verhältnisse im sich entwickelnden Cortex, in dem bis zum postnatalen Tag 28 bis zu 37 % der prämyelinisierenden Oligodendrozyten eliminiert werden (Trapp, Nishiyama et al. 1997) So kann davon ausgegangen werden, dass in den oligodendroglialen Zellen Apoptose bzw. das Überleben abhängig ist von einem komplexen System an Faktoren, die von den zu myelinisierenden Axonen oder auch von assoziierten Glia-Zellen stammen können. Diese Überlebenssignale beinhalten u.a. IGF-1, PDGF-AA, CNTF, Neurotrophin-3 oder Neureguline (Barres, Schmid et al. 1993, Talbott, Cao et al. 2007, Butts, Houde et al. 2008).

Ein Teil der OPC bleibt jedoch undifferenziert und bildet eine Population an selbsterneuernden Vorläuferzellen über die gesamte Lebensspanne, sowohl in der weißen als auch in der grauen Substanz (Levine, Reynolds et al. 2001, Rivers, Young et al. 2008). Die OPC Population, die etwa 5%-10% aller Gliazellen darstellt, gehört zu den mitotisch aktivsten Zellen im ZNS, so kann davon ausgegangen werden, dass auch im adulten ZNS stetig sich OPC in reife Oligodendrozyten differenzieren (Dawson, Polito et al. 2003). In Mäusen, die motorisch über einen gewissen Zeitraum gefordert waren, konnte eine erhöhte Differenzierungsrate von OPC zu Oligodendrozyten nachgewiesen werden. Es wird vermutet, dass die verstärkte Myelinisierung die Aktivität neuronaler Netzwerke verbessern und dadurch eine Rolle in Lernprozessen ausüben kann. Bei Verletzungen (Stabwunden) reagierten NG2-positive OPC mit einer verstärkten Zellteilung. (Simon, Gotz et al. 2011). Mit dieser mitotischen Reaktion könnten OPC bei Schädigungen des ZNS an Regenerationsprozessen beteiligt sein. In MS-Läsionen oder in EAE-Modellen konnte gezeigt werden, dass OPC sich zu Oligodendrozyten differenzieren und die betroffenen Areale remyelinisieren (Raine and Wu 1993, Franklin and Ffrench-Constant 2008, Tripathi, Rivers et al. 2010).

Aus OPC entstehen nicht nur Oligodendrozyten, sondern ein Teil der Population kann sich auch zu GFAP-positiven Astrozyten differenzieren, sowohl *in vitro* als auch *in vivo* (Raff, Miller et al. 1983, Lillien and Raff 1990, Aguirre and Gallo 2004, Zhu, Bergles et al. 2008, Guo, Ma et al. 2009). Die Entstehung von Neuronen aus diesen Vorläuferzellen *in vivo* ist umstritten und noch nicht ausreichend geklärt (Richardson, Young et al. 2011).

Innerhalb der OPC Population konnten heterogene Zellen nachgewiesen werden. So konnten Zellen identifiziert werden, die sich in der Promotoraktivität des PLP-Gens unterscheiden (Mallon, Shick et al. 2002). Auch der Transkriptionsfaktor MASH1 wird nur von einem Teil der OPC im Telencephalon synthetisiert (Parras, Hunt et al. 2007). In der Expression von spannungsgesteuerten Ionenkanälen unterscheiden sich OPC der weißen und der grauen Substanz (Chittajallu, Aguirre et al. 2004). Aufgrund dieser verschiedenen Eigenschaften werden OPC in verschiedenen Publikationen auch als Polydendrozyten bezeichnet. Inwiefern es sich hierbei um Subpopulationen mit unterschiedlichen Funktionen im ZNS handelt, konnte bisher noch nicht zuverlässig geklärt werden (Nishiyama, Komitova et al. 2009).

Im adulten Gehirn bleiben NG2-positive OPC erhalten, die in engem Kontakt zu Neuronen stehen. Bergles und Mitarbeiter konnten aufgrund elektrophysiologischer Beobachtungen in elektronenmikroskopischen Aufnahmen in der Kontaktstelle zwischen Neuronen und OPCs synaptische Strukturen entdecken, z. B. Vesikel und PSD-ähnliche-Strukturen (Postsynaptic-Density). Durch Stimulation von Neuronen aus der CA3 Region des Hippocampus erfolgt eine Signaltransduktion in den NG2-positiven Zellen in der CA1 Region (Bergles, Roberts et al. 2000). In weiteren Untersuchungen konnten auch in anderen Regionen des ZNS, wie z. B. im Corpus callosum, Cerebellum oder auch im Cortex, Neuron-Glia Synapsen nachgewiesen werden (Lin, Huck et al. 2005, Kukley, Capetillo-Zarate et al. 2007, Ziskin, Nishiyama et al. 2007). Die Funktionen solcher Neuron-Glia Synapsen sind noch weitgehend unbekannt. OPC exprimieren spannungs-gesteuerte GABA-, AMPA-, Kainat- und NMDA-Rezeptoren. AMPA-Rezeptoren bilden z. B. mit glutamatergen Neuronen Synapsen aus und könnten dadurch die neuronale Aktivität beeinflussen (Bergles, Jabs et al. 2010, Sakry, Karram et al. 2011). Elektrophysiologische Untersuchungen demonstrierten, dass die Freisetzung von GABA oder Glutamat durch die Exzitation

von Neuronen ein Kalzium-Signal in den OPC erzeugt. Dies könnte einen Einfluss auf die Differenzierung und Myelinisierung von Axonen ausüben (Paukert and Bergles 2006, Gallo, Mangin et al. 2008, Hamilton, Vayro et al. 2010, Wake, Lee et al. 2011). So könnten OPC der Neuron-Glia Synapsen, über die Reaktion auf Neurotransmitter, die Plastizität und die Aktivität der neuronalen Netzwerke des ZNS beeinflussen.

Stallcup et al. lieferten den ersten Hinweis, dass OPC das NG2-Proteoglykan exprimieren. Dies konnte mit kultivierten NG2-positiven O2A-Vorläuferzellen gezeigt werden. Heute gilt NG2 als anerkannter Marker der OPC Population (Nishiyama, Komitova et al. 2009). Während der Differenzierung von OPC wird die Expression von NG2 herunter reguliert, so dass in reifen Oligodendrozyten NG2 nicht mehr nachweisbar ist. Auch JAM-A wird im ZNS spezifisch von NG2 positiven OPCs exprimiert (Stelzer, Ebnet et al. 2010).

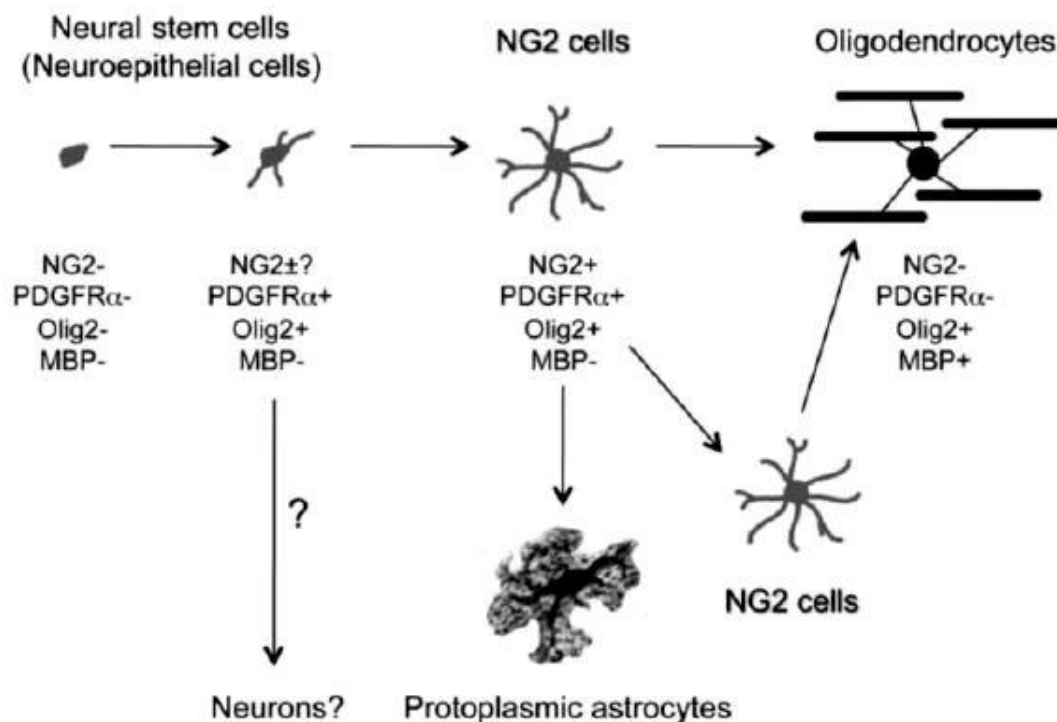


Abbildung 2-2: Schematische Übersicht der Entwicklungsstadien von OPC

NG2-positive OPC entstehen aus neuronalen Stammzellen. Am Anfang der Differenzierung exprimieren die Vorläuferzellen das NG2-Proteoglykan, den PDGF- α Rezeptor und verschiedene Transkriptionsfaktoren. Während der weiteren Entwicklung zu Oligodendrozyten nimmt die Expression

dieser Proteine ab und Bestandteile des Myelins wie z. B. MBP werden exprimiert. Die OPC können sich auch zu Astrozyten differenzieren. Auch die Entwicklung von Neuronen aus diesen Vorläuferzellen wird diskutiert. Modifiziert nach (Trotter, Karram et al. 2010).

2.3 Das NG2-Proteoglykan

Proteoglykane definieren sich durch kovalent gebundene Glukosaminoglykane (Mucopolysaccharide) an ein Kernprotein. Sie sind beteiligt am Aufbau der Extrazellulären Matrix, der strukturellen Organisation, der Antwort auf trophische Faktoren, Zellteilung, Zellkommunikation und Migration (Iozzo 1998).

Das NG2-Proteoglykan (Nerve/Glia-Antigen-2 aus Ratte) gehört zu der Familie der Chondroitinsulfat-Proteoglykane (CSPG) und ist ein Typ-1 Transmembranprotein, das von unterschiedlichen Zelltypen exprimiert wird (Stallcup 1981). Dazu gehören skelettale Myoblasten der quergestreiften Muskulatur, Vorläuferzellen von Muskelzellen, Knorpelzellen und unreife Schwann-Zellen, sowie oligodendrogliale Vorläuferzellen (OPC) und Perizyten im ZNS (Niehaus, Stegmüller et al. 1999, Diers-Fenger, Kirchhoff et al. 2001, Schneider, Bosse et al. 2001, Nishiyama, Komitova et al. 2009). Das homologe Protein AN2 aus *Mus musculus* ist zu 95% identisch und das menschliche Pendant MCSP besitzt 82,85% Homologie zu dem NG2-Protein aus der Ratte (Pluschke, Vanek et al. 1996, Schneider, Bosse et al. 2001, Yang, Price et al. 2004). Auch in *Drosophila melanogaster* (Kon-tiki) und in *Caenorhabditis elegans* (C48E7.6.p) konnten homologe Proteine identifiziert werden. Zur Erleichterung wird in dieser Arbeit nur die Bezeichnung NG2 verwendet, auch wenn die Kulturen aus Mauslinien stammten.

Das NG2-Protein besitzt ein molekulares Gewicht von ca. 300 kDa (inklusive der Glykosylierung) und besteht aus 2327 Aminosäuren. Die extrazelluläre Domäne stellt mit 2224 Aminosäuren den größten Teil des Proteins dar. Dieser Teil beinhaltet eine an Serin kovalent-gebundene Chondroitinsulfat-Kette an Position 999. Durch diese Chondroitinsulfat-Ketten ist eine Anreicherung von NG2 in Mikrodomänen möglich. Über diese Anreicherung können „Retraction-Fibers“ ausgebildet werden, die einen Einfluss auf die Zellpolarität und die Migration ausüben (Stallcup and Dahlin-Huppe 2001). Nahe an der Transmembrandomäne befinden sich in der Ektodomäne zwei

proteolytische Spaltstellen. NG2 kann durch Metalloproteinasen prozessiert werden. Die zelluläre Funktion dieser Produkte ist bis dato ungeklärt (Nishiyama, Lin et al. 1995, Asher, Morgenstern et al. 2005). Weiterhin befinden sich im extrazellulären Teil zwei LNS-Domänen (Laminin, Neurexin, Sex-Hormone-Binding-Globulin). Allgemein spielen LNS-Domänen eine Rolle bei Zell-Zell Interaktionen, u.a. über die Bindung von verschiedenen Adhäsionsmolekülen (Missler, Hammer et al. 1998). Im intrazellulären Teil des NG2-Proteins konnte eine prolinreiche Domäne mit angrenzenden Phosphorylierungsstellen nachgewiesen werden. Am C-terminalen Ende befindet sich ein PDZ-Bindemotiv, welches intrazelluläre Interaktionen mit PDZ-Domänen ermöglicht (Sheng and Sala 2001) (Schematische Darstellung von NG2 in Abbildung 2-3). In OPC binden intrazellulär MUPP1, GRIP und Syntenin-1. MUPP1 ist ein multifunktionales Gerüstprotein, das NG2 mit anderen zytosolischen Strukturelementen verbinden kann (Barritt, Pearn et al. 2000). GRIP besitzt 7 PDZ-Domänen und verbindet in OPC AMPA-Rezeptoren (alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid) mit dem NG2-Protein. Diese Interaktion kann u.a. eine funktionelle Rolle spielen, in der Positionierung zwischen NG2-positiven Gliazellen und neuronalen Synapsen (Stegmuller, Werner et al. 2003). Die Migration von OPC wird u.a. von Syntenin-1 beeinflusst. Der Knockdown von Syntenin-1 durch RNA-Interferenz, reduziert die Migration von OPC *in vitro*. Auch durch polyklonale-NG2-Antikörper, die die Interaktion der beiden Proteine inhibieren, konnten die Migration der OPC *in vitro* signifikant vermindern (Chatterjee, Stegmuller et al. 2008). Extrazelluläre Bindungspartner von NG2 sind: Kollagen Typ V und VI, PDGF- α Rezeptor (Platelet-Derived-Growth-Factor), PDGF-AA-Ligand, FGF-2 (Fibroblast-Growth-Factor-2), β 1-Integrin, Galectin-3, MT-3-MMP (Membrane-Type-3-Metalloprotease) und Angiostatin (Stallcup, Dahlin et al. 1990, Burg, Tillet et al. 1996, Nishiyama, Lin et al. 1996, Tillet, Ruggiero et al. 1997, Goretzki, Lombardo et al. 2000, Liu and Rabinovich 2005, Wen, Makagiansar et al. 2006, Nishiyama, Komitova et al. 2009). Extrazelluläre Interaktionspartner die über die LNS-Domänen mit NG2 interagieren sind noch nicht bekannt. Auch ein neuronaler Rezeptor konnte noch nicht nachgewiesen werden.

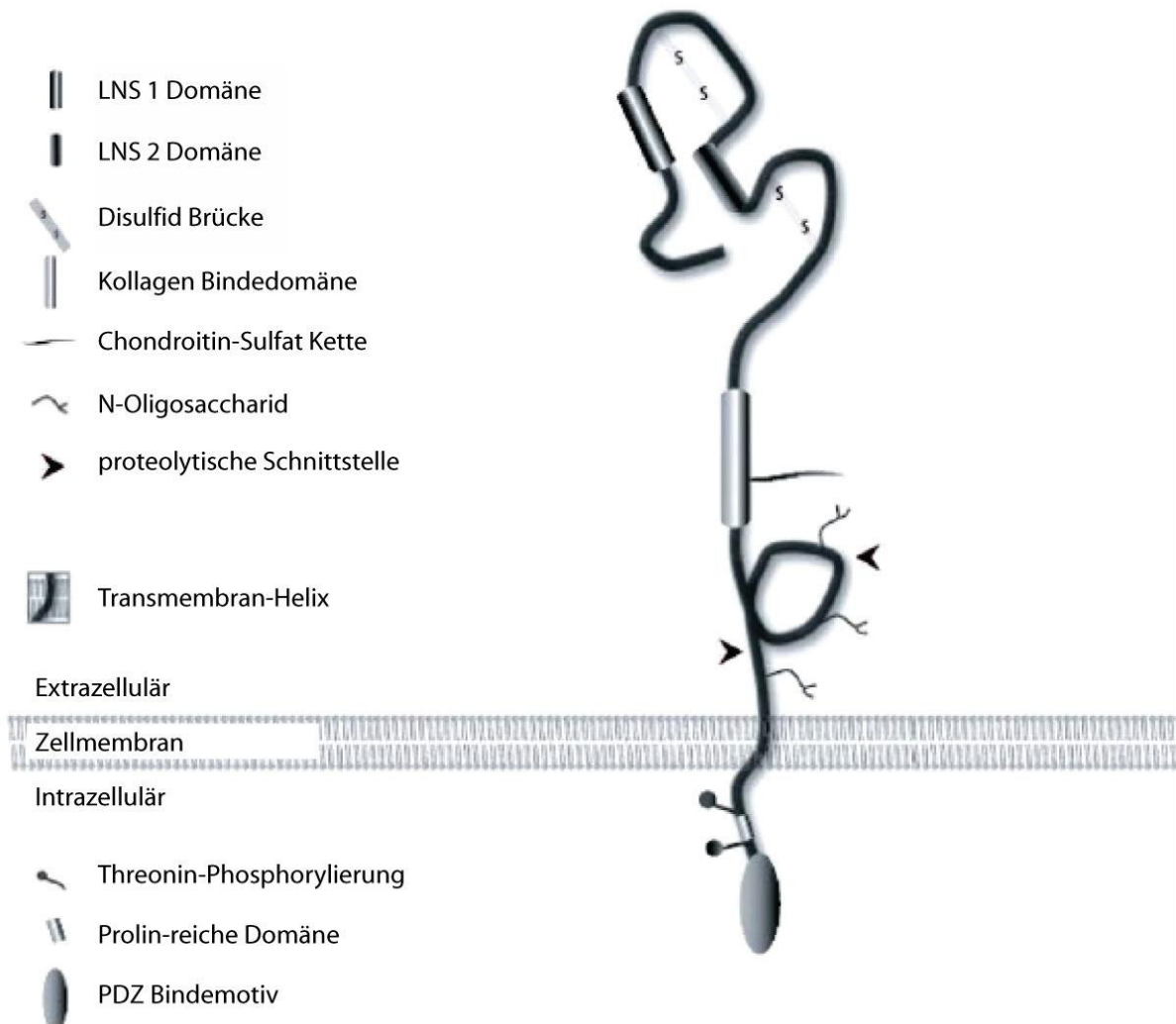


Abbildung 2-3: Domänenorganisation des NG2-Proteoglykan

Modifiziert nach (Stallcup and Huang 2008).

2.4 NG2-positive Glioma

Glioblastoma multiforme (GBM) ist der häufigste bösartige Gehirntumor bei Erwachsenen. Die mittlere Überlebenszeit liegt im Bereich von Monaten. Wie der Name schon erkennen lässt, entwickelt sich dieser Gehirntumor aus Gliazellen. Viele Glioma-Zellen exprimieren NG2 oder den PDGF- α Rezeptor und stammen von den OPC ab (Stallcup and Huang 2008). In diesen Tumoren sind NG2-positive Zellen durch Überexpression von mitotischen Faktoren für die aggressive Entwicklung dieser Erkrankung verantwortlich. In den Tumoren konnte gezeigt werden, dass ca.

80% der Zellen proliferieren, davon sind über 50 % NG2-positive Glioblastoma-Zellen (Al-Mayhani, Grenfell et al. 2011).

In Glioma-Zellen, die aus der OPC Linie entstehen, hat NG2 einen Einfluss auf die Motilität und die Chemoresistenz. Die Motilität von Glioblastoma über Kollagen-VI kann durch NG2-Transfektion gesteigert werden (Burg, Nishiyama et al. 1997). Die Induktion der Apoptose via TNF- α oder Bestrahlung in U251-NG2-positiven Tumorzellen zeigte eine reduzierte Apoptoserate gegenüber den Wildtyp U251, die kein NG2 exprimieren. Weitere Untersuchungen ergaben, dass dieser Effekt über $\alpha 3\beta 1$ -Integrin vermittelt wird. In beiden Zelllinien konnten keine Unterschiede in der Integrin Expression festgestellt werden, aber in den NG2-positiven Glioma konnte eine erhöhte Aktivierung der $\beta 1$ -Untereinheit nachgewiesen werden. Die aktivierte $\beta 1$ -Untereinheit nimmt Einfluss auf das „Überleben“ über die PI3K/AKT Signalkaskade (Joy, Beaudry et al. 2003, Downward 2004, Chekenya, Krakstad et al. 2008). In Biopsien von humanen Glioma konnte in Zellkultur mit Chemotherapeutika (Doxorubicin, Etoposide und Carboplatin) eine eindeutige Korrelation zwischen reduziertem Zelltod und gesteigerter NG2-Expression gezeigt werden (Chekenya, Krakstad et al. 2008). Zusätzlich identifizierte eine vergleichende genetische Analyse von Glioblastoma Proben, Mutationen in dem *IDH1* (Isocitrat-Dehydrogenase) Gen. Die Mutationen betreffen das aktive Zentrum von IDH1 (heterozygot). Die Isocitrat-Dehydrogenase ist ein Enzym des Citrat-Zyklus und ist für die Abspaltung von Kohlenstoffdioxid von Isocitrat verantwortlich, wobei α -Ketoglutarat entsteht. Auch in der Synthese von Glutathion ist IDH1 beteiligt und schützt Zellen vor oxidativem Stress. GMB Patienten mit dieser Mutation in dem IDH1 Gen zeigen eine signifikante Erweiterung der Lebensspanne (3,8a zu 1,1a). Die Glioblastoma mit intaktem IDH1 sind resistenter gegenüber oxidativem Stress (Kim, Yune et al. 2007, Parsons, Jones et al. 2008).

2.5 Zelltod

Das Absterben von Zellen innerhalb eines Organismus kann in drei Haupttypen des Zelltods eingeteilt werden: Apoptose, Autophagie und Nekrose (Nomenclature: Committee on Cell Death, 2009). Morphologische Charakteristika der Apoptose sind,

dass die sterbende Zelle in Zellmembranfragmenten verpackt wird und diese apoptotischen Partikel (Apoptotic-bodies) durch andere Zellen über Phagozytose eliminiert werden. Im Nukleus ist während des apoptotischen Vorgangs eine Pyknose zu erkennen, die aus der Kondensation und Fragmentierung der DNA bzw. des Chromatins resultiert (Kroemer, El-Deiry et al. 2005).

Die Mechanismen des Zelltods durch Autophagie sind bisher schlecht verstanden. Allgemein werden durch Autophagie zytosolische Bestandteile oder Organellen in Vakuolen eingeschlossen und über Lysosomen verdaut (Kroemer and Jaattela 2005). Dadurch wird der Autophagie, z. B. durch die Eliminierung von fehlgefalteten Proteinen oder schadhaften Organellen, eine zellprotektive Wirkung zugesprochen (Duprez, Wirawan et al. 2009). Inwiefern die Bildung von Vakuolen dem Zelltod durch Autophagie zugeordnet werden kann wird kontrovers diskutiert. So bleibt die Frage, ob Autophagie ein Mechanismus des apoptotischen Vorgangs ist oder Autophagie als eigenständiger Zelltod angesehen werden kann (Lockshin and Zakeri 2004). Der dritte Typ des Zelltods ist die Nekrose. Hauptmerkmale der Nekrose sind ein Anschwellen des Zellvolumens (Oncosis) und damit ein Aufplatzen der Zytoplasmamembran (Majno and Joris 1995). Ob eine Zelle apoptotisch oder nekrotisch stirbt ist abhängig vom intrazellulären ATP Level. Die vollständige Depletion von ATP führt zur Nekrose (Nicotera, Leist et al. 1998). Nach Einleitung der Apoptose kann, durch die Inhibition von Caspasen oder deren Aktivatoren, der Zelltod zu einem mehr nekrotischen Charakter umgeschaltet werden (Golstein and Kroemer 2005, Kroemer and Martin 2005). Daher kann man die Arten des Zelltods nicht eindeutig voneinander abgrenzen. So wurden weitere Kategorien, wie z. B. Aponecrosis, zur Beschreibung des Zelltods eingeführt, um den unterschiedlichen Zelltyp-spezifischen oder auslösenden Faktoren gerecht zu werden (Formigli, Papucci et al. 2000).

2.6 Apoptose

Apoptose ist ein wichtiger Aspekt zur Aufrechterhaltung der Homöostase, der Adaptation an die Umwelt und der Entwicklung eines Organismus (Jacobson, Weil et al. 1997, Horvitz 1999). Wenn aus vielfältigen Gründen die Mechanismen des

Proapoptotische Signale können extrazellulär über die Aktivierung von Rezeptoren erfolgen (FasL, TNF- α). Intrazellulär erfolgt die Signalkaskade, ausgelöst z. B. durch oxidativen Stress, durch Faktoren aus dem Nukleus, dem ER und den Mitochondrien. Die Einleitung der Apoptose durch die Mitochondrien erfolgt durch die Permeabilisierung des mitochondrialen Membransystems und der resultierenden Freisetzung von proapoptotischen Faktoren (Smac/DIABLO, OMI/HtrA2 und Cytochrom-c). Die Regulation der Permeabilisierung erfolgt über die die Aktivierung von Bax und Bak durch das Gleichgewicht zwischen pro- bzw. antiapoptotischen Faktoren. Diese Faktoren können u.a. bei DNA-Schädigungen aus dem Zellkern freigelassen werden oder aus dem ER, wenn durch fehlgefaltete Proteine ER-Stress entsteht. So führen verschiedene Signalkaskaden aus unterschiedlichen Organellen zur Aktivierung von Caspasen und zur Apoptose. Modifiziert nach (Lemasters 2005).

Nach der Einleitung der Apoptose muss die Zelle in Vesikel (Apoptotic-bodies) verpackt werden, so dass Makrophagen diese Zellfragmente aufnehmen können. Um dies intrazellulär zu realisieren, muss eine Vielzahl an biochemischen Prozessen ablaufen, z. B. werden die Zytoskelettelemente umorganisiert, die Kondensation des Chromatins erfolgt, der Zellkern wird fragmentiert und Phosphatidylserin wird von der Innenseite der Zytoplasmamembran zur Außenseite umgelagert, welches ein Signal für andere Zellen darstellt (Zamzami, Susin et al. 1996, Ortega and Moran 2011). Die Proteasen, die für diese Vorgänge innerhalb der Apoptose verantwortlich sind, heißen Caspasen und sind auch in gesunden Zellen vorhanden, allerdings in einer inaktiven Form. Sie können als inaktive Dimere vorliegen, die ihre aktiven Seiten voneinander abschirmen. Erst durch eine Spaltung zwischen der großen und kleinen Untereinheit wird das katalytische Zentrum für Substrate zugänglich. Oder sie liegen als inaktive Monomere vor und durch einen katalysierten Dimerisationsvorgang werden sie aktiv (Salvesen and Riedl 2008, Pop and Salvesen 2009). Bei der Inhibition sind auch andere Proteine beteiligt wie z. B. manche Mitglieder der IAP-Proteinfamilie (Inhibitor of Apoptosis-Proteins) (Birnbaum, Clem et al. 1994, Uren, Coulson et al. 1998). Ein Merkmal der IAP ist das Vorhandensein einer BIR-Domäne (Baculovirus-IAP-Repeat), die eine Zinkfinger-ähnliche Struktur besitzt und damit das katalytische Zentrum der Caspasen blockiert (Shi 2002). Wie effektiv die Inhibierung der Caspasen durch die IAP ist, konnte noch nicht ausreichend geklärt werden (Vaux and Silke 2005, Eckelman and Salvesen 2006, Eckelman, Salvesen et al. 2006). Caspasen (*Homo sapiens*) werden in Initiator-Caspasen 8 u. 9 und Effektor Caspasen 3, 6 u. 7 unterschieden. Während der Apoptose aktivieren die Initiator-

Caspasen die Effektor-Caspasen durch proteolytische Prozessierung. Die Caspasen 1, 4 u. 5, werden der inflammatorischen Gruppe zugeordnet. Die Funktionen der additionalen Caspasen 2, 10, 12 u. 14 sind noch zu wenig verstanden, um sie zuverlässig zu kategorisieren (Lamkanfi, Festjens et al. 2007, Eckhart, Ballaun et al. 2008). Um die vielfältigen Umstrukturierungen und Abbauprozesse innerhalb der Apoptose zu realisieren, besitzen Caspasen ein weites Substratspektrum. Die degradierten Produkte können als Nachweis des apoptotischen Vorgangs dienen, wie z. B. das DNA-Reparaturenzym PARP, dass durch die Caspase-3 und 9 proteolytisch abgebaut wird (Lazebnik, Kaufmann et al. 1994, Decker and Muller 2002).

Apoptose wird durch verschiedene Faktoren eingeleitet. Dabei kann zwischen intrinsischen und extrinsischen Signalen unterschieden werden (Abbildung 2-5). Die extrinsische Induktion wird durch die Aktivierung von sogenannten Todesrezeptoren ausgelöst. Zu der Familie dieser Todesrezeptoren (TNF-R) gehören TNF-R1, Fas/CD95, TRAIL und TRAMP (Schulze-Osthoff, Ferrari et al. 1998). Die Ligandenbindung an die Rezeptoren bewirkt eine Rekrutierung und Oligomerisation des Adaptermoleküls FADD (Fas-Associating-Death-Domain-Containing-Protein) im DISC Komplex (Death-Inducing-Signalling-Complex). Die Procaspasen-8 und 9 können dann in diesem Komplex integriert werden und durch Dimerisation aktiviert werden (Debatin and Kramer 2004). Der intrinsische Weg, auch mitochondrialer Apoptoseweg genannt, wird in der Zelle selbst generiert. Auslöser sind u.a. eine Überproduktion an ROS Verbindungen (oxidativer Stress), Glukose Mangel, hohe Kalziumkonzentration oder ER Stress (Anhäufung von fehlgefalteten Proteinen im Endoplasmatischen Retikulum). Dies verursacht über verschiedene Signalkaskaden, die Freisetzung von mitochondrialen Proteinen u.a. Cytochrom-c, Smac/DIABLO und OMI/HtrA2. Durch Cytochrom-c bildet das zytosolische Adapterprotein APAF-1 (Apoptosis-Protease-activating-Factor-1) einen Apoptosom-Komplex, in dem die Procaspase-9 aktiviert wird (Cain, Bratton et al. 2002). Durch die aktivierte Caspase-9 werden dann auch die Effektor Caspasen aktiviert und die Zelle wird durch Apoptose eliminiert.

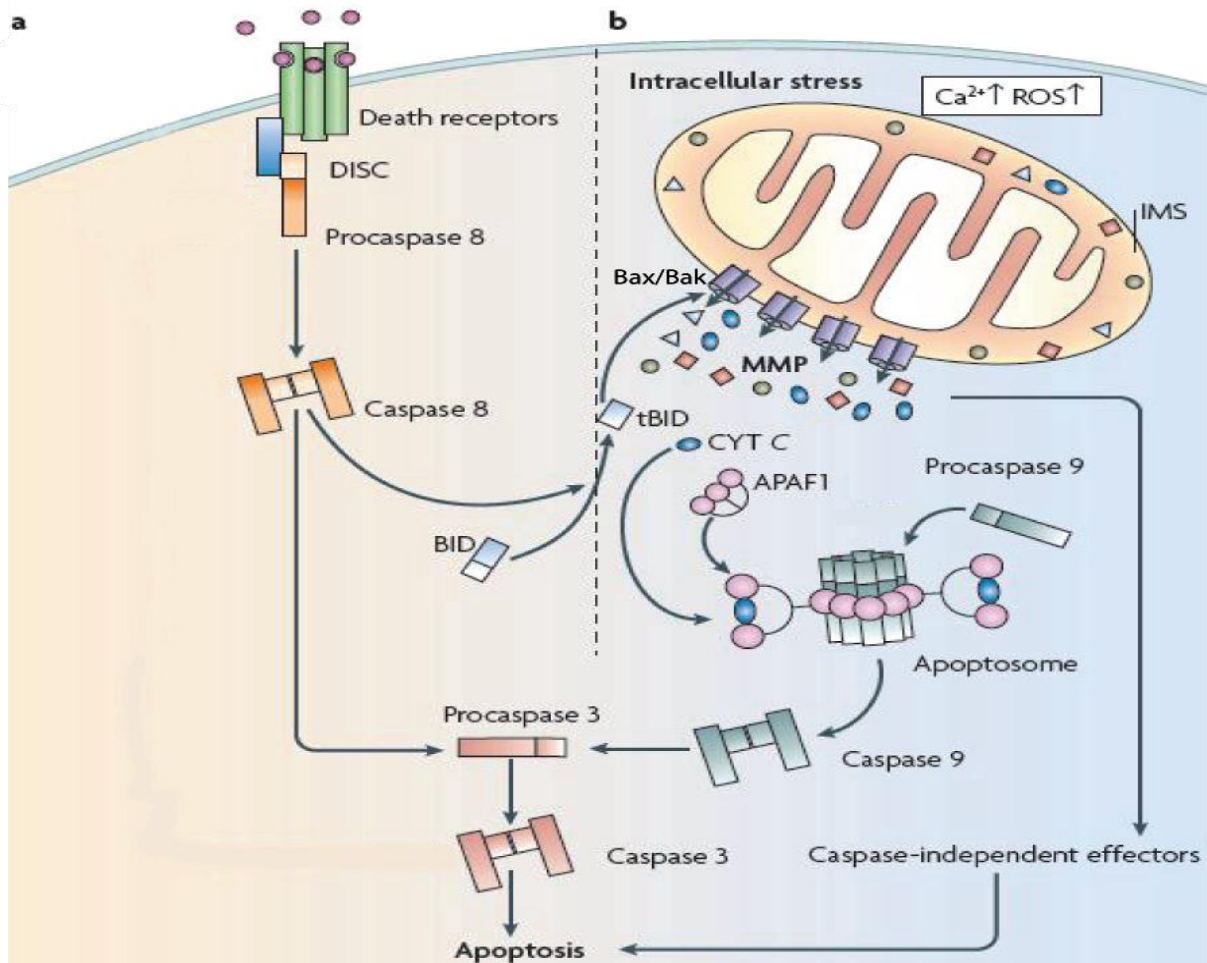


Abbildung 2-5: Extrinsischer (a) und intrinsischer (b) Signalweg der Apoptose

Apoptose kann ausgehend von zwei biochemischen Kaskaden eingeleitet werden. a) Der extrinsische Signalweg wird durch die Aktivierung von spezifischen Rezeptoren an der Zytoplasmamembran eingeleitet (z. B. TNF-R). Die Rezeptor-vermittelte Aktivierung der Initiator-Caspase-8 erfolgt in dem DISC Komplex. Diese aktiviert dann Effektor-Caspasen, sowie die Aktivierung von proapoptotischen Proteinen (BID, Bax und Bak), die eine Permeabilisierung der Mitochondrienmembran (MMP) katalysieren und damit den apoptotischen Vorgang unterstützen. b) Die Induktion des intrinsischen Signalwegs erfolgt z. B. durch oxidativen Stress (ROS). Durch Aktivierung proapoptotischer Proteine wird die Mitochondrienmembran permeabilisiert. Dadurch werden Proteine aus dem Intermembranraum (IMS), z. B. Cytochrom-c, in das Zytosol translokalisiert. Im Zytosol ist Cytochrom-c an der Bildung des Apoptosom-Komplexes und damit an der Aktivierung der Initiator Caspase-9 beteiligt. Aktivierte Caspasen-unabhängige Effektoren können die MMP zusätzlich verstärken (Galluzzi, Blomgren et al. 2009).

Wie schon erwähnt spielt in der Apoptose die Permeabilisierung der Mitochondrienmembranen (MMP) eine zentrale Rolle. Durch den intrinsischen Signalweg, aber auch in der Apoptose durch den extrinsischen Signalweg, wird die äußere

Mitochondrienmembran permeabilisiert. MOMP (Mitochondrial-Outer-Membrane-Permeabilization) verursacht, dass mitochondriale Proteine, die in dem Intermembranraum lokalisiert sind, in das Zytosol translokalisiert werden und dort eine proapoptotische Funktion ausüben. Zu diesen Proteinen gehören Smac/DIABLO, Cytochrom-c und OMI/HtrA2. Verantwortlich für MOMP sind u. a. die Proteine Bax und Bak, die zu der Familie der Bcl2 Proteine gehören (Wei, Zong et al. 2001). Unter normalen physiologischen Bedingungen ist Bax im Zytosol lokalisiert. Während der Induktion der Apoptose wird Bax durch die Interaktion mit BH3-only oder p53 aktiviert und in die äußere mitochondriale Membran eingebaut. Dort bildet Bax durch die Oligomerisation Poren in der Membran (Wolter, Hsu et al. 1997). Aber auch die Aktivierung und Homooligomerisation von Bak trägt zur Porenbildung der äußeren, mitochondrialen Membran bei (Kuwana, Mackey et al. 2002). Die genauen Regelmechanismen für die Aktivierung von Bax und Bak sind im Detail noch nicht geklärt. Vermutlich resultiert die Aktivierung aus einem komplexen Wechselspiel zwischen proapoptotischen und antiapoptotischen Faktoren, deren Gleichgewicht, z. B. durch oxidativen Stress, verändert wird. Beteiligt bei diesem Prozess sind die Proteine tBid, Puma, Noxa und Bim, die eine N-terminale Exposition von Bax ermöglichen (Kim, Tu et al. 2009). Die Permeabilisierung der Mitochondrienmembranen kann auch durch MPT (Mitochondrial-Permeability-Transition) erfolgen. Über den PTPC-Kanal (Permeability-Transition-Pore-Complex) erfolgt unter physiologischen Bedingungen ein Austausch an Metaboliten zwischen der mitochondrialen Matrix und dem Zytosol. Durch proapoptotische Faktoren ändert der Kanalkomplex seine Konformation und es folgt ein Eintritt von Wasser und anderen löslichen Molekülen in die mitochondriale Matrix durch Osmose (Verrier, Mignotte et al. 2003). Folge ist das Zusammenbrechen des Transmembranpotentials und ein Anschwellen der Matrix. Vermutlich wird durch diesen Vorgang auch die äußere Membran der Mitochondrien permeabilisiert und MPT kann auch an MOMP während der Apoptose beteiligt sein (Armstrong 2006). Allerdings gibt es auch Indizien, dass MPT eher ein Aspekt des nekrotischen Zelltods ist (Nakagawa, Shimizu et al. 2005).

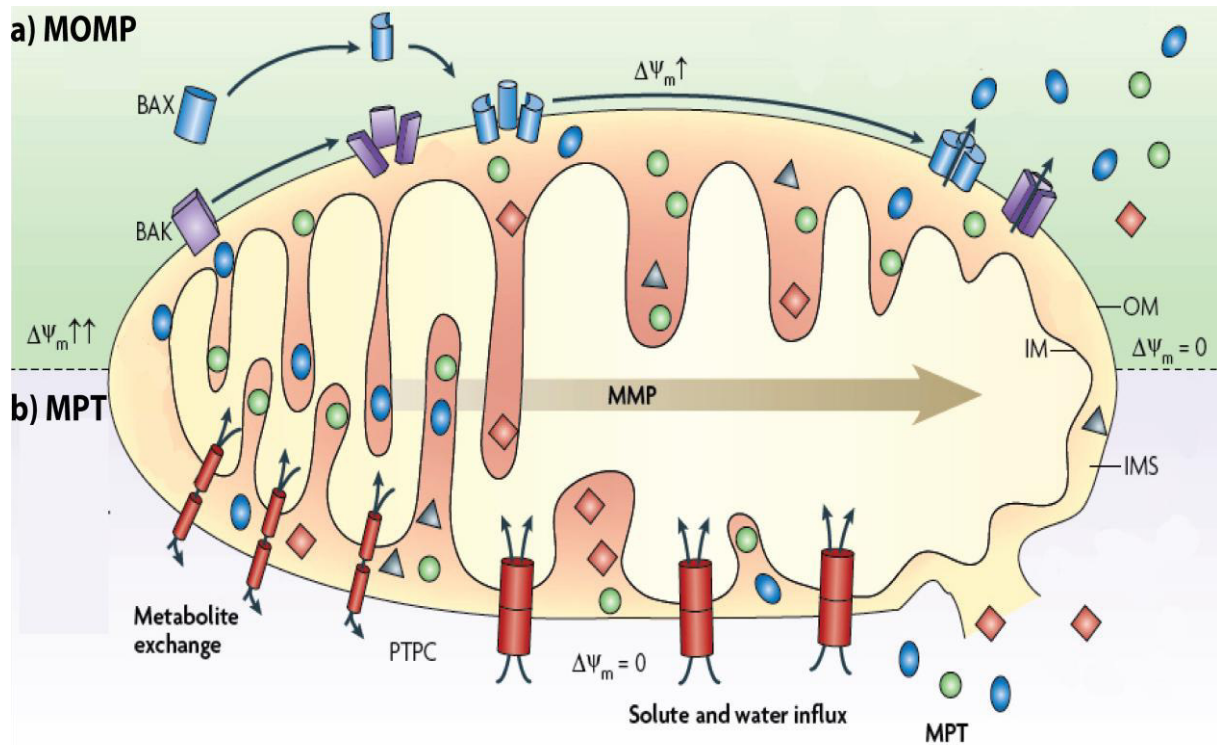


Abbildung 2-6: Mitochondriale-Membran-Permeabilisierung (MMP)

a) MOMP (Mitochondrial-Outer-Membrane-Permeabilization) wird durch proapoptotische Proteine der Bcl-2 Familie induziert (z. B. Bax und Bak), die Poren in der äußeren Membran bilden. Konsequenz ist eine Freisetzung von proapoptotischen Molekülen aus dem IMS (Intermembrane-Space) in das Zytosol und ein Zusammenbrechen des Membranpotentials ψ_m . b) MPT (Mitochondrial-Permeability-Transition) erfolgt durch die Bildung von Kanälen zwischen Zytosol und der mitochondrialen Matrix. Durch proapoptotische Faktoren wird in dem PTPC (Permeability Transition Pore Complex) eine Konformationsänderung induziert. Nach Bildung des Transmembran-Kanals erfolgt ein Anschwellen der Matrix durch H_2O -Influx. Dadurch kann MPT auch zu MOMP führen. Modifiziert nach (Galluzzi, Blomgren et al. 2009).

2.7 Die Serinprotease OMI/HtrA2

Die evolutionär hoch konservierte HtrA-Familie (High-temperature-requirement) der oligomeren Serinproteasen ist charakterisiert durch eine Trypsin-ähnliche Proteasedomäne und ein oder zwei PDZ-Motiven (Kim and Kim 2005). Durch die Bindung von Interaktionspartnern an die C-terminale PDZ-Domäne kann die Protease Aktivität moduliert werden (Clausen, Southan et al. 2002). Die bakterielle HtrA-Proteinfamilie vermittelt Stresstoleranz (Pallen and Wren 1997). Die homologen

eukaryotischen Proteasen üben essentielle Funktionen in den Mitochondrien aus. Manche Mitglieder der Proteinfamilie agieren aber auch in der Apoptose, sowohl in dem Caspase-abhängigen als auch in dem Caspase-unabhängigen Signalweg. Zu der eukaryotischen HtrA Familie gehört u. a. OMI/HtrA2. In *E. coli* funktioniert das bakterielle homologe Protein unter physiologischen Temperaturbedingungen als Chaperon, jedoch findet bei erhöhten Temperaturen ein Umschalten zu erhöhter Proteaseaktivität statt. Dadurch können die, durch den Hitzestress fehlgefalteten, Proteine eliminiert werden und eine Akkumulation wird vermieden (Spiess, Beil et al. 1999).

OMI/HtrA2 wird als unprozessierte, etwa 50 kDa große Vorläuferform exprimiert und mittels MLS (Mitochondrial-Localisation-Signal) zu den Mitochondrien transportiert. In den Mitochondrien ist OMI/HtrA2 in dem Intermembranraum (IMS) lokalisiert (Hegde, Srinivasula et al. 2002, Martins, Iaccarino et al. 2002). Auch eine mögliche Lokalisation im Nukleus (Gray, Ward et al. 2000) und im ER konnte nachgewiesen werden (Faccio, Fusco et al. 2000). Der Transmembran-Anker, hinter dem N-terminalen MLS verankert das Vorläuferprotein in der inneren mitochondrialen Membran, dort erfolgt dann die proteolytische Reifung. Die prozessierte Form ist dann um das MLS-Motiv und den Transmembrananker verkürzt (133 Aminosäuren). Am N-terminalen Ende liegt nach der Reifung das IBM-Motiv (IAP-Binding-Motif), vergleichbar mit anderen IAP-Inhibitoren wie z. B. Smac/DIABLO (Suzuki, Imai et al. 2001, Martins, Iaccarino et al. 2002, van Loo, van Gurp et al. 2002, Verhagen, Silke et al. 2002) (Abbildung 2-7). Die genauen Mechanismen der Prozessierung von OMI/HtrA2 sind noch nicht vollständig geklärt. Eine Autokatalyse ist denkbar, da aufgereinigtes, rekombinantes OMI/HtrA2 an Ala133 prozessiert wird. Eine enzymatische mutante Form (S306A) hingegen bleibt unprozessiert (Savopoulos, Carter et al. 2000, Seong, Choi et al. 2004). Allerdings wird in mnd2-Mäusen, die eine Mutation in der Serinprotease-Domäne tragen (S276C) und dadurch diese nicht funktionsfähig ist, OMI/HtrA2 normal prozessiert. So könnten auch andere Proteasen im IMS für die proteolytische Reifung von OMI/HtrA2 verantwortlich sein und den Ausfall der Autokatalyse kompensieren (Jones, Datta et al. 2003).

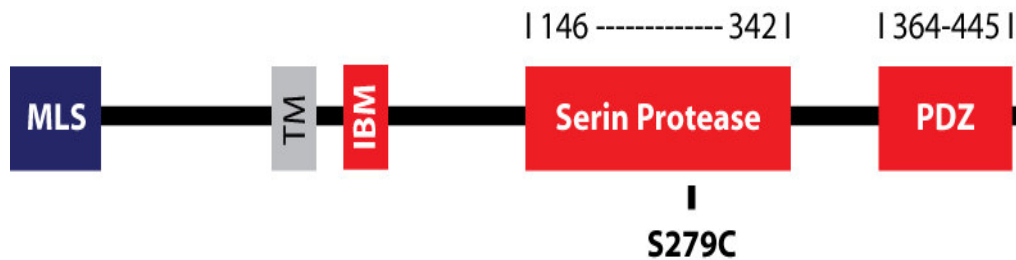


Abbildung 2-7: Organisation der Domänen von OMI/HtrA2

Gezeigt ist die unprozessierte Form (50 kDa) mit dem MLS (Mitochondria-Translocation-Signal), die in den Mitochondrien proteolytisch prozessiert wird und als reifes Protein (36 kDa) ein Homotrimer im IMS (Intermembrane-Space) bildet. Unprozessiertes OMI/HtrA2 besteht aus 5 funktionellen Domänen oder Motiven: Mitochondrien-Lokalisation Signal (MLS), Transmembran-Segment (TM), IBM (IAP-Binding-Motif), Serinprotease-Domäne und einer C-terminalen PDZ-Domäne. Die *mnd2*-Maus exprimiert proteolytisch inaktives OMI/HtrA2 durch eine Mutation in der Proteasedomäne (S279C). Modifiziert nach (Vande Walle, Lamkanfi et al. 2008).

Kristallstrukturanalyse und Analyse einer Gel-Filtration zeigten, dass OMI/HtrA2 ein Homotrimer bildet. Mutations- bzw. Deletions-Analysen belegten, dass die Proteasefunktionalität abhängig ist von der Trimerbildung (Nam, Seong et al. 2006). Die Proteaseaktivität wird durch die PDZ-Domäne reguliert. Die Deletion der PDZ-Domäne zeigte eine erhöhte Proteaseaktivität, während eine Punktmutation, relativ nahe an der PDZ-Domäne (Y361A), die Konformation zwischen PDZ- und Protease-Domäne negativ beeinflusst und eine reduzierte Aktivität zeigt (Li, Srinivasula et al. 2002). Durch einen Liganden, der an die PDZ-Domäne von OMI/HtrA2 bindet, kann somit die Aktivität der Serinprotease reguliert werden. Ein Interaktionspartner von OMI/HtrA2 ist der Tumor-Suppressor WARTS, der durch die Interaktion die Proteaseaktivität von OMI/HtrA2 erhöht und damit proapoptotisch wirkt (Kuninaka, Nomura et al. 2005). Der gleiche Effekt konnte auch mit dem Alzheimer-relevanten Protein Presenilin gezeigt werden (Gupta, Singh et al. 2004).

2.7.1 OMI/HtrA2 Funktion im mitochondrialen Intermembranraum

Innerhalb des mitochondrialen Intermembranraums scheint OMI/HtrA2 eine zellprotektive Aufgabe zu erfüllen. Dies zeigt der neurodegenerative Phänotyp der *mnd2*-Maus, die eine homozygote Mutation in der Serinprotease-Domäne von OMI/HtrA2 (S 279 C) trägt und dadurch keine enzymatische Aktivität ausübt (Jones,

Datta et al. 2003, Martins, Morrison et al. 2004). Die *mnd2*-Maus entwickelt eine Degeneration von Neuronen im Striatum mit Astrogliose und Aktivierung von Mikroglia ab einem Alter von etwa 3 Wochen (Jones, Albin et al. 1993). Mit zunehmendem Alter sind auch Neurone aus anderen Regionen des ZNS betroffen (Rathke-Hartlieb, Schlomann et al. 2002). Andere Missense-Mutationen im Gen, das für OMI/HtrA2 codiert, zeigen einen Phänotyp der mit der Parkinson Erkrankung assoziiert ist (Strauss, Martins et al. 2005). Im Vergleich mit dem homologen bakteriellen DegP-Protein, liegt die Vermutung nahe, dass OMI/HtrA2 die Proteinfaltung innerhalb der Mitochondrien kontrolliert. Unterstützt wird die These durch Experimente mit Tunicamycin oder Hitzeschock, in denen durch fehlgefaltete Proteine, eine erhöhte Expression von OMI/HtrA2 beobachtet werden konnte (Gray, Ward et al. 2000). Zusätzlich zeigten Hitzeschock-Experimente, dass die Proteaseaktivität von OMI/HtrA2 gesteigert wurde (Martins, Turk et al. 2003). So kann OMI/HtrA2 in den Mitochondrien eine protektive Funktion für die Zellen ausüben.

2.7.2 OMI/HtrA2 Funktion in der Apoptose

OMI/HtrA2 wird nach der Einleitung der Apoptose durch die Permeabilisierung der mitochondrialen Membranen in das Zytosol translokalisiert. Dort unterstützt OMI/HtrA2 den apoptotischen Vorgang durch einen Caspasen-abhängigen und Caspasen-unabhängigen Mechanismus. Der Knockdown von OMI/HtrA2 durch Antisense- und RNAi, zeigte eine erhöhte Resistenz von Zellen gegen verschiedene apoptotische Stimuli wie z. B. Stauroporin (Proteinkinaseinhibitor: Induktion des intrinsischen Apoptosemechanismus), Cisplatin (verursacht Störungen in der DNA Struktur), UV-Bestrahlung oder TNF-Rezeptor-Liganden (Hegde, Srinivasula et al. 2002, Martins, Iaccarino et al. 2002, Srinivasula, Gupta et al. 2003, Yang, Church-Hajduk et al. 2003, Cilenti, Kyriazis et al. 2005, Liu, Li et al. 2006). Auch die spezifische Inhibition von OMI/HtrA2 mit dem synthetischen Inhibitor UCF-101 (Cilenti, Lee et al. 2003) reduzierte die Apoptoserate in Zellen, die mit Cisplatin, TNF- α oder Stauroporin behandelt wurden (Blink, Maianski et al. 2004, Cilenti, Soundarapandian et al. 2004, Cilenti, Kyriazis et al. 2005, Klupsch and Downward 2006).

Im Caspasen-abhängigen apoptotischen Mechanismus werden die Caspasen-inhibitoren IAP von OMI/HtrA2 über das IBM-Motiv gebunden und durch die Proteasedomäne degradiert (Vande Walle, Lamkanfi et al. 2008). Hierzu gehören XIAP, IAP1 und IAP2, die über ihre BIR (Baculovirus-IAP-repeat) Domänen die Caspasen 3,7 und 9 binden und dadurch inhibieren. IBM-defizientes OMI/HtrA2 kann zwar noch cIAP1 degradieren, aber mit einer 10 fachen geringeren Effizienz (Yang, Church-Hajduk et al. 2003). Wenn allerdings die Proteaseaktivität von OMI/HtrA2 inhibiert wird, findet keine Degradation von XIAP bzw. Aktivierung von Caspasen statt (Liu, Gao et al. 2005).

Das OMI/HtrA2 nicht nur einen Einfluss auf die Aktivierung der Caspasen besitzt konnte mit HeLa-Zellen gezeigt werden. Der Knockdown von OMI/HtrA2 und die Inhibition der Caspasen durch Z-VAD-FMK, verhindern den Zelltod durch Stauroporin. Während die Protektion weniger effektiv ausfällt, wenn nur die Caspasen inhibiert werden (Kuninaka, Nomura et al. 2005, Liu, Li et al. 2006). Dies deutet darauf hin, dass OMI/HtrA2 auch über einen Caspasen-unabhängigen Mechanismus Apoptose oder Zelltod induzieren kann. Bestätigt wird dies durch Substrat-Analysen von OMI/HtrA2, die durch die Degradation proapoptotisch wirken können (Vande Walle, Van Damme et al. 2007). So konnte das mitochondriale antiapoptotische HAX-1 (HS1-Associated-Protein) als Substrat identifiziert werden. Weiterhin konnten auch Translationsfaktoren identifiziert werden (eIF-4G1 und EF-1 α), die durch ihre Degradation keine *de novo* Proteinsynthese mehr leisten können (Clemens, Bushell et al. 2000, Saelens, Kalai et al. 2001) oder die Apoptose-assoziierten Proteine KIAA1967 und KIAA0251 (Breckenridge, Nguyen et al. 2002, Sundararajan, Chen et al. 2005). Unterstützt wird dies durch Experimente mit embryonalen Fibroblast-Zellen von *mnd2*-Mäusen, die im Vergleich zu Wildtyp Mäusen eine deutlich geringere Zelltodrate bei Inkubation mit verschiedenen Apoptose Induktoren zeigen (Cilenti, Soundarapandian et al. 2004). Weiterhin kann die zytosolische Lokalisation von aktivem OMI/HtrA2 die Permeabilisierung der mitochondrialen Membranen verstärken (Suzuki, Takahashi-Niki et al. 2004).

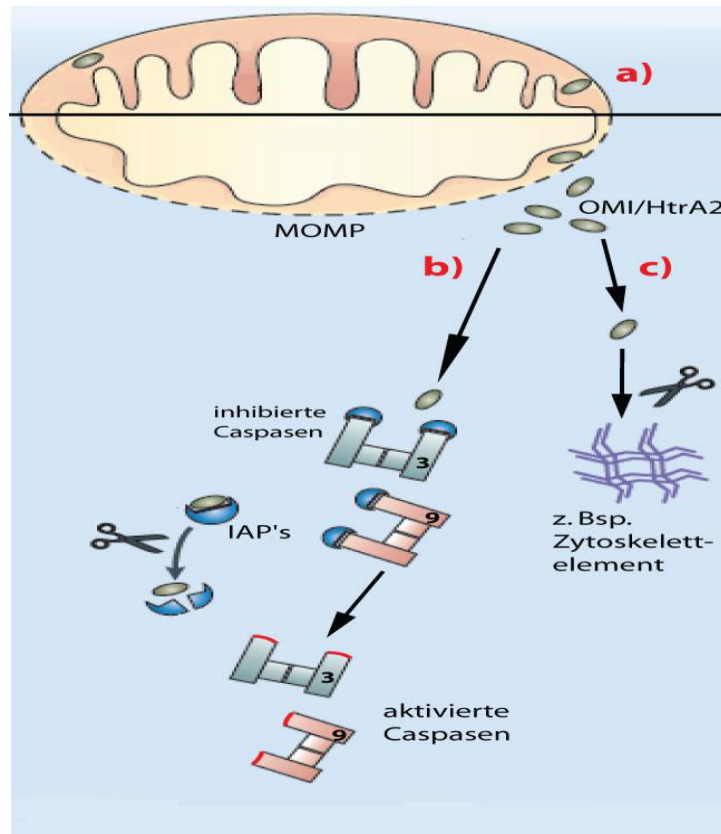


Abbildung 2-8: Zelluläre Funktionen und Lokalisation von OMI/HtrA2

a) Lokalisation unter normalen physiologischen Bedingungen im Intermembranraum (IMS) der Mitochondrien. Dort führt OMI/HtrA2 durch die Proteaseaktivität und die Degradation von fehlgefalteten Proteinen eine Chaperon-ähnliche Funktion aus. Unter Stressbedingungen oder bei der Einleitung der Apoptose wird OMI/HtrA2 in das Zytosol translokalisiert. Dort agiert OMI/HtrA2 proapoptotisch, entweder durch die Spaltung der IAP und die resultierende Aktivierung der Caspasen (b) oder OMI/HtrA2 kann in einem Caspase-unabhängigen Weg über die Degradation von antiapoptotischen Proteinen oder auch in der Umstrukturierung von Zytoskelettelementen die Apoptose fördern (c).

2.8 Oxidativer Stress in oligodendroglialen Zellen

Oligodendrogliale Zellen besitzen im Vergleich zu den meisten anderen Zellen des ZNS, eine erhöhte Sensibilität gegenüber Substanzen, die oxidativen Stress verursachen (Juurlink 1997). Dies zeigen u.a. ischämische (zu wenig Sauerstoff) und hypoxische (zu geringer Blutfluss) Vorkommnisse. Besonders bei Frühgeborenen resultiert dies in einer Schädigung der weißen Substanz. Hauptform ist die

Periventrikuläre-Leukomalazie (PVL). Hypoxia-Ischemia führt u.a. zu einer Akkumulation von Wasserstoffperoxid in neonatalen Mäusen (Lafemina, Sheldon et al. 2006). PVL ist definiert als eine Läsion mit einem nekrotischen Kern, um den sich eine Zone mit diffusen Schädigungen der weißen Substanz anschließt. Betroffen sind in der diffusen Zone interessanterweise hauptsächlich die nicht ausdifferenzierten Oligodendrozyten, die durch Apoptose eliminiert werden. Im späteren Alter kann in diesen Regionen eine Hypomyelinisierung beobachtet werden (Back, Luo et al. 2001, Ness, Romanko et al. 2001).

Die oligodendroglialen Zellen besitzen relativ geringe Konzentrationen an Antioxidantien, wie Glutathion, Glutathionperoxidase oder auch mitochondriale Mangan-Superoxid-Dismutase. Dadurch sind sie besonders sensibel für Schädigungen und Zelltod durch oxidativen Stress. Zudem sie noch einen erhöhten oxidativen Stoffwechsel besitzen, z. B. im Vergleich zu Astrozyten (Juurlink 1997, Folkerth, Haynes et al. 2004). Aber auch exzitotoxische Ursachen, wie z. B. Glutamat, können einen verstärkten Zelltod in Oligodendrozyten verursachen (Oka, Belliveau et al. 1993).

Innerhalb der oligodendroglialen Zellen unterscheiden sich die Vorläuferzellen (OPC) und die differenzierten, myelinisierenden Oligodendrozyten in der Glutathion-Konzentration. Dadurch werden reife Oligodendrozyten erst bei wesentlich höheren H_2O_2 Konzentrationen apoptotisch (Fragoso, Martinez-Bermudez et al. 2004). Weiterhin unterscheiden sich OPC und Oligodendrozyten in den Konzentrationen an Molekülen, die direkt an der Apoptose beteiligt sind. So konnte festgestellt werden, dass in OPC das proapoptotische Bax-Protein gegenüber dem antiapoptotischen bcl-X1 Protein dominiert, im Gegensatz zu reifen Oligodendrozyten. Auch die Expression der Procaspase-3 ist in OPC wesentlich höher (Khorchid, Fragoso et al. 2002). Gleiches gilt für einige proapoptotische Mitglieder der Bcl-2 Familie (Itoh, Itoh et al. 2003). Dies weist darauf hin, dass OPC gegenüber Oligodendrozyten, aber auch gegenüber anderen Zelltypen, einen sehr sensiblen Mechanismus besitzen um Apoptose einzuleiten.

Diese erhöhte Sensibilität gegenüber oxidativem Stress der oligodendroglialen Zellen kann zum Bsp. bei der MS-Erkrankung eine Rolle spielen. In aktiven Läsionen konnte

ein deutlich erhöhtes Signal für oxidative Schädigungen detektiert werden. So konnte ein Anstieg an oxidierten DNA und Lipiden nachgewiesen werden (Haider, Fischer et al. 2011). Die Quelle für ROS können aktivierte Mikroglia sein. Es ist bekannt, dass Mikroglia über erhöhte NADPH-Oxidase-Aktivität Superoxid-Verbindungen extrazellulär absondern, ein Abwehrmechanismus gegen Mikroorganismen (Bedard and Krause 2007). Auch Stickstoffoxid (NO) wird über die Mikroglia freigesetzt. Diese reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffverbindungen führen zu mitochondrialen Dysfunktionen und letztendlich zum Zelltod (Brunori, Forte et al. 2006, Rubbo, Trostchansky et al. 2009).

2.9 Fragestellung der Arbeit

Die mitochondriale Serinprotease OMI/HtrA2 wurde als ein potentieller Bindungspartner von NG2 in einer Y2H-Analyse identifiziert. Ziel dieser Arbeit war die Interaktion über das PDZ-Bindemotiv von NG2 und der PDZ-Domäne von OMI/HtrA2 zu verifizieren. Da OMI/HtrA2 im Zytosol eine proapoptotische Funktion ausübt, sollte der Einfluss der Interaktion auf die Apoptose von NG2-positiven OPC unter oxidativem Stress genauer untersucht werden. Auch der molekulare Mechanismus der Interaktion sollte aufgeklärt werden. In der homozygoten NG2-EYFP Maus sollte untersucht werden, ob der NG2-Knockout Abnormalitäten aufweist, die in Zusammenhang mit der Interaktion zwischen NG2 und OMI/HtrA2 stehen könnten.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

Hersteller	Produkt
Amicon	Centricon Ultracell YM-30
Assistent Germany	Neubauerkammer
Biorad	Poly-Prep Chromatographie Säulen
Brand	Einmalküvetten
Braun	Kanülen, Spritzen
Eppendorf	Pipettenspitzen, Multikanalpipette
GE Healthcare	Amersham Hyperfilm
Greiner	Falcons
Menzel	Deckgläser
Millipore	Bottle Top Filter, Hybond-P PVDF Membran
Nunc	Zellkulturflaschen, Kryoröhrchen, Nunclon 24well und 96well Zellkultur-platten, 96well MaxiSorp ELISA Plates
Prime Glass	Neuroclean Deckgläser
Sarstedt	Einmalplastikwaren, Zellschaber, Zellkulturschalen, Pipettenspitzen, Transferpipetten
VWR	Whatman-Paper, Objektträger, Einmal-Küvetten, Pasteurpipetten

Tabelle 3-1: Materialien

3.2 Technische Geräte

Hersteller	Produkt
Amaxa	Nucleofector II
Amersham Bioscience	Biotrak II Plate-Reader

Biometra	T3 Thermocycler
Biorad	Gene Pulser
Epson	Scanner 4180
GE Healthcare	Photometer Ultraspec 2100 Pro
Haraeus	Biofuge 17RS
Hermle	Z 383K Zentrifuge
Invitrogen	NuPage Blot- und Elektrophoresekammern
Kendro	Megafuge 1.0R
Leica	Fluoreszenz Mikroskop DM 6000, Fluoreszenz Mikroskop DM LB, Vibratom VT 1000S
MS Laborgeräte	Röntgenfilmentwickler Optimax
Thermo Scientific	Nano Drop 1000

Tabelle 3-2: Technische Geräte

3.3 Chemikalien

Hersteller	Chemikalien/Reagenzien
AppliChem	Ampicillin, n-Octyl-Glucoside
Biochrom	Pferdeserum (HS), Fötales Kälberserum (FCS)
Calbiochem	Moviol 4-88, UCF-101
Fluka	Paraformaldehyd (PFA)
GE Healthcare	Prot. G und A Sepharose-Beads, CNBr Beads
Gibco	Pen-Strep, B27 Supplement, DMEM-Pulver für SATO-Medium
Invitrogen	Agarose, Gentamycin, L-Glutamin, Trypsin, Agarose, DMEM, HBSS, Hygromycin, NuPage Gele und Puffer, Nukleasefreies H ₂ O, HS, Mark 12MW Proteinmarker, SeaBlue Plus Prestained Proteinmarker, Na-Pyruvat
Merck Millipore	EDTA, Essigsäure, α -D-Glucose, Luminata Crescendo und Forte Western HRP Substrate (ECL), Citrat

National Diagnostics	30% Acrylamid/Bisacrylamid
Pierce	1-Step Ultra Tetramethylbenzidin-ELISA (TMB)
PreproTech Inc.	bFGF, PDGF
Roche	Na-Pyruvat, Proteaseinhibitoren-Cocktail Complete, DNAase I
Roth	APS, BSA, Agarose Low-Melt, CaCl ₂ , Glycin, MgCl ₂ , DTT, EtOH, Ethidiumbromid, Hefeextrakt KCL, Na ₂ PO ₄ , NaHCO ₂ , Methanol, NaOH, Isopropanol, SDS, Tween 20, Temed, Roti-Blue Coomassie-Lösung, H ₂ O ₂ (30%), TRIS, H ₂ SO ₄ , Gelatine, Milchpulver, o-Phosphorsäure, DAPI
Serva	Temed, Phenolrot
Sigma Aldrich	β-Casein, DMF, MTT, Poly-L-Lysin, Triton-X100, Na-Deoxycholat, Imidazol, Insulin, Putrescin, Progesteron, L-Tyroxin, Panceau, Triiodo-L-Thyronin, PEI
VWR	DMSO

Tabelle 3-3: Chemikalien

3.4 Kits

Hersteller	Kit
Amaxa	Basic Nucleofector Kit for primary neurons
Calbiochem	BCA Protein Assay Kit
Invitrogen	PureLink Quick Plasmid Miniprep Kit, PureLink HiPure Plasmid Maxiprep Kit
Invitrogen	SilverQuest Kit
PromoKine	Mitochondrial Apoptosis Kit (Mito-Capture)

Tabelle 3-4: Kits

3.5 Puffer, Nährmedien und Lösungen

Puffer/Medium	Zusammensetzung
B27 Medium	13,4 g/L DMEM, 2 g/L NaHCO ₃ , 20 ml B27 Supplement, 0,011% Pyruvat, 500 nM Triiodo-L-Thyronin (T3), 500 nM L-Thyroxin (T4) in ddH ₂ O lösen, steril filtrieren und 1% (v/v) hitzeinaktiviertes Pferdeserum hinzufügen
Blockierlös. f. ELISA	0,2% Gelatine, 3% BSA in PBS, steril filtrieren
Citrat Puffer	0,01 M Citrat pH 6,0
DAPI	1:10.000 in 1x PBS
DMEM	Fertigmedium von Sigma D5796
Einfriermedium	70 ml RPMI 1640, 20 ml FCS, 10 ml DMSO, steril filtrieren
HBSS	Fertigmedium von Gibco (-CaCl ₂ , -MgCl ₂)
LB-Agar	300 ml LB-Medium, 4,5 g Agar-Agar, autoklavieren
LB-Medium	10 g Trypton, 5 g Hefe-Extrakt, 10 g NaCl in 1 L ddH ₂ O lösen und autoklavieren
Moviol	2,4 g Moviol ü. N. in 6 ml Glycerin und 6 ml ddH ₂ O lösen. Nach Zugabe von 0,2 M Tris-HCl (pH 8,5) die Lösung mindestens 10 min auf 50°C erwärmen und durch Zentrifugation bei 1000 g für 15 min klären
MTT Lösung	5 mg/ml MTT in PBS
PBS (10x)	1,498 M NaCl, 0,08 M Na ₂ HPO ₄ , 0,0174 M NaH ₂ PO ₄ in ddH ₂ O lösen und auf pH 7,4 einstellen
PBST 0,2%	0,2% (v/v) Tween 20 in 1xPBS lösen
PLL (10x)	1 g PLL in 1 L sterilem ddH ₂ O lösen
Probenpuffer (4x)	200 mM Tris-HCL (pH=6,8), 10% (w/v) SDS, 0,4% (v/v), Bromphenolblau, 40% (v/v) Glycerol
RIPA-Waschpuffer	150 mM NaCl, 50 mM TRIS, 1% Triton X-100, 0,5% (w/v) Na-Deoxycholat, 0,05% (w/v) SDS in ddH ₂ O lösen
Sato-Medium	13,4 g/L DMEM, 2 g/L NaHCO ₃ , 0,01 g/L Transferrin, 0,1 g/L Insulin, 200 nM Progesteron, 100 µM Putrescin, 220 nM Natrium-Selenit, 500 nM Triiodo-L-Thyronin (T3), 500 nM L-Thyroxin (T4) in ddH ₂ O lösen, steril filtrieren und 1% (v/v) hitzeinaktiviertes Pferdeserum hinzufügen
SDS-PAGE-Laufpuffer	125 mM Tris, 1,25 M Glycin, 0,5% (w/v) SDS in ddH ₂ O lösen

Solubilisierungs-lösung	10% (w/v) SDS ,40% (v/v) DMF, 20% (v/v) konz. Essigsäure in ddH ₂ O lösen und auf pH 4 einstellen
Stopplös. f. TMB	2M H ₂ SO ₄ in dH ₂ O
Stripping-Puffer	100 mM NaOH, 4% (w/v) SDS, 0,5% (w/v) DTT in H ₂ O lösen
TAE-Puffer	242 g Tris, 57,1 ml Essigsäure, 100 ml 0,5 M EDTA in 1 L ddH ₂ O lösen
TBST	25 mM Tris, 150 mM NaCl, 2 mM KCl, 0,2% (v/v) Tween 20; pH 7.4
Triton-Lysispuffer	150 mM NaCl, 50 mM TRIS (pH 7,4), 1% Triton X-100 (v/v), 30 mM n-Octyl-Glucoside, 1x Roche Proteaseinhibitoren in ddH ₂ O lösen
Trypsin/EDTA (TE-Low)	0,1% (w/v) Trypsin, 0,02% (w/v) EDTA in HBSS lösen
Western-Blot-Transferpuffer	24 M Tris, 192 mM Glycin, 20% (v/v) Ethanol in ddH ₂ O lösen

Tabelle 3-5: Puffer, Nährmedien und Lösungen

3.6 Primäre Antikörper

Antigen	Spezies	Größe Antigen [kDa]	Klonalität	Verdünnung	Hersteller/ Herkunft
ASPA	Kaninchen	50	pc	1/1000 WB	AG Klugman
Cleaved-Caspase 3	Kaninchen	17	pc	1/1000 WB; 1/400 IF	Cell Signalling
CNPase	Maus	46 und 48	mc	1/1000 WB	Sigma
COX1	Maus	Ca. 60	mc	1/1000 WB	Invitrogen
FLAG	Maus	gegen FLAG-Tag	mc	1/1000 WB	Sigma
GFAP	Kaninchen	48 und 54	pc	1/2000 WB; 1/1000 IF	Dako Cytomation
GFP	Huhn	27	pc	1/5000 WB; 1/4000 IF	Abcam
GFP	Kaninchen	27	pc	1/5000 WB	Abcam
GRIP	Maus	130	mc	1/2000 WB	BD Bioscience

JAM-A	Kaninchen	33	pc	1/2000 WB 1/200 IF	Sigma
NF 200 (SMI-31R)	Maus	200	mc	1/2000 WB; 1/1000 IF	Covance
NG2	Ratte	330	mc	1/200 WB; 1/20 IF	Hybridoma AG Trotter
NG2cyto	Kaninchen	330	pc	1/200WB	Serum AG Trotter
PARP	Kaninchen	117	pc	1/1000 WB	Cell Signalling
Penta-HIS	Maus	gegen HIS- Tag	mc	1/1000 WB	Qiagen
PLP (aa3)	Ratte	25	mc	unverd.	M.Lees, Waltham (USA)
Tubulin	Maus	55	mc	1/10000	Sigma-Aldrich
γ-Enolase	Maus	50	mc	1/500 WB	Santa Cruz

Tabelle 3-6: Primäre Antikörper

3.7 Sekundäre Antikörper

Antikörper gegen	Spezies	Konjugat	Verdünnung	Hersteller/Herkunft
Kaninchen	Ziege	HRP	1/10000	Dianova
Maus	Ziege	HRP	1/10000	Dianova
Maus (sp)	Ziege	HRP	1/10000	Dianova
Ratte	Ziege	HRP	1/10000	Dianova
Huhn	Ziege	HRP	1/10000	Dianova
Maus	Ziege	Cy2	1/200	Dianova
Kaninchen	Ziege	Cy3	1/800	Dianova
Ratte	Ziege	Cy2	1/200	Dianova
Ziege	Kaninchen	Kein Konjugat	1/800	Dianova
Kaninchen	Ziege	Alexa 488	1/600	Invitrogen
Huhn	Ziege	Cy2	1/500	Dianova

Tabelle 3-7: Sekundäre Antikörper

3.8 Plasmide

3.8.1 OMI/HtrA2-FLAG Plasmid

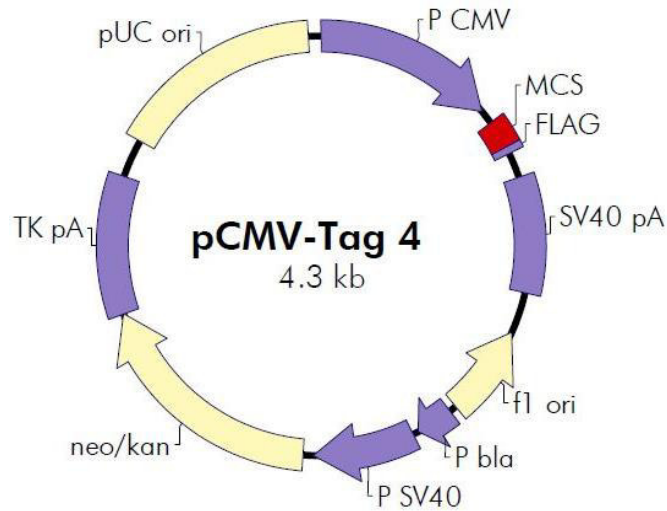


Abbildung 3-1: OMI/HtrA2-FLAG Expressionsvektor

Zur Herstellung des OMI/HtrA2-Expressionsvektors wurde die Sequenz von OMI/HtrA2 (Mensch) zwischen den Restriktionsschnittstellen *EcoRV* und *XhoI* der „Multiple Cloning Site“ des pCMV-Tag 4a Vektors einkloniert. Der FLAG-Tag wird im Fusionsprotein wegen der Prozessierung von OMI/HtrA2 C-terminal exprimiert. Das Konstrukt wurde von Reijko Krüger (Tübingen) zur Verfügung gestellt.

3.8.2 NG2del Plasmid

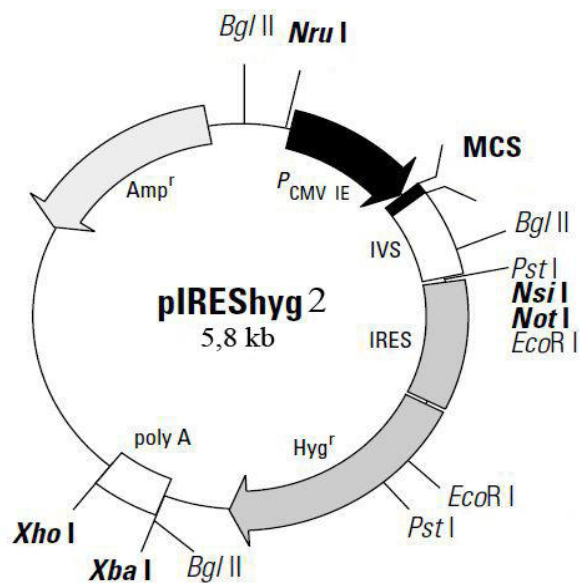


Abbildung 3-2: NG2del-Expressionsvektor

Zur Herstellung des NG2del-Expressionsvektoren wurde die Sequenz von NG2del (siehe Anhang) in den pIRESHyg2-Vektor zwischen den Restriktionsschnittstellen NheI und BamHI der „Multiple Cloning Site“ einkloniert (Philipp Schätzle). Die Expression der NG2del-Konstrukte wird durch den CMV-Promotor gesteuert. Für den Insert der Tags wurde eine zusätzliche Restriktionsstelle (KasI) in die NG2del-Sequenz kloniert (Site-directed-mutagenesis). Über die Schnittstellen KasI und BstRI der MCS wurde ein Teil der NG2del Sequenz ausgeschnitten und mit der NG2del Sequenz mit dem FLAG- bzw. HIS-Tag „ersetzt“ (siehe Primer). Die TAGs wurden nahe der Transmembrandomäne von NG2del exprimiert. Die Deletion des PDZ-Bindemotivs von NG2del- erfolgte über die Restriktionsstelle Scal, die sich im PDZ-Bindemotiv von NG2 befindet (Sequenzen im Anhang). Zwischen Scal und BstBI wurde das deletierte Fragment (ohne PDZ-Bindemotiv) herausgeschnitten und in den Vektor ohne NG2del zwischen BstBI und HpaI ligiert (Fabien Biname).

3.9 Primer

Primer	Sequenz
OMI/HtrA2-FLAG	5'-CTGATATCAAGGCGGAGCTGATGGCT-3' 5'-ATCCTCGAGTTCTGTGACCTCAGGGGTCA-3'
NG2del	5' CGCTAGCATGCTTCTCGGCCCGGACA 3' (Nhe I NG2 del 1) 5' CAAGGCCACAGCAGGTGCACTCTGGCTCAC 3' (NG2 del 1) 5' CGTGAGCCAGAGTGACCTGCTGTGGCC 3' (NG2 del 2) 5' CGGATCCTCACACCCAGTACTGGCCATTCC 3' (Bam HI NG2 del 2)
NG2del-HIS (bzw. Flag)	ACTGGCGCCATCATCACCATCACCACAAAGGTGGTTTCCTGGGCTT CTTAGAGG (NG2del_Kasmut_6His_F) GC = modifiziert ACCTTCGAAAGGTCTCTGTGTCACCGGCTAGGCCATTGCGG (NG2del_Kasmut_BstBI_R)

Tabelle 3-8: Primer

3.10 Small-interfering-RNAs

Die siRNA wurden von der Firma Qiagen bezogen und nach Angaben des Herstellers gelöst.

NG2 siRNA: Zielbereich ist die UTR 1 von NG2

Kontroll-siRNA: Zielsequenz: 5'-AATTCTCCGAACGTGTCACGT-3'

3.11 Die NG2-EYFP-Knockout Maus

In die Mauslinie des Stammes C57BL/6 wurde in das Startcodon (Exon 1) des NG2 Gens das Reporter-gen-EYFP inseriert, so dass die Expression des EYFP-Proteins unter dem endogenen NG2-Promotor steht. In dieser Arbeit wurden nur homozygote Tiere verwendet, die kein NG2 exprimieren (NG2-EYFP-Knockout). Als Kontroll-Tiere dienten Mäuse des Stammes C57BL/6 gleichen Alters. Die NG2-EYFP Mauslinie wurde von Dr. K. Karram generiert (Karram, Goebbels et al. 2008).

3.12 Zellkultur

Die Zellkulturarbeiten wurden unter einem LAMINAR-FLOW-Arbeitsplatz durchgeführt. Die Kultivierung erfolgte in Brutschränken der Marke SANYO und LABOTECH. Das Pelletieren der Zellen erfolgte, wenn nicht anders angegeben, bei 800 rpm, 4°C für 10 min. Das Einfrieren der Zellen erfolgte in Einfriermedium in Kryoröhrchen zunächst bei -80°C und anschließende Langzeitlagerung in flüssigem Stickstoff. Das Auftauen der Kryoröhrchen erfolgte bei 37°C im Wasserbad. Anschließend wurde die Zellsuspension mit 10-fachen Volumen an Medium pelletiert um das DMSO-haltige Einfriermedium so schnell wie möglich zu verdünnen. Danach wurde das Pellet mit Medium gelöst und die Zellen nach Bedarf ausplattiert.

3.12.1 Die Zelllinie Oli-neu

Die Oli-neu Zelllinie entstand durch die Immortalisierung von primären oligodendroglialen Vorläuferzellen (OPC) aus der Maus, mittels Onkogen-Transfer des t-neu Gens (Jung, Kramer et al. 1995).

Oli-neu-Zellen wurden bei 37°C, 5% CO₂ und einer Luftfeuchtigkeit von 95% in Sato-Medium mit 1% HS in PLL-beschichteten Kulturschalen kultiviert und ca. alle 3-4 Tage meist im Verhältnis 1:10 passagiert. Dazu wurden die Zellen mit warmen (37°C) Trypsin/EDTA vom Boden der Kulturschale abgelöst (ca. 5 min). Um die enzymatische Reaktion abzustoppen, wurde 4°C-kaltes PBS+10% HS im Verhältnis 1:1 zu der Trypsin/EDTA Lösung hinzugegeben. Anschließend wurden die Zellen bei 800 rpm und 4°C 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in angewärmtem Medium gelöst und resuspendiert und nach Bedarf in Kulturgefäßen ausplattiert.

3.12.2 Die Zelllinie HEK 293T

Die Zelllinie entstand durch Transformation humaner embryonischen Nierenzellen mit dem Insert des Adenovirus (Graham, Smiley et al. 1977). Zusätzlich besitzen HEK 293T ein *SV40 large* Antigen, welches für die Replikation von Viren von Bedeutung ist. HEK 293T Zellen sind leicht zu kultivieren und zeigen gute Transfektionseigenschaften. Sie bilden in Kultur einen epithelähnlichen Verbund.

HEK 293T Zellen wurden bei 37°C, 10% CO₂ und einer Luftfeuchtigkeit von 95% kultiviert. Als Medium wurde DMEM (Fa. Sigma) mit 10% FCS und 1% Natriumpyruvat verwendet. Die Zellen wurden zur weiteren Kultivierung alle 3-4 Tage meist im Verhältnis 1:15 passagiert. Dazu wurden die Zellen mit warmen (37°C) Trypsin/EDTA vom Boden der Kulturschale abgelöst und abgeklopft um möglichst eine Einzelzellsuspension zu erhalten (ca. 5 min). Um die enzymatische Reaktion abzustoppen, wurde 4°C-kaltes PBS+10% HS im Verhältnis 1:1 zu der Trypsin/EDTA Lösung hinzugegeben. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in angewärmtem Medium gelöst und resuspendiert und nach Bedarf ausplattiert.

3.12.3 Cerebellum Kulturen

Präparation

Die Präparation der gemischten Kulturen erfolgte mit P8-P9 Mäusen. Dabei wurde nach entfernen der Hirnhäute das Kleinhirn entnommen und in HBSS überführt. Das HBSS wurde abgenommen und für ca. 15 min erfolgte die Inkubation in HBSS mit 1% Trypsin bei 37°C (2ml/Cerebellum). Hierbei wurde das Gewebe grob zerkleinert. Danach wird das trypsinhaltige Medium abgesaugt und das Gewebe nach 2 Waschschritten in 0,05% DNAase (1ml/Cerebellum) inkubiert. Dabei wird das Gewebe mit 3 Pasteurpipetten mit abnehmendem Durchmesser mechanisch zur Einzelzellsuspension zerkleinert. Danach wird mit HBSS auf 10 ml aufgefüllt und die Zellen pelletiert und noch einmal zusätzlich mit HBSS gewaschen. Nach dem Pelletieren wurden die Zellen in erwärmten SATO mit B27 Supplement und 1% HS aufgenommen und in einer 24 *Well*-Platte ausplattiert (2×10^5 Zellen/*well*). Für immunzytochemische Färbungen wurden die Zellen auf PLL-beschichteten Deckgläsern ausplattiert.

Kultivierung

Die gemischten Cerebellum Kulturen wurden mit 8% CO₂ kultiviert. Ein Tag nach der Präparation erfolgte die Zugabe der Wachstumsfaktoren PDGF (10ng/ml) und FGF (5ng/ml). Ein Mediumwechsel erfolgte ca. alle 3 Tage. Die Kulturen wurden für die Stressexperimente mit Wasserstoffperoxid für ca. 10-14 Tagen kultiviert (nach morphologischer Begutachtung). Die Zugabe von Wachstumsfaktoren wurde 2-3 Tage vor der H₂O₂ Inkubation beendet.

3.12.4 Transiente Transfektion von Plasmiden

Elektroporation

HEK293T Zellen wurden ca. 24-48 h nach der letzten Passage von den Kulturgefäßen abgelöst und gezählt. Die Zellen wurden dann pelletiert und in DMEM (ohne Zusätze) so aufgenommen, dass eine Konzentration von 2×10^6 Zellen/800 µl vorliegt. In den Elektroporationsküvetten (4 mm) wurden 20 µg Plasmid-DNA vorgelegt und mit 800 µl der Zellsuspension vermischt. Die Elektroporation erfolgte

mit dem Gene-Pulser (Biorad). Programm: „Standardprotocols/ Mammalia/ HEK293/ 220 V und 4mm Küvettenbreite“. Mit diesem Programm wurde die Spannung über eine Square-Wave angelegt. Nach der Elektroporation ruhten die Küvetten für ca. 10 min und anschließend wurden die Zellen mit einer Pasteurpipette in die entsprechenden Kulturgefäße überführt. Nach 12h wurde das Medium gewechselt. Transfizierte HEK293T Zellen für die Aufreinigung der NG2del-HIS Fusionsproteine, wurden nach der Elektroporation mit 4 μM Natriumbutyrat (NaBut) behandelt. NaBut kann Histondeacetylasen (HDAC) hemmen, dadurch reduziert sich die Affinität der Histone zur DNA und die „freie“ DNA kann besser transkribiert werden. So führt NaBut zu einer gesteigerten Transkriptionsrate der Plasmid-DNA.

Polyethylenimin (PEI) Transfektion

Kationischer Polymere wie z. B. Polyethylenimin (PEI) bilden mit DNA-Molekülen in wässrigen Medien lösliche Komplexe, die das Einschleusen des Genmaterials in die Zelle ermöglichen. Im Vergleich zur Elektroporation ist diese Transfektionsmethode wesentlich schonender für die Zellen. Daher wurden die HEK293T Zellen mit dieser Methode transfiziert (NG2del-Flag-Konstrukte), die in den Experimenten mit H_2O_2 verwendet wurden. Die Zellen wurden 12-16 h vor der Transfektion passagiert. Der Ablauf war wie folgt:

Transfektionsansatz (1x)

A) 1 μg der Plasmid-DNA wurde in 30 μl DMEM-Medium verdünnt.

B) 4 μl PEI (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ in H_2O pH 7,2) wurde in 30 μl DMEM-Medium verdünnt.

- Beide Ansätze wurden getrennt voneinander für 10 min. bei RT inkubiert.
- Die Ansätze A und B wurden miteinander gemischt (Vortexer) und für 15 min. bei RT inkubiert.
- danach wurde die Lösung zu den Zellen in den Kulturgefäßen gegeben
- nach 4-6 h wurde ein Mediumwechsel (mit oder ohne Hygromycin) durchgeführt

Für eine 15 cm Kulturschale mit einer Dichte von ca. 70% wurde ein Ansatz von 10x gewählt. Nach 12h wurden die Zellen ohne Trypsin durch Abklopfen gelöst und für die Stressexperimente in 96 Well-Platten ausplattiert (ohne Hygromycin). In den 96 Well-Platten wurden die Zellen bis zu den Stress-Experimenten noch für ca. 15 h kultiviert.

3.12.5 Transfektion von Small-Interfering-RNAs mit AMAXA-Nukleofektion

Die AMAXA-Nukleofektion kann für den *Knockdown* bestimmter Gene bzw. Genprodukte in Zellen verwendet werden. Small-Interfering-RNAs (siRNA) sind kurze RNA-Moleküle, die im Zytoplasma durch den RNase-III-Dicer Komplex prozessiert und mit dem RISC-Komplex assoziiert werden. In Verbindung mit dem RISC-Komplex kann die siRNA komplementäre Ziel-mRNA binden. Durch die RNA-Helikase- und Nuklease-Funktion des RISC-Komplexes, kann die Ziel-mRNA prozessiert werden. Die Folge ist ein Entwinden und Spalten der mRNA, die dann im Zytosol weiter abgebaut wird. Mit dieser Methode kann die Expression eines bestimmten Proteins verhindert oder reduziert werden. Die Nukleofektion ist eine Methode für das Einbringen der siRNA in die Zelle. Dazu werden 1×10^6 Oli-neu Zellen in 100µl AMAXA-Nukleofektlösung (Basic-Nuleofector-Kit: Primary Neurons) resuspendiert und mit 160 nmol NG2siRNA vermischt. Die Elektroporation erfolgte mit Programm O-005 (Nucleofector II, AMAXA). Anschließend wurden die Zellen für die Versuche in den entsprechenden Kulturgefäßen ausplattiert. Für die Experimente mit H_2O_2 wurden die Oli-neu Zellen nach der Nukleofektion für 24-30 h kultiviert.

3.12.6 Behandlung von Kulturen mit H_2O_2 und UCF-101

Um oxidativen Stress in den Zellen zu simulieren, wurden die Kulturen mit H_2O_2 inkubiert. Für den MTT-Test und die WB-Analysen von Oli-neu und transfizierten HEK293T Zellen, wurden unterschiedliche Konzentrationen an H_2O_2 eingesetzt. Die Inkubationszeit ohne anschließenden Mediumwechsel betrug insgesamt 4 Stunden. Wobei MTT nach 2 h Stress hinzugegeben wurde.

Cerebellum Kulturen wurden mit 800 µM H_2O_2 für 18h gestresst. Es erfolgte nach H_2O_2 -Zugabe kein Mediumwechsel um zu vermeiden, dass apoptotische Zellen sich

ablösen und nicht mehr detektierbar wären. Um die aktivierte Caspase 3 in immunzytochemischen Färbungen und WB-Analysen nachzuweisen, wurden die Kulturen jedoch nur für 5h gestresst. H₂O₂ wurde in PBS als 50 mM Stammlösung angesetzt.

Die Inkubation von UCF-101 (10 µM) erfolgte 30 min. vor der H₂O₂-Zugabe ohne anschließenden Mediumwechsel. Die Kontrolle wurde in entsprechender Konzentration mit DMSO behandelt, dem Lösungsmittel von UCF-101.

3.12.7 Färbung des mitochondrialen Membranpotentials

Apoptotische Zellen können mit dem kationischen Farbreagenz *Mito-Capture* des *Mitochondrial apoptosis Kits* der Fa. PromoKine detektiert werden. Die *Mito-Capture* Färbung ist eine modifizierte JC-1 Färbung. Das Prinzip dieser Färbung beruht auf unterschiedlichen Konformationen des Farbstoffs abhängig von dem elektrochemischen Milieus. Durch eine Konformationsänderung kann der Farbstoff aggregieren und dadurch ändert sich die Fluoreszenz. Der Farbstoff kann die Zell- und Mitochondrienmembran der Zellen passieren. Im Zytosol liegt er als grün-fluoreszierendes Monomer vor. In Mitochondrien mit unverändertem Membranpotential bildet *Mito-Capture* rot-fluoreszierende Aggregate. Zellen mit unverändertem mitochondrialen Membranpotential weisen sowohl grüne als auch rote Fluoreszenz auf, wogegen Zellen mit verändertem bzw. geschädigtem mitochondrialen Membranpotential nur grüne Fluoreszenz zeigen. Die monomere Form kann in einem FITC-Kanal (Ex/Em = 488/530 ± nm) und die aggregierte Form in einem Propidium-Iodid-Kanal visualisiert werden (Ex/Em = 488/590 ± nm).

Zur Durchführung der Färbung wurden ca. 10.000 Zellen auf PLL-beschichteten Deckgläsern (11 mm) in 6 cm-Kulturschalen ausplattiert und nach 1 h mit Medium bedeckt. Nach ca. 24 h wurden die Zellen für 5 h mit unterschiedlichen H₂O₂ Konzentrationen inkubiert. Die Färbung wurde nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Um ungelöste Partikel zu entfernen, wurden die Partikel für 1 min bei 13.000 g (RT) pelletiert und der Überstand in ein lichtundurchlässiges Reaktionsgefäß überführt. Die Färbelösung wurde erneut auf 37°C im Wasserbad erwärmt und jeweils 100 µl auf ein DG gegeben. Es erfolgte eine Inkubation von 15

min im Brutschrank bei 37°C. Anschließend wurden die Zellen vorsichtig mit Inkubationspuffer gewaschen. Die Zellen wurden nicht fixiert und die DG sofort auf einem Objektträger platziert und mikroskopisch ausgewertet.

3.12.8 MTT Assay

Zellen wurden ohne Mediumwechsel 2h nach Stresszugabe mit MTT-Lösung für 2 h inkubiert (0,5 mg/ml) für 2h. Anschließend wurden die Zellen (ohne Mediumabnahme) mit Solubilisierungspuffer im Verhältnis 1:1 für 12h lysiert. Der Nachweis erfolgte durch eine photometrische Messung bei 562 nm. Das Phenolrot des Mediums besitzt durch die saure Solubilisierungspuffer keinen Einfluss auf die Absorption. Der Messwert von MTT, Medium und Solubilisierungspuffer wurde als Nullwert definiert.

3.13 Molekularbiologie

3.13.1 Transformation

Für die Transformation der Plasmid-DNA wurden *E. coli* TOP10F Bakterien verwendet. 60 µl der Bakterien wurden mit 50 ng Plasmid-DNA vermischt und für 30 min. auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein 2-minütiger Hitzeschock bei 42°C. Es folgte eine Inkubation mit 1 ml LB-Medium bei 37°C für 30 min. und danach wurde die Bakteriensuspension auf LB-Platten (mit dem Plasmid entsprechendem Antibiotikum) ausplattiert. Die Selektion erfolgte über Nacht bei 37°C.

3.13.2 Isolierung der Plasmid-DNA

Zur Isolierung der Plasmid-DNA wurde 200ml LB-Medium (mit dem entsprechenden Antibiotikum) mit einer Einzelkolonie oder aus einem Glycerolstock angeimpft und über Nacht (37°C) kultiviert. Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte mit einem Kit der Firma Invitrogen nach den Angaben des Herstellers. Nach der Trocknung der Plasmid-DNA wurde das Pellet in Nuklease-freiem Wasser gelöst.

3.13.3 Restriktionsverdau

Restriktionsenzyme wurden von New England Biolabs bezogen. Der analytische Restriktionsverdau wurde nach Herstellerangaben mit dem entsprechenden Puffer, Nuklease-freiem H₂O und mit 1 µg Plasmid-DNA durchgeführt. Die Analyse erfolgte mit einer Agarose-Elektrophorese.

3.13.4 Konzentrationsbestimmung der Plasmid-DNA

Die Konzentrationsbestimmung der Plasmid-DNA erfolgte photometrisch mit dem Nano Drop. Als Nullwert wurde Nuklease-freies H₂O definiert. Der Reinheitsgrad der DNA wurde über das Verhältnis 260nm/280nm für RNA Verunreinigungen und über das Verhältnis zwischen 260nm/230nm für Verunreinigungen mit Kohlenhydraten, Salzen oder organischen Lösungsmitteln bestimmt. Der Reinheitsgrad lag ca. bei den erwünschten Werten von 1,8 und 2,2.

3.13.5 Yeast-Two-Hybrid Analyse

Die Experimente der Y2H-Analyse wurden von Judith Stegmüller durchgeführt und publiziert (Stegmüller, Werner et al. 2003). Die Details der Y2H-Analyse sind in Ihrer Dissertation ausführlich beschrieben (Ruprecht-Karls-Universität, Heidelberg 2002).

3.14 Proteinbiochemie

3.14.1 Zellyse

Alle Zellen wurden mit einem Triton-Lysispuffer (mit 30 mM n-octyl-glucoside) lysiert. N-octyl-glucoside wurde zusätzlich verwendet, da dieses Detergenz Membranproteine besonders gut lösen kann. Die Zellen wurden mit dem Lysispuffer (mit Proteaseinhibitoren) von den Kulturgefäßen gelöst (Zellschaber) und bei 4°C auf einem Rotor für 45 min. inkubiert. Anschließend wurde das Lysat bei 1000g für 10 min. zentrifugiert um die Kerne zu pelletieren. Zum weiteren Gebrauch wurden die Proben bei -80°C gelagert. Die Protein-Konzentrationsbestimmung erfolgte mit einem BCA-Test nach dem Protokoll des Herstellers.

3.14.2 Co-Immunpräzipitation

Mit einer Co-Immunpräzipitation lässt sich eine Interaktion zwischen zwei Proteinen darstellen. Dazu nutzt man die Bindung von Immunglobulinen an verschiedene Protein-Sepharose Verbindungen (Beads). In dieser Arbeit wurden verschiedene Strategien verwendet:

Immunglobulin	Beads
pcOMI Ak.	Protein-A-Sepharose
mcNG2 Ak.	CNBr-Activated-Sepharose
mcFLAG Ak.	Protein-G-Sepharose
Kaninchen-anti-Ziege-IgG (Kontrolle)	Protein-A-Sepharose

Tabelle 3-9: Co-Immunpräzipitationen mit verschiedenen Antikörpern

Vorbereitung und Kopplung der CNBr-Activated-Sepharose

Antikörper können über Aminogruppen kovalent an Zyanid-Brom-aktivierte Sepharose gekoppelt werden. Dazu wurden die „Beads“ zunächst in einer 1 M HCl-Lösung gewaschen und der mcNG2-Antikörper ü. N. bei 4°C auf einem Rotor in Kopplungs-Puffer (0,1 M NaHCO₃, 0,5 M NaCl, pH 8,3) an die „Beads“ gekoppelt. Die CNBr-Activated-Sepharose (0,7g) wurde mit 15,2 mg des mcNG2 Ak. kovalent gekoppelt. Anschließend wurde mit Kopplungspuffer gewaschen und unspezifische Bindungen mit Glycin (0,2 M in Kopplungs-Puffer) für 2 h bei RT blockiert. Nun erfolgte eine Reinigung der „Beads“ durch drei Waschzyklen mit alternierendem pH. Dazu wurde zunächst ein Acetat-Puffer (0,1 M, 0,5 M NaCl, pH 4) und anschließend ein Tris-Puffer (0,1 M, 0,5 M NaCl, pH 8) verwendet. Die Lagerung erfolgte in PBS bei 4°C.

Immunpräzipitation

Die Sepharose-Lösungen wurden nach den Angaben der Hersteller angesetzt. Für jeden Ansatz wurde 100 µl Sepharose-Lösung verwendet (ergibt ein reines „Bead-Volumen“ von ca. 50 µl). Die „Beads“ wurden 2x mit PBS gewaschen und die

Kopplung der Antikörper erfolgte auf einem Rotor über Nacht bei 4°C. Pro Ansatz wurde 1µg des Antikörpers verwendet (pcOMI- und mcFLAG-Antikörper). Nach der Antikörperbindung wurde 3x mit Lysispuffer gewaschen. Danach wurden die IPs mit den Lysaten (ca. 500 µg/Ansatz) über Nacht bei 4°C inkubiert und danach 3x mit Lysispuffer und 1x mit RIPA-Puffer gewaschen und das Pellet wurde in SB-Puffer (70 µl (2x)/Ansatz) gelöst und für 5 min. bei 90 °C gekocht. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -20°C.

3.14.3 SDS-Page, Westernblot und Immundetektion

SDS-Page ist eine Methode zur Auftrennung von Proteingemischen im elektrischen Feld. Hierbei bildet das Polyacrylamid ein netzartiges Polymer aus, welches die Proteine nach Größe langsamer oder schneller wandern lässt. Um die Proteinstrukturen aufzulösen, wurden die Proben mit 4x Probenpuffer 5 min. bei 90 °C gekocht. Durch das SDS und DTT im Probenpuffer wurde eine konstante Ladung an die Proteine angelagert und Disulfidbrücken gelöst. Die Elektrophorese erfolgte im Trenngel nach dem Lämmli-System mit einem überschichteten 4-prozentigen Sammelgel.

Substanz	8% Trenngel [ml]	12% Trenngel [ml]	Sammelgel [ml]
H ₂ O	4,6	3,3	6,8
30 % Acrylamid	2,7	4,0	1,7
1,5 M TRIS (pH 8)	2,5	2,5	1,25 (1 M TRIS pH 6,8)
10 % SDS	0,1	0,1	0,1
10 % APS	0,1	0,1	0,1
TEMED	0,006	0,004	0,01

Tabelle 3-10: Pipettierschema von Trenn- und Sammelgel für SDS-Page (modifiziert nach Harlow und Lane 1988)

Neben der Auftrennung mittels selbst hergestellten SDS-Polyacrylamidgelen wurde zusätzlich das NuPAGE-System der Fa. Invitrogen verwendet. Dabei wurden 4-12% Bis-Tris Gradientengele eingesetzt. Als Marker für die Proteingrößen wurde der Mark 12MW oder der Sea-Blue-Plus Prestained Marker verwendet.

Nach der Auftrennung der Proteine wurden die Proteine mittels Western-Blot (Wet-Blot) auf eine Membran übertragen. Dafür wurde eine PVDF-Membran kurz in Methanol aktiviert und in WB-Transferpuffer gewaschen. Die Blot-Kammer wurde mit kaltem (4°C) WB-Transferpuffer gefüllt und ein Kühlakku hinzugefügt, um die Kammer während des Transfers zu kühlen. Der Aufbau ist in Abbildung 3-3 zu entnehmen. Die Proteine wurden bei 30 Watt für 2h auf die Membran transferiert. Für den Nachweis der aktivierten-Caspase 3 (17 kDa), erfolgte der Transfer nach dem *Semi-dry*-Verfahren. Der Transfer der Proteine erfolgte bei 230 mA, 100V für 1,5 h.

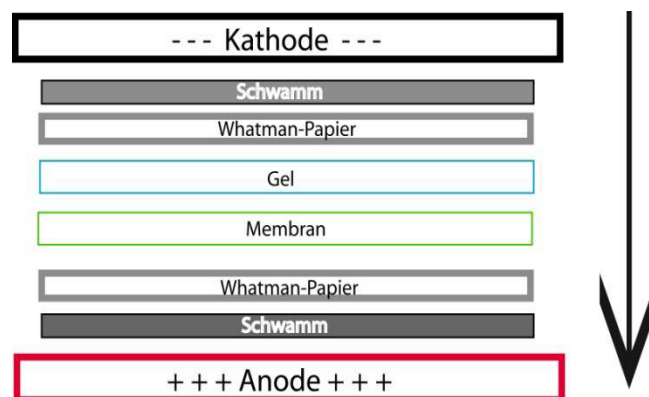


Abbildung 3-3: Schematischer Aufbau des Western-Blot Systems

Anschließend wurde die Membran für 1h in 4% Milchpulver-PBS-Lösung (Blockierlösung) bei RT auf einem Schüttler inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Der Primärantikörper wurde ebenfalls in 4% Blockierlösung verdünnt und entweder 2h bei RT oder bei 4°C ü. N. inkubiert. Es folgten 3-5 Waschschrte mit PBST. Der HRP-Sekundärantikörper wurde in PBST verdünnt und 45 min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgten erneut 3-5 Waschschrte mit PBST. Die markierten Proteine in der Membran wurden mit ECL-Lösung detektiert. Das in der ECL Lösung vorhandene Luminol wird durch die HRP

gespalten. Dies führt zu einer Lichtreaktion und damit zur Schwärzung der verwendeten Röntgenfilme.

3.14.4 Coomassie- und Silberfärbung

Die Coomassie- und Silberfärbung wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Jedoch wurde die Coomassie-Färbung ü. N. entwickelt und ü. N. entfärbt. Die Entwicklerlösung der Silberfärbung wurde für mindestens 15 min. inkubiert.

3.14.5 Immunzytochemische Färbungen

Bei der Färbung von Zellkulturen wurden die Zellen zuerst mit warmen (37°C) 1xPBS vorsichtig gewaschen und mit 4% Paraformaldehyd für 20 min fixiert. Zur Entfernung des Paraformaldehyds wurden die Zellen 3x mit PBS gewaschen. Befand sich das nachzuweisende Epitop intrazellulär, so wurden die Zellen mit 0,1% Triton in 1x PBS für 5 min permeabilisiert. War das Epitop extrazellulär lokalisiert, entfiel der Permeabilisierungsschritt. Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wurden die Zellen für 30-60 min in einer 10%HS in PBS inkubiert. Anschließend wurde der Primärantikörper in 10%HS in PBS verdünnt und auf die Zellen appliziert. Die Inkubationsdauer betrug 45-60 min. Es folgten vier Waschschrte mit 1xPBS. Danach wurde der Sekundärantikörper in 10%HS in PBS verdünnt und es erfolgte Inkubation von ca. 35 min. Es wurde erneut 4x gewaschen und die Zellkerne wurden durch eine 4-minütige Inkubation mit DAPI angefärbt. DAPI ist ein fluoreszierender Farbstoff der sich in die große Furche der DNA anlagert und daher als Nukleus-Marker dient. Es erfolgten erneut 3 Waschschrte, um überschüssiges DAPI zu entfernen. Danach wurden die Deckgläser mit Moviol auf einen Objektträger aufgebracht.

3.14.6 Immunhistochemische Färbungen

Zur Durchführung von immunhistochemischen Färbungen der Gehirnschnitte, wurden die Gehirne nach der Fixierung mit 4% PFA in Agarose gegossen (Low-Melt-Agarose). Die Schnitte wurden mit einem Vibratom durchgeführt. Die Schnittdicke

betrug 30 µm. Für die Färbung der aktivierten-Caspase 3 musste durch Inkubation mit einem Citratpuffer und Erhitzung das Epitop demaskiert werden. Die immunhistochemischen Färbung erfolgte in einer 24 Well-Platte und der Ablauf war wie folgt:

- Das Gewebe wurde mit 0,5% Triton in PBS permeabilisiert für 45 min. bei RT.
- Danach wurde mit 0,5% Triton, 10% NGS in PBS unspezifische Bindungsstellen blockiert.
- Die Inkubation der primären Antikörper erfolgte in 0,1% Triton, 10% NGS in PBS über Nacht.
- 3x waschen mit PBST
- In der aktivierten-Caspase-3 Färbung wurde der erste Antikörper (NG2 bzw. GFP) nochmals mit PFA fixiert (15 min). Anschließend wurde das Epitop (aktivierte- Caspase-3) mit Citratpuffer für 35 min bei 80 °C demaskiert und es erfolgte die Inkubation mit dem aktivierten-Caspase-3-Antikörper ü. N. bei 4°C.
- Inkubation des Sekundärantikörpers in 0,1% Triton, 10% NGS in PBS für 2 h bei RT.
- 3x waschen mit PBST
- Einbetten der Schnitte in Moviol

3.14.7 Zell-ELISA (Co-IP-Zell-ELISA)

Mit dieser konzipierten ELISA-Methode sollte getestet werden, ob unter oxidativem Stress OMI/HtrA2 an NG2 bindet. Die Bindung erfolgt hier nicht in einem Lysat, sondern in lebenden Zellen. Oli-neu Zellen werden über einen mcNG2-Antikörper an eine 96well-Platte gebunden und anschließend gestresst. Danach findet eine Zellyse statt und das co-immunpräzipitierte OMI/HtrA2 wird über einen pcOMI-Antikörper detektiert.

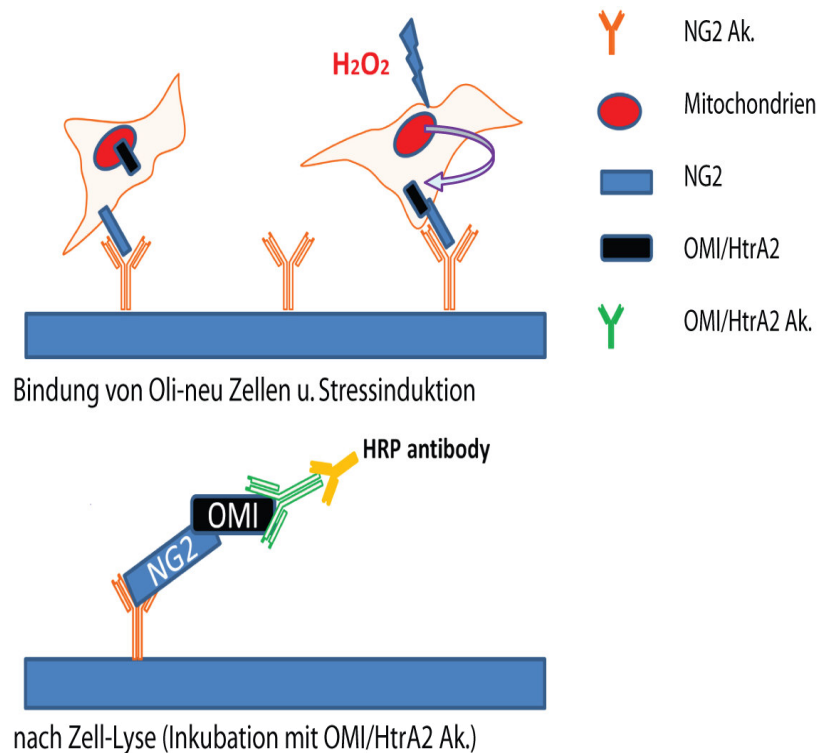


Abbildung 3-4: Schematische Darstellung des Zell-ELISA (Co-IP-Zell-ELISA)

Ablauf:

- Eine 96-well-Platte (NUNC Maxi-Sorp) wurde mit mcNG2-Antikörper (1/250, Volumen: 100µl) in PBS über Nacht bei 4°C inkubiert.
- Mit 0,2% Gelatine und 3% BSA in PBS (4°C ü. N. Volumen: 340µl) wurden unspezifische Bindungsstellen blockiert.
- Danach wurden Oli-neu Zellen in der 96-well-Platte ausplattiert (15000 Zellen/well)
- Die Zellen wurden für ca. 20 h kultiviert
- Ohne Mediumwechsel erfolgte dann die H_2O_2 -Zugabe für 4 h.
- Danach wurde das Medium vorsichtig abgesaugt und 100µl Lysis-Puffer zugegeben. Die Inkubation erfolgte für 45 min. auf einem Schüttler bei 4°C. Danach wurde 4-mal mit TBST gewaschen.

- Die Zugabe des pcOMI-Antikörpers erfolgte in TBST mit 3% BSA (1/4000) für 3 Stunden.
- Danach wurde 4-mal mit TBST gewaschen.
- Zugabe von 100 µl des Sekundär-Antikörper (anti-Kaninchen-HRP, 1/10000 in TBST) für 1h.
- Danach wurde 4-mal mit TBST gewaschen.
- Zugabe des TMB-Substrats (100µl) für ca. 40 min. und abstoppen der enzymatische Reaktion mit Schwefelsäure (2M, 100µl)
- Die photometrische Auswertung erfolgte an einem ELISA-Reader bei 450 nm.

3.14.8 Aufreinigung von Proteinen über den HIS-Tag

Von den, mit den NG2del-HIS-Plasmiden transfizierten, HEK293T Zellen wurden Lysate hergestellt. Dies erfolgte ca. 30 h nach der Transfektion. In dieser Zeit wurden die Zellen mit 4 µM Na-But behandelt, um die Expression zu steigern. Die sechs Histidin Aminosäuren des TAGs haben aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen eine hohe Affinität zu Nickelverbindungen. Die Aufreinigung erfolgte nach dem IMAC Verfahren mit einem HIS-Select-Nickel-Affinity-Gel. Bei diesem Gel sind die Nickelatome an Agarose gebunden und so immobilisiert. Das Eluieren der gebundenen Proteine erfolgt über einen Austausch mit Imidazol, das durch seinen chemischen Charakter eine höhere Affinität als die Histidinreste besitzt. Das Gel (1ml/Säule) wurde in eine Chromatographie Säule gefüllt. Der Ablauf der Aufreinigung war wie folgt:

- Die Säule wurde zuerst mit ddH₂O gespült.
- Mit dreifachem Gelvolumen wurde dann mit Waschpuffer nochmals gespült.
- Danach wurde das Lysat der transfizierten HEK293T Zellen geladen. Hierbei wurde keine Pumpe benutzt, damit die Durchflussmenge pro Stunde nicht das 10-fache Gelvolumen überschreitet (Empfehlung des Herstellers).

- Danach wurden die geladenen Säulen mit vielfachem des Gelvolumens mit Waschpuffer gespült. Es wurde so lange gespült bis die OD des Waschpuffers in etwa gleich der OD des gesammelten Durchflusses war.
- Dann wurden die gebundenen Proteine durch spülen mit dem Elutionspuffer von den Nickelatomen gelöst, in Fraktionen gesammelt und die Konzentration photometrisch bestimmt. Der Nachweis der Fusionsproteine erfolgte mittels WB-Analyse.

3.14.9 Protease Assay

Der Einfluss der Interaktion zwischen dem NG2-Protein und Omi/HtrA2 auf die Proteaseaktivität von Omi/HtrA2 wurde mittels eines konzipierten Protease-Assay überprüft, indem die Spaltung von β -Casein untersucht wurde. β -Casein wird von OMI/HtrA2 proteolytisch abgebaut und kann daher einen Indikator für die Proteaseaktivität von OMI/HtrA2 darstellen.

Ansatz A (Aufreinigung von OMI/HtrA2-FLAG)

- HEK293T Zellen wurden mittels Elektroporation oder PEI mit dem OMI/HtrA2-FLAG-Plasmid transfiziert.
- Zellen wurden ca. 48 h nach der Transfektion mit 4 mM NaBut kultiviert und anschließend lysiert.
- Nach dem Pelletieren der Kerne wurde mit dem mc-FLAG-Antikörper, gebunden an Sepharose, OMI/HtrA2-FLAG immunpräzipitiert (siehe Kap. 3.14.2).

Ansatz B (Aufreinigung von NG2del-HIS)

- HEK293T Zellen wurden mittels Elektroporation oder PEI mit den NG2del-Plasmiden (NG2del+ und NG2del-) transfiziert.
- Zellen wurden ca. 48 h nach der Transfektion mit 4 mM NaBut kultiviert und anschließend lysiert.
- Die Aufreinigung erfolgte über den HIS-Tag (Kap. 3.14.8).

- Nach der Aufreinigung wurden die Proteinlösungen mit PBS verdünnt (1:6) um die Imidazol-Konzentration des Elutionspuffer auf 40 mM zu reduzieren.

Die OMI/HtrA2-Immunpräzitationen wurden mit den aufgereinigten NG2del-Proteinen (NG2del+ bzw. NG2del-) inkubiert (Ansatz A mit Ansatz B). Die einzelnen Immunpräzitationen von OMI/HtrA2 wurden mit ca. 15 µg NG2del-Proteinen inkubiert. Als Kontrolle diente Elutionspuffer mit 40 mM Imidazol, der mit der OMI/HtrA2-Immunpräzitation inkubiert wurde. Die Inkubation erfolgte ü. N. bei 4°C. Danach wurden die Immunpräzitationen 5-mal mit Lysispuffer gewaschen. Anschließend wurde β-Casein zugegeben (0,09 µg/µL β-Casein in PBS, absolute Proteinmenge pro Ansatz= 45 µg) und für 5 h bei 37°C inkubiert. Danach wurde der Überstand abgenommen, um die Degradation von β-Casein durch Gelelektrophorese und Silberfärbung zu analysieren. Die Immunpräzitationen wurden gewaschen und in SB-Puffer gelöst und gekocht. Die Immunpräzitation und die co-immunpräzitierten Proteine wurden mittels WB analysiert.

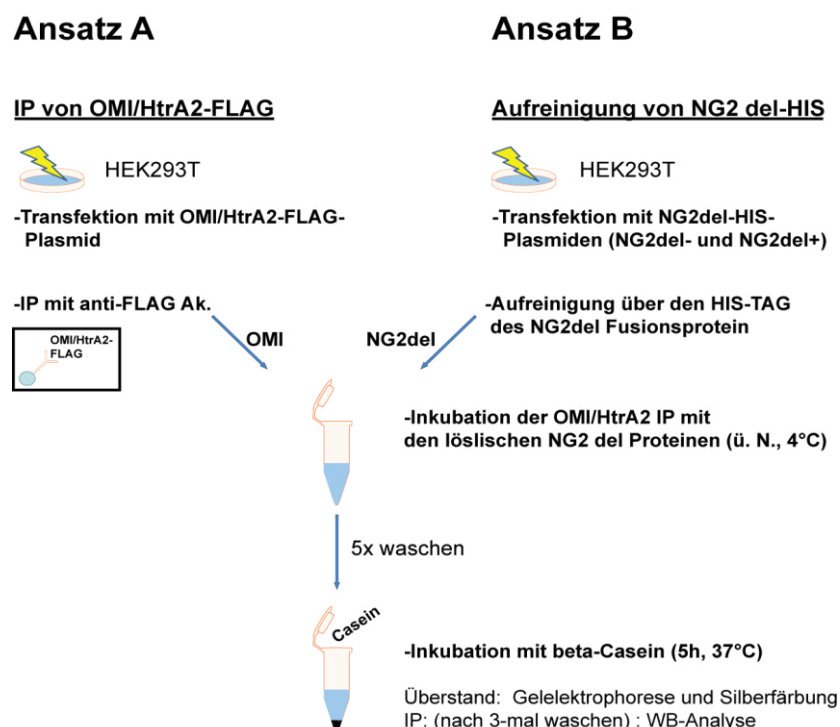


Abbildung 3-5: Schematische Darstellung des Protease Assay

3.14.10 Mikroskopie

Immunfluoreszenzfärbungen wurden mit dem Leica DMLB Fluoreszenzmikroskop oder mit dem Leica DM-6000 Dekonvolutions-Fluoreszenzmikroskop aufgenommen. Bei vergleichenden Aufnahmen wurden identische Belichtungszeiten gewählt. Je nach Fluorchrom wurden unterschiedliche Filter gewählt. Die anschließende Bearbeitung erfolgte mit Photoshop-CS2.

3.15 Datenanalyse

3.15.1 Quantifizierung

Zur Quantifizierung der ProteinKonzentrationen wurden die entwickelten Röntgenfilme der Western-Blots eingescannt und mit dem Softwareprogramm ImageJ-1.43u ausgewertet. Die Normalisierung erfolgte gegen Tubulin der entsprechenden Proben.

3.15.2 Statistik

Die angegebenen Fehlerbalken stellen die Standardabweichung des Mittelwerts da (SEM, Standard Error of the mean). Zur Darstellung der Signifikanz wurde ein t-Test (zweiseitig, gepaart) durchgeführt. Die graphische Darstellung der Signifikanz war wie folgt: $p < 0,05 = *$, $p < 0,01 = **$ und $p < 0,001 = ***$.

3.15.3 Software

Hersteller	Programm
Microsoft	Word 2007, Excel 2007
Adobe	Illustrator CS2, Photoshop CS2
NIH	ImageJ-1.43u
Wintertree Software Inc.	Endnote X6

4 Ergebnisse

4.1 Ist die mitochondriale Serinprotease OMI/HtrA2 ein Interaktionspartner von NG2?

In der Dissertation von Judith Stegmüller stellte sich die Frage, welche Bindungspartner mit dem NG2-Proteoglykan intrazellulär interagieren können. Bekannt war, dass MUPP1, ein Ankerprotein für integrale Membranproteine mit dreizehn PDZ-Domänen, an NG2 bindet (Barritt, Pearn et al. 2000). Am C-terminalen Ende besitzt NG2 die Aminosäuresequenz QYWV*. Durch die Lage dieser Sequenz an einem C-terminalen Ende und dem chemischen Charakter, vor allem Valin als endständige Aminosäure, kann diese Sequenz ein PDZ-Bindemotiv darstellen. Um weitere intrazelluläre Bindungspartner zu identifizieren, wurde eine Yeast-Two-Hybrid Analyse (Y2H) mit einer Gehirn-spezifischen Bibliothek durchgeführt. Neben GRIP und Syntenin-1 konnte auch die mitochondriale Serinprotease OMI/HtrA2 als Bindungspartner identifiziert werden. Die Bindung jedoch konnte in nur zwei unabhängigen Klonen nachgewiesen werden.

In dieser Arbeit sollten die Ergebnisse der Y2H-Analyse verifiziert und die Frage erörtert werden, welche physiologischen Funktionen diese mögliche Interaktion zwischen NG2 und OMI/HtrA2 auf NG2-positive OPC ausübt.

4.1.1 Die Y2H-Analyse identifiziert OMI/HtrA2 als möglichen Bindungspartner von NG2

Als ein möglicher Interaktionspartner von NG2 wurde die mitochondriale Serinprotease OMI/HtrA2 in einer Y2H-Analyse getestet. Um die Bindung näher zu charakterisieren, wurden die Positionen 0 bis -3, die ein Teil des PDZ-Bindemotivs von NG2 darstellen, jeweils zu Glycin mutiert. Die gesamte C-terminale Aminosäuresequenz (Position 0 bis Position 75) von NG2 wurde in der Y2H-Analyse als Köder- oder „Bait“-Protein verwendet. Als Beute oder „Prey“ wurde eine Plasmidbibliothek (cDNA) aus postnatalem Gehirn (Maus) gewählt. Die isolierten

Plasmide aus der Hefe wurden in Bakterien transformiert und mit der Datenbank BLAST verglichen.





	-Trp -Leu	β -Gal- Expression	-Trp -Leu -His
NG2 wt (QYWV*)	+		+
NG2 0G (QYW G *)	+	-	-
NG2 -1G (QY G V*)	+	-	-
NG2 -2G (Q G WV*)	+		+
NG2 -3G (G YWV*)	+		+
NG2 -2F (Q F WV*)	+		+
NG2 -2F0G (Q F W G *)	+	-	-

Abbildung 4-1: Charakterisierung der Interaktion zwischen NG2 und OMI/HtrA2 mittels Y2H-Analyse

Hefen wurden mit verschiedenen NG2-Konstrukten mit Mutationen im PDZ-Bindemotiv und der Serinprotease OMI/HtrA2 transformiert. Anschließend wurde auf die Expression der β -Galaktosidase getestet und auf dreifachem Mangelmedium selektioniert (Judith Stegmüller 2002).

Mit der Aminosäuresequenz von dem intrazellulären Teil von NG2 konnte gezeigt werden, dass durch die Interaktion mit OMI/HtrA2 der Transkriptionsfaktor GAL-4 aktiv ist und dadurch eine β -Galaktosidase Expression nachgewiesen werden konnte. Durch Mutationen an verschiedenen Stellen des PDZ-Bindemotivs von NG2 sollte dann die Bindung näher charakterisiert werden. Hierbei wurden die verschiedenen Aminosäuren durch Glycin ersetzt. Wenn an Position 0 Valin oder an Position -1 Tryptophan ausgetauscht wurden, fand keine β -Galaktosidase Expression statt. Die Mutationsanalyse zeigt, dass diese Aminosäuren an Position 0 und -1 für die Bindung von OMI/HtrA2 an NG2 essentiell sind. Auch Zhang et al. zeigten, dass diese Aminosäuren und ihre Position dominant für Bindungspartner von OMI/HtrA2 sind (Zhang, Appleton et al. 2007). Mutationen an Position -2 und -3 zu Glycin zeigten keinen Einfluss auf die β -Galaktosidase Expression. Auch eine Mutation an Position -3 zu Phenylalanin zeigte keinen Einfluss.

4.1.2 Co-Immunpräzitationen bestätigen die Resultate der Y2H-Analyse

In einer Y2H-Analyse kann ein sogenanntes „falsch positiv“ Ergebnis entstehen, d.h. dass z. B. im chemischen Milieu des Hefe-Zellkerns, in dem die Interaktion der zu untersuchenden Proteine stattfindet, die Struktur dieser Proteine verändert ist und eine artifizielle Affinität oder Bindung entsteht. Um die Interaktion von NG2 und OMI/HtrA2 mit biochemischen Methoden zu untersuchen, wurde die Oli-neu Zelllinie verwendet. In Oli-neu Zellen wird sowohl NG2 als auch OMI/HtrA2 endogen exprimiert. Zur Darstellung der Interaktion wurden Immunpräzitationen (IP) von NG2 und OMI/HtrA2 mit anschließendem WB-Nachweis des Interaktionspartners durchgeführt. Außerdem wurde mit einem transfizierten und exprimierten OMI/HtrA2-FLAG Fusionsprotein die Spezifität des pcOMI/HtrA2-Antikörper getestet, da auch das Fusionsprotein in einer NG2-IP co-immunpräzitiert wird und dann mit einem FLAG-Antikörper nachweisbar sein sollte.

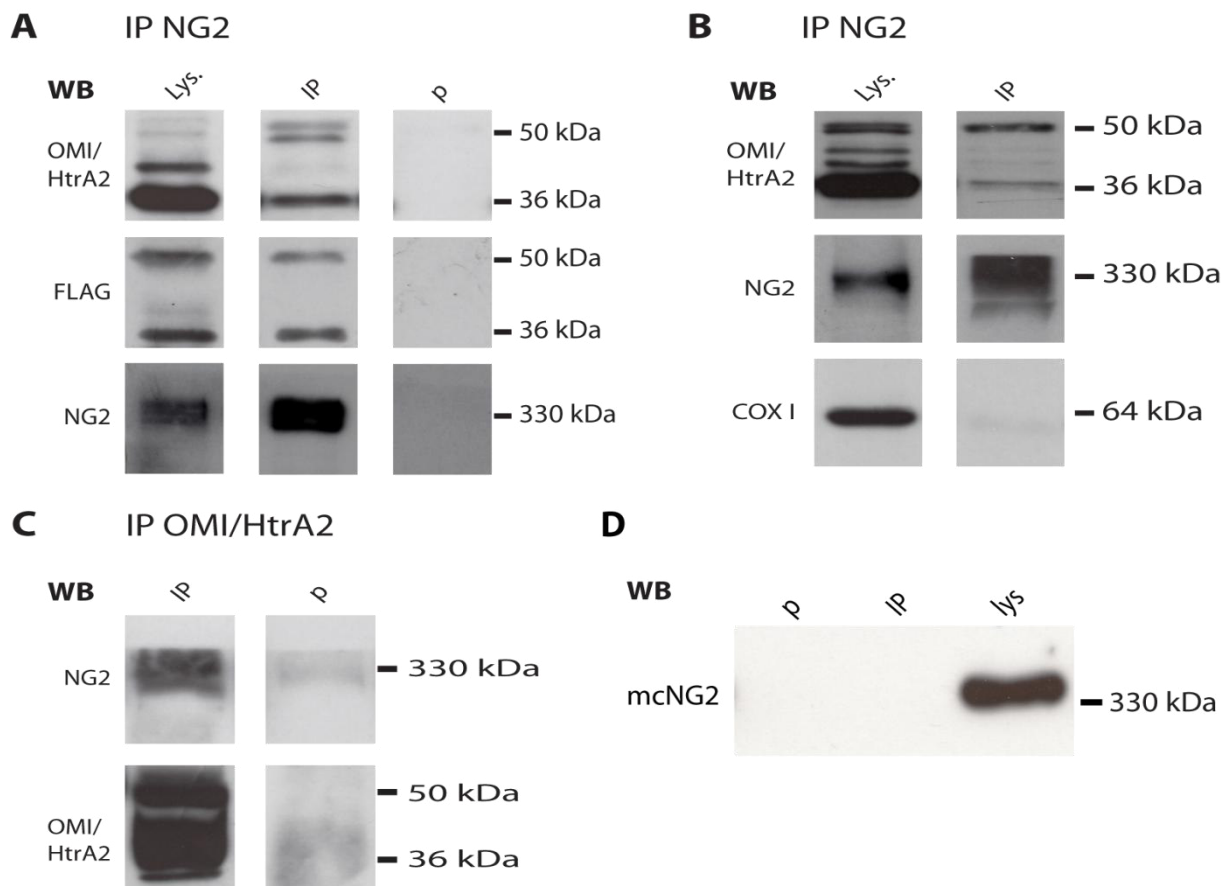


Abbildung 4-2: Immunpräzitationen mit Oli-neu Zelllysaten bestätigen die Interaktion

Immunpräzipitationen der Proteine NG2 (A,B) und OMI/HtrA2 (C). Die co-immunpräzipitierten Bindungspartner wurden mittels spezifischer Antikörper im WB nachgewiesen.

A) Oli-neu Zellen transfiziert mit OMI/HtrA2-FLAG und Immunpräzipitation mit mcNG2-Antikörper. Nachweis des co-immunpräzipitierten endogenen OMI/HtrA2 Protein mit einem pcOMI-Antikörper und des co-immunpräzipitierten Fusionsproteins OMI/HtrA2-FLAG mit einem mcFLAG-Antikörper. Sowohl das prozessierte Protein (36 kDa) als auch die unprozessierte Form (50 kDa) u.a. mit der MLS (Mitochondrial-Translocation-Signal) Sequenz konnten nachgewiesen werden. Die Immunpräzipitation von NG2 wurde mit mcNG2-Antikörper kontrolliert. Die Kontrolle (p) zeigte keine unspezifische Bindung an die Sepharose-Beads. B) Lysat von Oli-neu Zellen immunpräzipitiert mit mcNG2-Antikörper. Nachweis des co-immunpräzipitierten endogenen OMI/HtrA2 mit pcOMI-Antikörper. Negativ Kontrolle mit COX1-Antikörper zeigt, dass keine mitochondrialen Membrankomplexe an das NG2-Protein binden. Die Immunpräzipitation von NG2 wurde mit dem mcNG2-Antikörper kontrolliert. C) Lysat von Oli-neu Zellen immunpräzipitiert mit pcOMI-Antikörper. Nachweis des co-immunpräzipitierten endogenen NG2 Protein mit dem mcNG2-Antikörper. Die IgG-Kontrolle (D) mit einem Kaninchen-anti-Ziege-IgG-Antikörper zeigt keine unspezifisch bindenden Proteine.

Lys: Lysat vor IP, p: Kontrolle für unspezifische Bindung an Sepharose-Beads (Perclear), IP: Immunpräzipitation

Oli-neu Zellen wurden mit einem OMI/HtrA2-FLAG Konstrukt transfiziert (Abbildung 4-2 A). Die Immunpräzipitation von NG2 wurde im WB mit einem NG2-Antikörper überprüft. Sowohl co-immunpräzipitiertes endogenes OMI/HtrA2 konnte mit dem pcOMI/HtrA2-Antikörper nachgewiesen werden als auch das transfizierte OMI/HtrA2-FLAG Fusionsprotein mit einem FLAG-Antikörper. Die unprozessierte Form von OMI/HtrA2 (u. a. noch mit einem Mitochondrien-Translokation-Motiv) hat eine Größe von 50 kDa während das prozessierte Protein eine Größe von 36 kDa zeigt. Der pcOMI/HtrA2-Antikörper erkennt sowohl das endogene Protein als auch das Fusionsprotein, wobei die unprozessierten Formen eine deutlichere Trennung der Banden zwischen Fusions- und endogenem Protein zeigen. Im Lysat ist noch eine Bande zwischen 36 kDa und 50 kDa sichtbar, die allerdings in der IP nicht mehr nachweisbar ist. Hierbei könnte es sich um eine unspezifische Detektion des Antikörpers handeln, da diese Bande mit dem mcFLAG-Antikörper nicht nachweisbar ist. In der Sepharose-Kontrolle sind keine unspezifischen Banden nachweisbar. Um auszuschließen, dass die Überexpression von OMI/HtrA2 die Bindung zu NG2 beeinflusst, wurde in einer IP mit untransfizierten Oli-neu Zellen, endogenes OMI/HtrA2 co-immunpräzipitiert (Abbildung 4-2 B). Hier wurde verstärkt die

unprozessierte Form von OMI/HtrA2 nachgewiesen. Um zu überprüfen, ob größere mitochondriale Membrankomplexe an das NG2-Protein binden, ohne dass eine direkte Bindung zwischen NG2 und der Serinprotease OMI/HtrA2 besteht, wurde die IP im WB mit einem COX1-Antikörper kontrolliert. COX1 ist eine Untereinheit der Cytochrom-c-Oxidase und ist in der inneren mitochondrialen Membran lokalisiert. Die IP von NG2 enthielt kein COX1-Protein. Die Interaktion zwischen NG2 und OMI/HtrA2 wurde anschließend durch eine Immunpräzipitation von OMI/HtrA2 und WB-Analyse von co-immunpräzipitiertem NG2 bestätigt (Abbildung 4-2 C). Auch hier zeigt die Kontrolle keine unspezifischen Bindungen. Die IgG-Kontrolle (Abbildung 4-2 D) zeigt keine unspezifische Bindung von NG2 an Kaninchen-IgG-Antikörper.

Mit verschiedenen IP-Strategien konnte somit die Bindung zwischen OMI/HtrA2 und NG2 in Zelllysaten bestätigt werden. Allgemein war die Bandenstärke der co-immunpräzipitierten Proteine eher gering gegenüber den WB-Signalen der Lysate. Eine WB-Analyse mit einem Antikörper gegen GRIP in der Immunpräzipitation von NG2 zeigte, dass dieser Interaktionspartner von NG2 detektiert werden konnte (Daten nicht gezeigt). So könnten verschiedene Proteine mit PDZ-Domänen um die Bindung zu NG2 konkurrieren.

4.2 Unter oxidativem Stress bindet OMI/HtrA2 an NG2 in lebenden Zellen

Die Co-Immunpräzipitationen bestätigten die Resultate der Y2H-Analyse. Allerdings wird durch das Lysieren der Oli-neu Zellen eine nicht-physiologische Situation erzeugt. So kann in einem Zelllysate eine mitochondriale Protease mit einem Plasmamembran-Protein in Kontakt treten. Eine Voraussetzung für die Interaktion sollte eine Translokation von OMI/HtrA2 in das Zytosol sein. Um zu zeigen, dass die Bindung von OMI/HtrA2 an NG2 in lebenden Zellen in Abhängigkeit von der Freisetzung aus den Mitochondrien erfolgt, wurde oxidativer Stress durch H₂O₂ simuliert. Durch oxidativen Stress und die Einleitung der Apoptose wird die Mitochondrienmembran permeabilisiert und OMI/HtrA2 in das Zytosol translokalisiert (van Loo, van Gorp et al. 2002). Hierbei sollte zuerst mit einer modifizierten JC-1 Färbung (*Mito-Capture*) gezeigt werden, dass unter den gewählten Konzentrationen

an H_2O_2 , die Mitochondrien ihr Membranpotential verlieren und somit die mitochondriale Membran für OMI/HtrA2 durchlässig wird. *Mito-Capture* ist ein Farbstoff, der nur in den Mitochondrien mit einem intakten Membranpotential aggregieren kann und daher als Indikator für eine intakte Mitochondrienmembran dient. Die Färbungen in (Abbildung 4-3D) zeigen, dass mit zunehmender H_2O_2 Konzentration die Aggregation des Farbstoffs (in Rot) in einer intakten mitochondrialen Membran abnimmt. Bei $150 \mu\text{M}$ H_2O_2 ist keine rote Färbung in den Oli-neu Zellen zu erkennen. Dieses spricht für einen kompletten Zusammenbruch des Membranpotentials. Die veränderte Morphologie (Durchlicht-Aufnahmen) dieser Zellen, ist ein Zeichen für eine fortgeschrittene Apoptose bzw. Nekrose. Allerdings tritt bei geringeren Konzentrationen ($25 \mu\text{M}$ und $75 \mu\text{M}$) auch eine Reduktion der roten Färbung ein. Die Abnahme ist allerdings nicht zwischen unterschiedlichen Zellen als „alles oder nichts Situation“ zu beobachten, sondern innerhalb jeder individuellen Zelle nimmt die rote Färbung ab. Dieses spricht für einen heterogenen Zusammenbruch des Membranpotentials innerhalb der Mitochondrienpopulation einer Zelle. Bei $25 \mu\text{M}$ H_2O_2 konnte über einen längeren Zeitraum (12 h) morphologisch kein Absterben der Zellen beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

Ob unter diesen oxidativen Stressbedingungen OMI/HtrA2 aus den Mitochondrien translokalisiert wird und an das NG2 Protein bindet, wurde in einem eigens entwickelten Zell-ELISA getestet (Co-IP-Zell-ELISA). Dabei werden Oli-neu Zellen mit einem NG2-Antikörper an eine ELISA-Platte gebunden und anschließend mit H_2O_2 gestresst. Dabei wird idealerweise OMI/HtrA2 aus den Mitochondrien freigesetzt und bindet an das NG2-Protein. Anschließend werden die Zellen lysiert und das an NG2 und die ELISA-Platte gebundene OMI/HtrA2 wird durch einen OMI-Antikörper detektiert. Die quantitative Darstellung erfolgt durch einen Enzymgekoppelten Sekundärantikörper (HRP). Die gemessenen Werte ohne H_2O_2 -Inkubation wurden als Referenz (0%) definiert, so dass OMI/HtrA2, welches während der Zelllyse an NG2 bindet, nicht dargestellt wird.

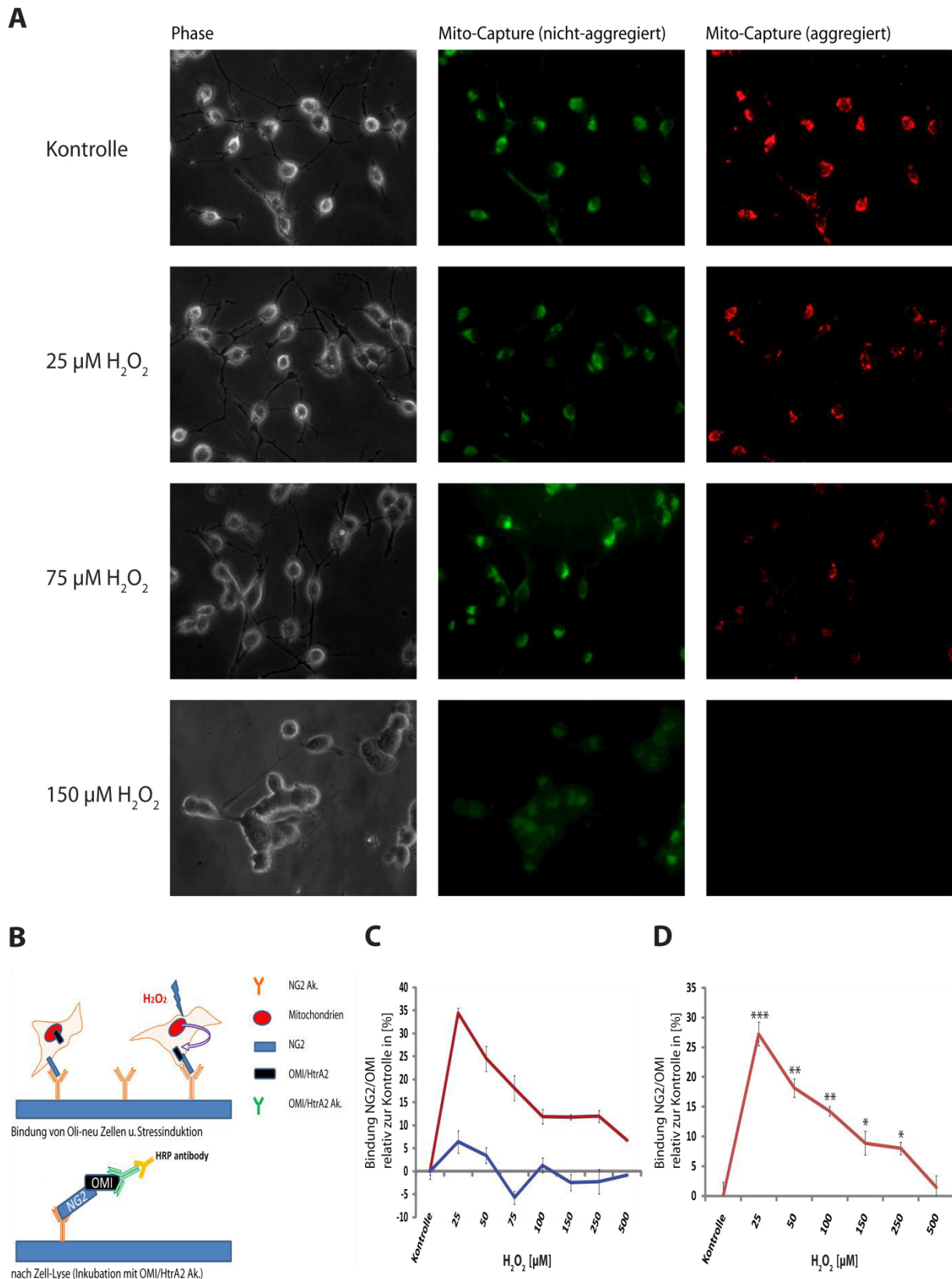


Abbildung 4-3: Auswirkung verschiedener H_2O_2 -Konzentrationen auf das Transmembranpotential von Mitochondrien (A) und die Bindung von OMI/HtrA2 an NG2 in lebenden Oli-neu Zellen nach oxidativem Stress (B-D)

A) Oli-neu Zellen wurden mit aufsteigender Konzentration an H_2O_2 für 4 h inkubiert und anschließend mit *Mito-Capture* gefärbt. Die Durchlicht-Aufnahmen (links) zeigen eine Veränderung der Morphologie mit zunehmender H_2O_2 -Konzentration. Der Farbstoff kann innerhalb der Mitochondrien mit einem intaktem Transmembranpotential aggregieren (in rot), während die monomere Form u.a. im Zytosol grün fluoresziert (Mitte). Die mit 25 μM und mit 75 μM H_2O_2 gestressten Zellen zeigen eine schwache bis mittlere Reduktion an aggregiertem Farbstoff, während die mit 150 μM H_2O_2 behandelten Oli-neu Zellen kaum Mitochondrien mit intaktem Transmembranpotential aufweisen. Außerdem ist eine deutliche Veränderung der Morphologie zu erkennen (Vergrößerung 40x). B) Schematische Darstellung der Zell-ELISA Methode. Oli-neu Zellen werden durch den mcNG2-Antikörper gebunden und kultiviert. Nach oxidativem Stress werden die Zellen lysiert und es erfolgt die Detektion von NG2-gebundenem OMI/HtrA2. Nicht-gestresste Zellen dienen als Kontrolle und wurden als Referenz definiert. C) Kolorimetrische Auswertung des Zell-ELISA. Analyse der optischen Dichte des über den HRP-Antikörper umgesetzten TMB Substrats. Der gesteigerte Umsatz des Substrats bei gestressten Zellen wurde in Relation zur Kontrolle dargestellt. Eine Kontrolle ohne den mcNG2-Antikörper (blaue Linie) zeigt keine erhöhten Messwerte mit zunehmendem Stress. Eine repräsentative Messung mit dem mcNG2-Antikörper (rote Linie) zeigt die Bindung unter oxidativem Stress von OMI/HtrA2 an NG2. D) Mittelwerte aus 3 verschiedenen Experimenten mit mcNG2-Antikörper [n=3, SEM, gepaarter T-Test].

Die Ergebnisse zeigen, dass im Bereich von 25 μM bis zu 250 μM H_2O_2 OMI/HtrA2 an NG2 bindet, nachweisbar durch die Zunahme der OD gegenüber der Kontrolle ohne H_2O_2 . Das stärkste Bindungssignal wurde mit 25 μM H_2O_2 gemessen. Mit dieser Konzentration ist eine Zunahme der OD von ca. 35 % zu beobachten. Allerdings besteht bis 100 μM eine deutliche Signifikanz ($p < 0,01$) gegenüber der nicht gestressten Kontrolle. Das Abfallen der OD mit höheren Konzentrationen ist damit erklärbar, dass der nekrotische Zelltod zunimmt und die Zellen sich im Medium auflösen. Ein Vergleich mit der *Mito-Capture* Färbung zeigt, dass mit 150 μM H_2O_2 auch die grüne Färbung des Zytosols abnimmt. Dies ist ein Hinweis, dass sich die Zytoplasmamembran auflöst. Die Sekundär-Antikörper-Kontrolle zeigte keine signifikant erhöhten Signale (Abbildung 4-3 B: blaue Linie). So kann ausgeschlossen werden, dass sich durch die Oxidation von Proteinen größere Proteinaggregate bilden, die unspezifisch von dem pcOMI-Antikörper detektiert werden.

In der Zusammenfassung der Resultate von drei unabhängigen Analysesystemen (Y2H-Screen, CoIPs und dem Zell-ELISA) konnte die Bindung von OMI/HtrA2 an NG2 nachgewiesen werden. In den folgenden Experimenten sollte die zelluläre Funktion dieser Interaktion genauer charakterisiert werden.

4.3 NG2 ist kein Substrat der Serinprotease OMI/HtrA2

Da OMI/HtrA2 unterschiedliche Substrate proteolytisch prozessiert, wie z. B. Zytoskelettelemente, Translationsfaktoren und verschiedene Proteine innerhalb des apoptotischen Vorgangs (Vande Walle, Van Damme et al. 2007), so könnte auch NG2 durch die Serinprotease prozessiert werden. Um zu testen, ob NG2 ein Substrat von OMI/HtrA2 ist, wurde ein Protease-Assay entwickelt. Ein OMI/HtrA2-FLAG-Konstrukt wurde in HEK293T-Zellen exprimiert und anschließend über eine IP mit einem mcFLAG-Antikörper aufgereinigt. Als Kontrolle für die IP wurden die Sepharose-Beads ohne Antikörper verwendet. Ob das präzipitierte Fusionsprotein proteolytisch aktiv ist, wurde mit dem OMI/HtrA2-Substrat β -Casein getestet. Endogenes NG2 wurde aus Oli-neu Lysat mit mcNG2-Antikörper präzipitiert. Das Epitop für diesen Antikörper liegt im extrazellulären Teil von NG2, so dass keine sterische Hinderung im Verdau zu erwarten war. Danach wurden die beiden IPs zusammengeführt und bei 37°C für 5h inkubiert. Die mögliche Degradation von NG2 wurde mittels WB-Analyse untersucht.

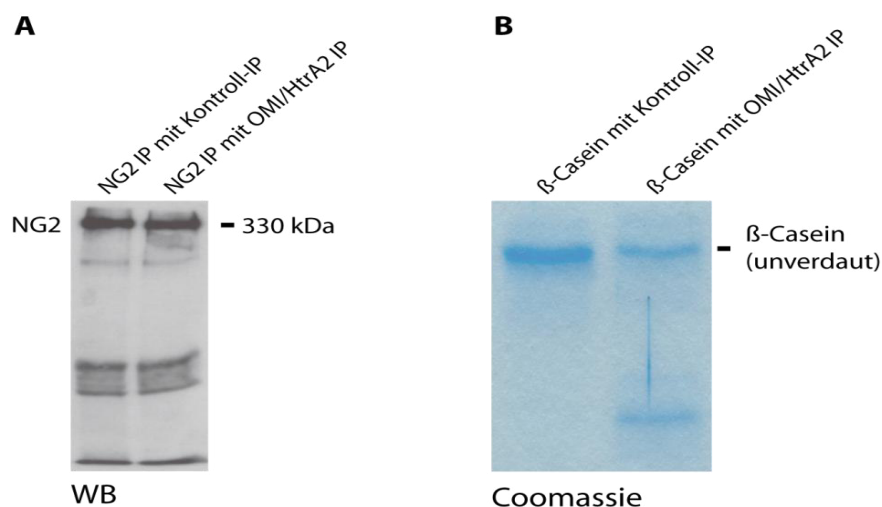


Abbildung 4-4: NG2 wird von OMI/HtrA2 nicht proteolytisch prozessiert

A) Inkubation von immunpräzipitierten OMI/HtrA2-FLAG mit immunpräzipitierten NG2 im Vergleich zur Kontroll-IP ohne OMI/HtrA2 (Sepharose-Beads). Die WB-Analyse mit mcNG2-Antikörper zeigt keine Unterschiede in der Degradation des NG2-Proteins. B) Nachweis der Proteaseaktivität des immunpräzipitierten OMI/HtrA2-FLAG mit β -Casein. Gelelektrophorese mit anschließender Coomassie-Färbung.

Die Inkubation der OMI/HtrA2-FLAG-IP mit dem Substrat β -Casein zeigte, dass die präzipitierte OMI-Protease in der IP aktiv ist, während bei Inkubation mit der Kontroll-IP keine Degradation von β -Casein zu beobachten ist (Abbildung 4-4 B). Der Vergleich zwischen der Inkubation der NG2-IP mit der OMI/HtrA2-FLAG-IP bzw. der Kontroll-IP zeigt keinen Unterschied in der WB-Analyse mit dem mcNG2-Antikörper. Dies ist ein Indiz, dass NG2 kein Substrat von OMI/HtrA2 ist, da sonst eine Reduktion der Bandenstärke bei 330 kDa zu erwarten wäre. Durch sterische Störungen der Sepharose-Beads könnte der Verdau allerdings beeinflusst sein. Dies konnte mit einem löslichen NG2-Fusionsprotein widerlegt werden (siehe Kap. 4.7). Die zusätzlichen Banden können unspezifische Bindungen des Antikörpers darstellen oder es kam während der Inkubation bei 37°C zu einem Zerfall des NG2-Proteins.

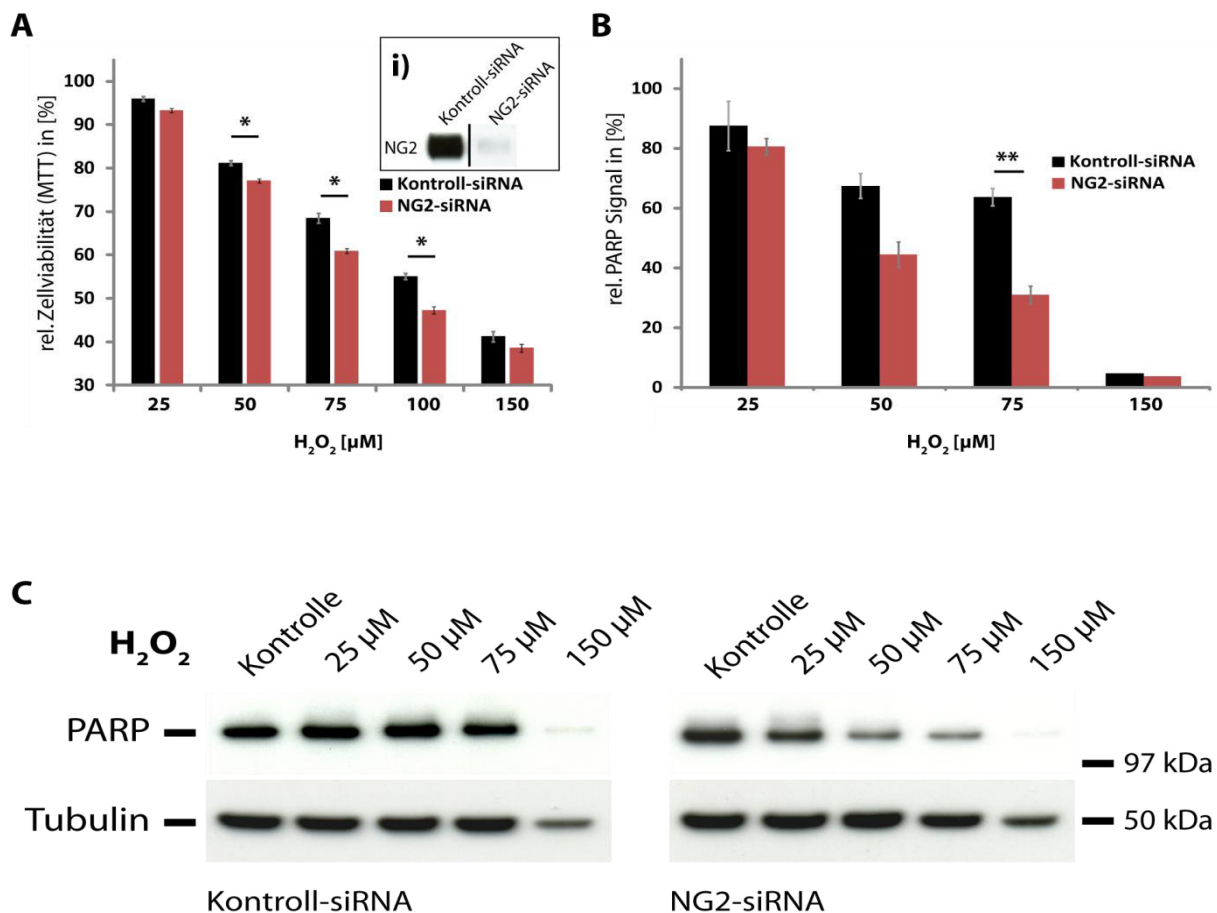
4.4 Das NG2 Protein besitzt einen protektiven Effekt unter oxidativem Stress

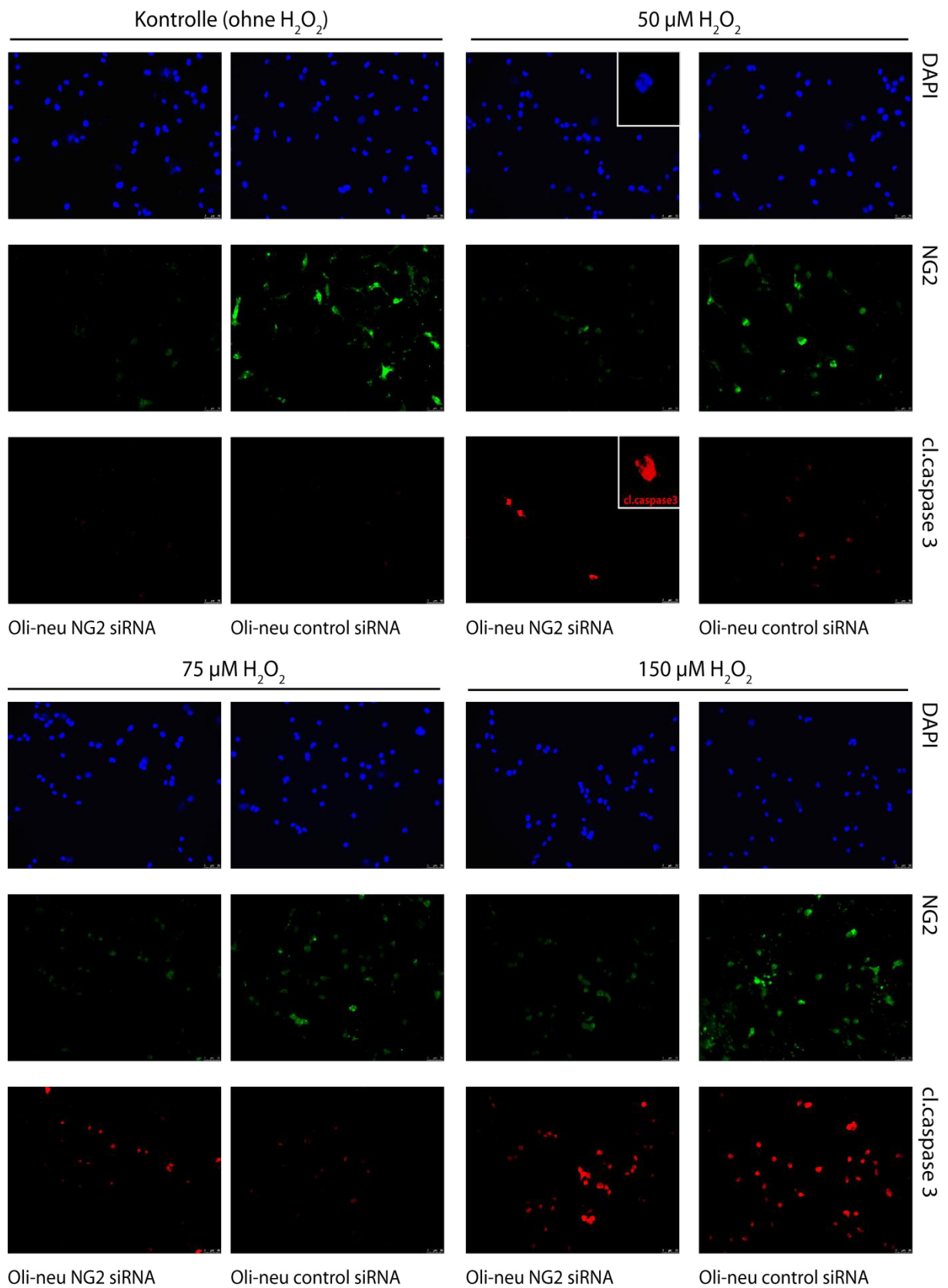
4.4.1 siRNA-Knockdown von NG2 erhöht die Apoptoserate unter oxidativem Stress

Möglicherweise bindet OMI/HtrA2 unter oxidativem Stress nach Freisetzung aus den Mitochondrien an das NG2-Protein an der Zytoplasmamembran. Hierbei stellt sich die Frage, welche physiologische Funktion die Interaktion in der Zelle ausführt. Da OMI/HtrA2 im Zytoplasma eine proapoptotische Funktion besitzt (Yang, Church-Hajduk et al. 2003), kann die Interaktion mit NG2 durchaus die Zellviabilität beeinflussen. In Gliomazellen konnte gezeigt werden, dass NG2 eine protektive Funktion besitzt (Chekenya, Krakstad et al. 2008). Um dies in einer oligodendrogialen Vorläufer-Zelllinie zu überprüfen, wurden Oli-neu Zellen mit NG2-siRNA und Kontroll-siRNA transfiziert. Nach der Inkubation mit H_2O_2 für 4 h wurden die Zellen mithilfe eines MTT-Assays untersucht. MTT ist ein wasserlösliches Tetrazoliumsalz, welches von Zellen zu Formazan reduziert wird. Die enzymatische Reduktion erfolgt unter anderem durch die Succinat-Dehydrogenase oder auch durch die Reduktionsäquivalente NADH und NADPH. Durch Messung der Reduktions-

äquivalente lässt sich eine Aussage über die Glykolyse bzw. Zellatmungsrate und damit allgemein über die Zellviabilität treffen.

Simultan zum MTT-Test wurden die Zellen auf Apoptosemerkmale untersucht. Dazu wurden Zelllysate angefertigt und mittels WB-Analyse auf die Degradation von PARP (Poly-ADP-Ribose-Polymerase) untersucht. PARP ist im Nukleus lokalisiert und agiert als ein DNA-Reparaturenzym bei DNA-Einzelstrangbrüchen. Während der Einleitung des apoptotischen Zelltods wird PARP durch Caspasen, z. B. durch die aktive-Caspase-3 proteolytisch prozessiert und inaktiviert. Dadurch kann die Degradation von PARP als Apoptosemarker verwendet werden (Lazebnik, Kaufmann et al. 1994). Weiterhin wurden Oli-neu Zellen auf Deckgläsern mit Antikörper gegen die aktivierte-Caspase-3 gefärbt.



D**Abbildung 4-5: NG2-Knockdown führt zur Reduktion der Zellviabilität**

A) MTT-Assay mit Oli-neu Zellen transfiziert mit NG2-siRNA bzw. Kontroll-siRNA nach H₂O₂-Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen (x-Achse) für 4 h in Relation zu nicht-gestressten Kontrollen (MTT-Umsatz der Kontrolle=100%) [n=7, SEM, gepaarter t-Test]. WB-Analyse der Zelllysate (Ausschnitt i) zeigt die Knockdown-Effizienz der NG2-siRNA nach 24 h in Oli-neu Zellen. B) Densitometrische Quantifizierung der PARP-Degradation in Oli-neu Zelllysaten (PARP normalisiert gegen Tubulin). Inkubation mit unterschiedlichen H₂O₂ Konzentrationen (x-Achse) erfolgte über 4 h. [n=4, SEM, gepaarter t-Test]. C) WB-Analyse zur Darstellung der Degradation von PARP eines repräsentativen Experiments. Tubulin dient als Ladekontrolle. D) Oli-neu Zellen mit NG2-siRNA und Kontroll-siRNA transfiziert. Immunzytochemische Färbung mit Antikörpern gegen NG2, aktivierte-Caspase-3 als Marker für den Apoptosevorgang und DAPI als Marker für den Nukleus (Vergrößerung 20x). Die Zellen wurden für 4 h mit verschiedenen Konzentrationen an H₂O₂ behandelt und im Anschluss gefärbt.

Der MTT-Viabilitätstest zeigte, dass NG2-siRNA transfizierte Zellen nach oxidativem Stress im Bereich zwischen 50 µM und 100 µM H₂O₂ eine niedrigere Viabilität im Vergleich zur Kontrolle aufweisen. Der signifikante Unterschied beträgt bei 50 µM H₂O₂ 4% (p=0,049), mit 75µM H₂O₂ 7,5% (p=0,047) und mit 100µM H₂O₂ 7,8% (p=0,017). Bei 150 µM H₂O₂ ist die Viabilität in beiden Ansätzen gleich stark reduziert. In den Durchlicht-Aufnahmen sind bei dieser Konzentration an H₂O₂, nur noch stark abgekugelte Zellen erkennbar (Daten nicht gezeigt). Der Vergleich mit den Ergebnissen aus der *Mito-Capture* Färbung (Abbildung 4-3 A) zeigt, dass unter diesen Bedingungen das komplette Membranpotential der Mitochondrienpopulation zerstört wird. Dies spricht für eine fortgeschrittene Apoptose oder Nekrose, so dass der, bei geringeren H₂O₂ Konzentrationen beobachtete, protektive Effekt des NG2-Proteins aufgehoben wird. Bei 25 µM H₂O₂ scheinen die Stressbedingungen noch nicht auszureichen, um Schädigungen in signifikantem Maße zu induzieren. Der MTT-Umsatz im Vergleich zur Kontrolle ist daher nur geringfügig reduziert (5-7%). Ein geringer Unterschied zwischen Kontroll-siRNA und NG2-siRNA ist zwar zu erkennen, jedoch statistisch nicht gesichert. Die WB-Analysen zeigten, dass unter oxidativem Stress eine Abnahme des PARP-Signals zu beobachten ist. Im Bereich in dem der MTT-Test eine geringere Viabilität der NG2-siRNA behandelten Zellen zeigt, kann auch eine signifikant vermehrte Degradation von PARP festgestellt werden. Zellen die mit NG2-siRNA transfiziert wurden, zeigten mit 50 µM H₂O₂ (-22,9%; p=0,1) und 75 µM H₂O₂ (-32,7%; p=0,005) ein deutlich reduziertes PARP-Signal. Dies ist ein Indiz, dass in Kontroll-Zellen die Apoptoserate geringer oder weniger weit

fortgeschritten ist als in den Oli-neu Zellen, die mit NG2-siRNA transfiziert wurden. Vergleichbar mit den Resultaten des MTT-Assays ist die PARP-Degradation mit 25 μM H_2O_2 in beiden Versuchsansätzen zwar leicht reduziert, aber ohne signifikantem Unterschied zwischen den beiden Ansätzen. Mit 150 μM H_2O_2 war das PARP-Protein kaum noch oder gar nicht mehr zu detektieren, so dass eine Normalisierung gegen Tubulin nicht möglich war. So wurde mit 150 μM H_2O_2 nur ein einzelnes Experiment dargestellt.

Ob die Reduktion der Viabilität gegenüber der Kontrolle abhängig von der Apoptose ist, sollte auch durch den Nachweis der aktivierten-Caspase-3 erfolgen. Jedoch konnte im WB kein eindeutiges Signal detektiert werden. Daher wurden Zellen immunzytochemisch mit einem aktivierten-Caspase-3-Antikörper gefärbt, um den apoptotischen Zelltod nachzuweisen. In ungestressten Zellen konnte immunzytochemisch keine aktivierte-Caspase-3 nachgewiesen werden. So sollte der Knockdown von NG2 auch keinen direkten Einfluss auf die Apoptoserate besitzen. Bei 50 μM H_2O_2 zeigte sich in den Knockdown-Kulturen eine Subpopulation an Zellen, die stark positiv für die aktivierte-Caspase-3 sind, während in den Kontroll-Kulturen dies nicht zu beobachten war. Auch bei 75 μM H_2O_2 ist ein verstärktes Signal der aktivierten-Caspase-3 in den Knockdown-Kulturen festzustellen. Dies steht im Einklang mit den WB-Analysen des PARP-Proteins, da die aktivierte-Caspase-3 PARP degradiert. In der NG2-Färbung (grün) wurde die Knockdown-Effizienz der NG2-siRNA überprüft. Die DAPI-Färbung zeigt, dass teilweise diejenigen Zellen die ein hohes Level an aktivierter-Caspase-3 zeigen, einen pyknotischen Zellkern besitzen (Abbildung 4-5 D Box). Dies ist ein Zeichen für die Fragmentierung der DNA während des apoptotischen Zelltods.

4.4.2 Unter oxidativem Stress zeigen NG2-positive-HEK Zellen erhöhte Zellviabilität

Um die Ergebnisse aus (4.4.1) in einer Zelllinie zu bestätigen, die kein endogenes NG2 exprimiert, wurden HEK293T-Zellen mit zwei verschiedenen NG2-Konstrukten, die sich im PDZ-Bindemotiv unterscheiden, transfiziert. Zum einen NG2del+ mit dem intakten PDZ-Bindemotiv und zum anderen NG2del-, indem das Bindemotiv deletiert wurde. So sollte eine Interaktion von OMI/HtrA2 nur mit dem NG2del+ Konstrukt möglich sein. Beide Konstrukte exprimieren den kompletten intrazellulären Teil des

NG2-Proteins (bis auf den Unterschied im PDZ-Bindemotiv). Der extrazelluläre Teil ist in beiden Konstrukten identisch, aber stark verkürzt (Schematische Darstellung in C). Um die Detektion der exprimierten Proteine zu ermöglichen, besitzen beide Konstrukte einen FLAG-Tag (Details siehe Anhang). Bei beiden Konstrukten sollte kein Unterschied in der Aktivierung von $\alpha 3\beta 1$ -Integrin bestehen, da der extrazelluläre Teil beider Konstrukte identisch ist. Die Aktivierung der β -Untereinheit von $\alpha 3\beta 1$ -Integrin resultiert in einer verringerten Apoptoserate in Gliomazellen über den PI3K/AKT-Weg und ist von der extrazellulären Signaltransduktion über NG2 abhängig (Chekenya, Krakstad et al. 2008). Da $\alpha 3\beta 1$ -Integrin keine PDZ-Domäne besitzt (UniProt-Datenbank), sollte auch durch eine mögliche intrazelluläre Aktivierung der β -Untereinheit kein Unterschied zwischen den beiden Konstrukten bestehen. So kann ausgeschlossen werden, dass dieser Signalweg Auswirkungen auf die Zellviabilität der transfizierten HEK293T-Zellen ausübt.

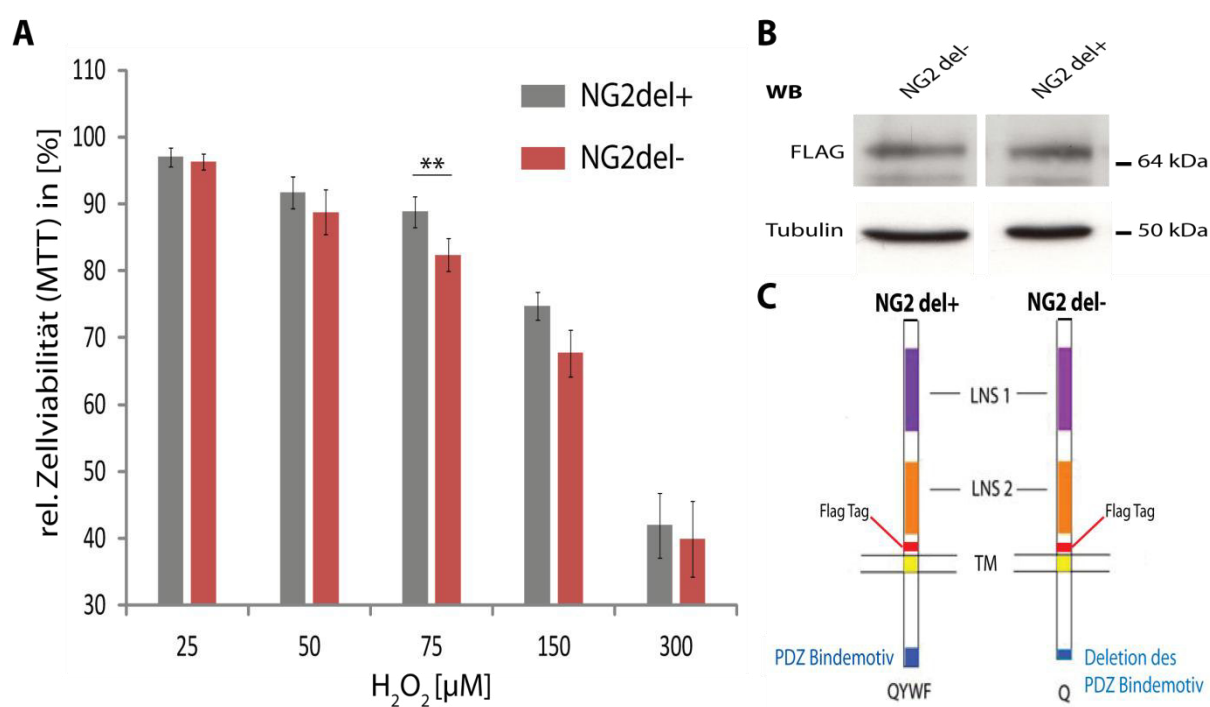


Abbildung 4-6: Protektiver Einfluss des PDZ-Bindemotivs von NG2 auf HEK293T-Zellen unter oxidativem Stress

A) MTT-Assay mit HEK293T transfiziert mit FLAG-NG2del- (ohne PDZ-Bindemotiv) und FLAG-NG2del+ (mit PDZ-Bindemotiv). Die Zellen wurden 48 h nach der Transfektion für 4 h mit H₂O₂ gestresst. Der MTT-Umsatz wurde in Relation zur jeweiligen nicht-gestressten Kontrolle (100%)

bezogen [n=3; SEM; gepaarter t-Test]. B) WB mit FLAG-Antikörper zur Detektion der FLAG-NG2del Fusionsproteine und Tubulin als Ladekontrolle zeigen annähernd gleiche Expression von NG2del- und NG2del+ in den HEK293T-Zellen. C) Schema der NG2del-Fusionsproteine.

Der MTT-Viabilitätstest zeigt, dass die mit NG2del- transfizierten HEK293T-Zellen eine geringere Viabilität besitzen. Die Reduktion zu den mit NG2del+ transfizierten Zellen betrug bei 75 μM H_2O_2 6,5% ($p=0,003$) und bei 150 μM H_2O_2 7,1%. Bei 25 μM H_2O_2 und bei 300 μM H_2O_2 sind die Messwerte annähernd gleich. Generell ist der Kurvenverlauf mit dem NG2-Knockdown in Oli-neu Zellen vergleichbar. Die Absolutwerte im MTT-Umsatz zwischen den einzelnen Experimenten waren sehr unterschiedlich, was sich in der Größe des SEM widerspiegelt. In einer Zellfärbung konnte gezeigt werden, dass die beiden NG2del-Proteine in der Zytoplasmamembran lokalisiert sind. Allerdings lag die Transfektionseffizienz nur bei zirka 40-50% (nicht gezeigt). Dies hat zur Folge, dass die untransfizierten Zellen den Unterschied im MTT-Umsatz zwischen den beiden Konstrukten relativieren. In Abbildung 4-6 B wurde mittels WB-Analyse gezeigt, dass das Expressionslevel der beiden NG2del-Konstrukte annähernd gleich war. Daher ist auszuschließen, dass der Unterschied im MTT-Umsatz, auf unterschiedliche Expressionslevel der beiden Konstrukte zurückzuführen ist. Die erhöhte Zellviabilität mit dem NG2del+ Konstrukt könnte ein Indiz sein, dass die Interaktion von OMI/HtrA2 und NG2 protektiv ist.

4.5 NG2-Knockout OPC zeigen in gemischten Kulturen verstärkte Apoptose

Um die Ergebnisse der siRNA-Versuche mit Oli-neu Zellen und der mit NG2 transfizierten HEK293T-Zellen auf primäre Zellen zu übertragen, wurden gemischte Cerebellum Kulturen angelegt. Da in diesen Kulturen neben OPC auch reife Oligodendrozyten, Neurone und Astrozyten wachsen, ist dies ein physiologisch relevanteres System als es isolierte Zellkulturen darstellen. So stellen z. B. Astrozyten anderen Zellen des ZNS Vorstufen zur Synthese von Antioxidantien zur Verfügung (Dringen, Pfeiffer et al. 1999). Gemischte Cerebellum Kulturen wurden aus Wildtyp und NG2-Knockout Mäusen (P8) präpariert. Der NG2-Knockout wurde durch ein EYFP-Knock-in in den NG2-Locus generiert, daher sind die Knockout-OPC

gleichzeitig mit EYFP markiert und folglich visualisierbar (Karram, Goebbels et al. 2008). In Vorversuchen zeigten WB-Analysen von Wildtyp-Cerebellum Kulturen erst ab 800 μM H_2O_2 eine leichte Abnahme des NG2-Signals und damit ein Absterben der OPC, so dass für den Vergleich zwischen Wildtyp und NG2-Knockout eine Konzentration von 800 μM H_2O_2 gewählt wurde (Daten nicht gezeigt). Der Grund hierfür sind die in den Cerebellum Kulturen vorhandenen Astrozyten. Astrozyten sind in der Lage das Medium in kürzester Zeit von Wasserstoffperoxid zu bereinigen, ohne dabei selbst zellulären Schaden zu nehmen (Liddell, Robinson et al. 2010). Außerdem sollte in den gemischten Cerebellum Kulturen getestet werden, wie die unterschiedlichen Zelltypen auf oxidativen Stress reagieren. Dazu wurden Zelltyp-spezifische Marker verwendet. In den WB-Analysen wurden Wildtyp-OPC anhand von NG2 und die OPC in NG2-Knockout Kulturen anhand des EYFP Proteins (GFP-Antikörper) quantifiziert. Astrozyten wurden mittels GFAP, Oligodendrozyten mittels ASPA und Neurone mittels der γ -Enolase erfasst.

Um auszuschließen, dass gestresste Knockout-OPC sich eventuell schneller von dem Kulturgefäß lösen als die Wildtyp-OPC, aufgrund der fehlenden Adhäsionseigenschaften des NG2-Proteoglykans, wurde kein Mediumwechsel unternommen. Wobei die Aktivität von H_2O_2 nur in den ersten Stunden im Medium vorhanden ist (Liddell, Robinson et al. 2010). Die Inkubationszeit von 18 h wurde gewählt, um auszuschließen, dass im apoptotischen Vorgang GFP eventuell schneller abgebaut wird als NG2. So sollte nach der gewählten Inkubationszeit die Apoptose in den Kulturen abgeschlossen sein. Nach dieser Zeit konnte auch keine aktivierte-Caspase-3 mehr nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

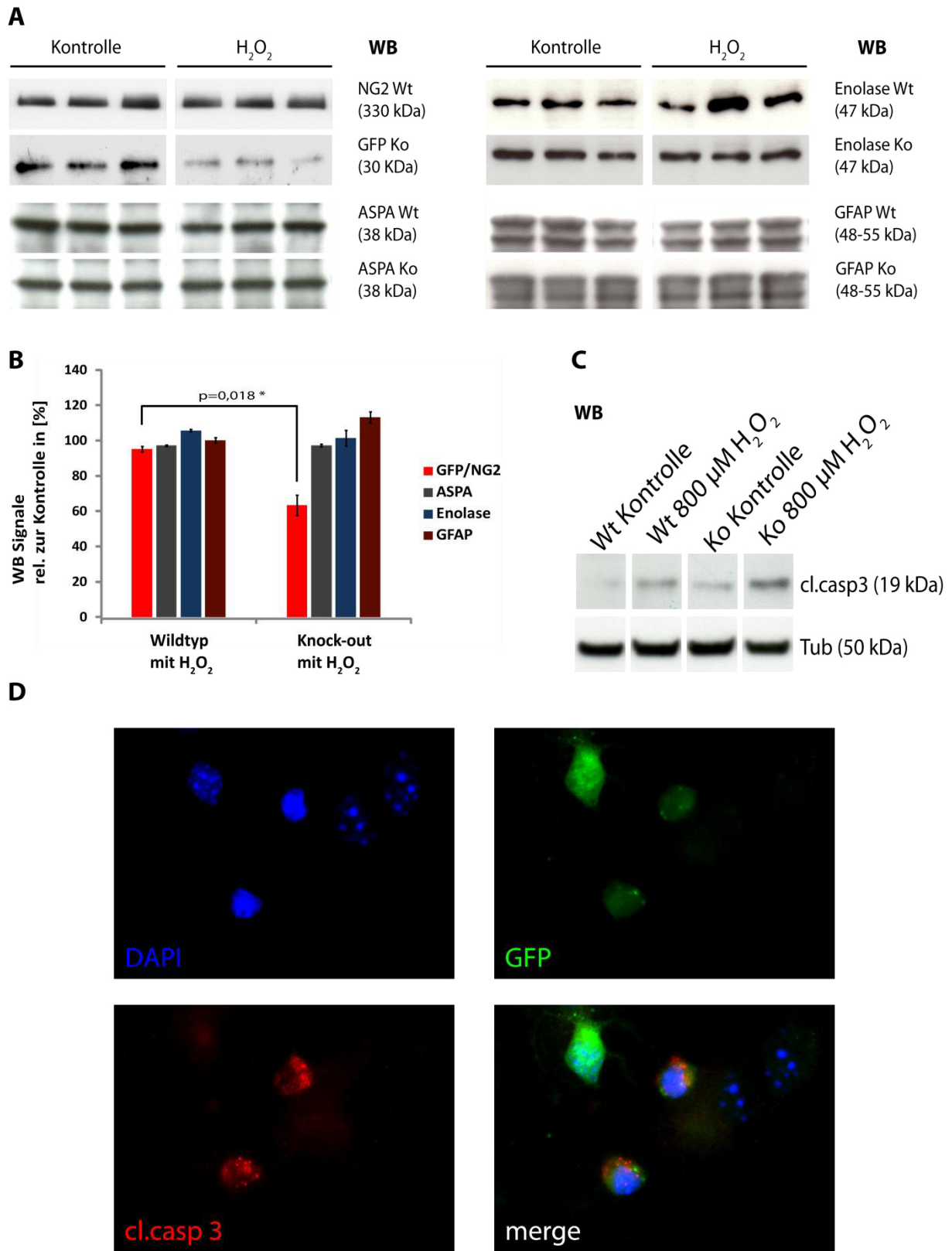


Abbildung 4-7: Auswirkung von oxidativem Stress auf verschiedene Zelltypen der Cerebellum Kulturen aus Wildtyp- und NG2-Knockout Mäusen

Die gemischten Cerebellum Kulturen aus Wildtyp- und NG2-Knockout Mäusen wurden 18 h nach Auslösen von oxidativem Stress durch H₂O₂ Inkubation (800 µM) mittels WB analysiert. Der Nachweis der verschiedenen Zelltypen erfolgte mit folgenden Antikörpern: OPC mit NG2 (Wildtyp) bzw. GFP (NG2-Knockout), reife Oligodendrozyten mit ASPA, Neurone mit γ -Enolase und Astrozyten mit GFAP. Die WB-Analysen in (A) zeigen die Lysate von einer Präparation mit 3 Replikaten als repräsentatives Beispiel. Der GFP-Antikörper detektiert EYFP-positive OPC in NG2-Knockout Kulturen. B) Densitometrische Analyse verschiedener Zelltypen innerhalb der Cerebellum Kulturen. Die Zelltyp-spezifischen Signale wurden gegen Tubulin normalisiert und zur jeweiligen nicht-gestressten Kontrolle (=100%) in Relation gesetzt [n=3, SEM, gepaarter t-Test]. In (C) wurden die Kulturen für 5 h mit H₂O₂ inkubiert, um die aktivierte-Caspase-3 in dem apoptotischen Vorgang zu detektieren. Der Nachweis erfolgte im WB mit einem Antikörper der die aktivierte-Caspase-3 spezifisch erkennt. Tubulin diente als Ladekontrolle. D) Zusätzlich wurden NG2-Knockout Kulturen angefärbt, um zu zeigen, dass die erhöhte Aktivität der aktivierten-Caspase-3 hauptsächlich den OPC zugeordnet werden kann. Als Marker für die OPC wurde der GFP-Antikörper und für den Zellkern DAPI verwendet (Vergrößerung: 40x).

In den Cerebellum Kulturen von postnatalen Wildtyp-Mäusen (P8) konnte mit den Zelltyp-spezifischen Markern keine oder nur eine sehr geringe Reduktion der Signale in den WB-Analysen beobachtet werden, d.h. dass in diesen Zellkulturen kaum Zelltod nach Inkubation mit H₂O₂ bzw. oxidativem Stress auftrat. In den oligodendroglialen Zellen (OPC und Oligodendrozyten) ist das NG2 bzw. ASPA Signal um 5% schwächer als in den Kontroll-Kulturen, allerdings ist dieser Unterschied nicht signifikant. In den Knockout Kulturen dagegen, ist eine signifikante Reduktion des GFP-Signals um ca. 36,7% gegenüber den nicht gestressten Kulturen zu beobachten. Dies spricht für einen verstärkten Zelltod innerhalb der NG2-Knockout-OPC Population. Das ASPA-Signal für reife Oligodendrozyten entspricht der Wildtyp-Situation. Neurone werden in beiden Kulturen durch den oxidativen Stress nicht beeinflusst, da keine Reduktion des Neuronen-spezifischen Enzyms γ -Enolase registriert werden konnte. In den Knockout-Kulturen konnte nach oxidativem Stress ein Anstieg des GFAP-Signals registriert werden. Der Unterschied zur Kontrolle ist zwar nicht signifikant (p=0,09), aber der Anstieg könnte in Zusammenhang mit Astrozyten stehen, die reaktiv werden. Eine Erhöhung des GFAP-Signals in den Wildtyp-Kulturen ist dagegen nicht zu beobachten. Um zu zeigen, dass in den Knockout-Kulturen der verstärkte OPC-Tod durch eine gesteigerte Apoptoserate ausgelöst wird, wurde auch eine Zellfärbung mit einem Antikörper gegen die aktivierte-Caspase-3 durchgeführt. Allerdings konnte keine

aktivierte-Caspase-3 nachgewiesen werden, da 18 h nach H₂O₂ Zugabe die Apoptose wahrscheinlich abgeschlossen ist. Anders war die Situation, wenn die Kulturen für 5 h mit H₂O₂ inkubiert wurden. Hier konnte ein verstärktes aktivierte-Caspase-3-Signal in den NG2-Knockout-Kulturen detektiert werden. Immunzytochemische Färbungen zeigten, dass dieses verstärkte Signal aus apoptotischen OPC hervorgeht, während in den Wildtyp-Kulturen keine Aktivierung der Caspase 3 festgestellt werden konnte (Wildtyp-Situation nicht gezeigt).

4.6 Die verstärkte Apoptose in NG2-Knockout-Kulturen korreliert mit OMI/HtrA2

Die zuvor dargestellten Ergebnisse dieser Arbeit zeigten die stressbedingte Freisetzung von OMI/HtrA2 aus den Mitochondrien und dessen Bindung an NG2. Ob der verstärkte Zelltod in den NG2-Knockout-Kulturen OMI/HtrA2 abhängig ist und eventuell auch von dessen Interaktion mit NG2, sollte mit einem spezifischen OMI/HtrA2-Inhibitor (Cilenti, Lee et al. 2003) untersucht werden. Falls diese Interaktion protektiv für die OPC ist, so sollte der vermehrte Zelltod in den Knockout-Kulturen mit diesem Inhibitor reduziert oder verhindert werden. Hierbei sollten die Kulturen 18 h nach Stressinduktion mit H₂O₂ untersucht werden, so dass wirklich das Überleben der OPC analysiert wird und nicht etwa ein verlangsamter Ablauf der Apoptose durch die Inhibition von OMI/HtrA2. Allerdings löst der spezifische OMI/HtrA2-Inhibitor auch einen Effekt auf die Stressantwort der Zellen aus (Klupsch and Downward 2006). In dieser Publikation wurden die Effekte mit 20 µM und 50 µM UCF-101 nachgewiesen, daher sollte eine geringere Konzentration an UCF-101 in den Experimenten eingesetzt werden. Die dadurch entstehenden Effekte auf die Stressantwort und die Nebeneffekte wurden in einem einzelnen Experiment mit 10 µM UCF-101 in der Oli-neu Zelllinie getestet (Abbildung 4-8). Die Reaktion der OPC von Wildtyp- und Knockout-Kulturen auf den Inhibitor unter oxidativen Stressbedingungen wurde mittels WB-Analyse von Zelllysaten dargestellt. Dabei wurden OPC mit JAM-A und mit NG2 bzw. GFP nachgewiesen. JAM-A (Junctional-Adhesion-Molecule-A) ist ein Protein, das z. B. von Epithel- und Endothelzellen exprimiert wird, aber auch von hämatopoetischen Stammzellen. Im ZNS sind es die

NG2-positiven Gliazellen, die dieses Protein exprimieren (Stelzer, Ebnet et al. 2010). In Cerebellum Kulturen existiert eine kleine Population an NG2-positiven Zellen, die nicht JAM-A positiv sind (Abbildung 4-9 C).

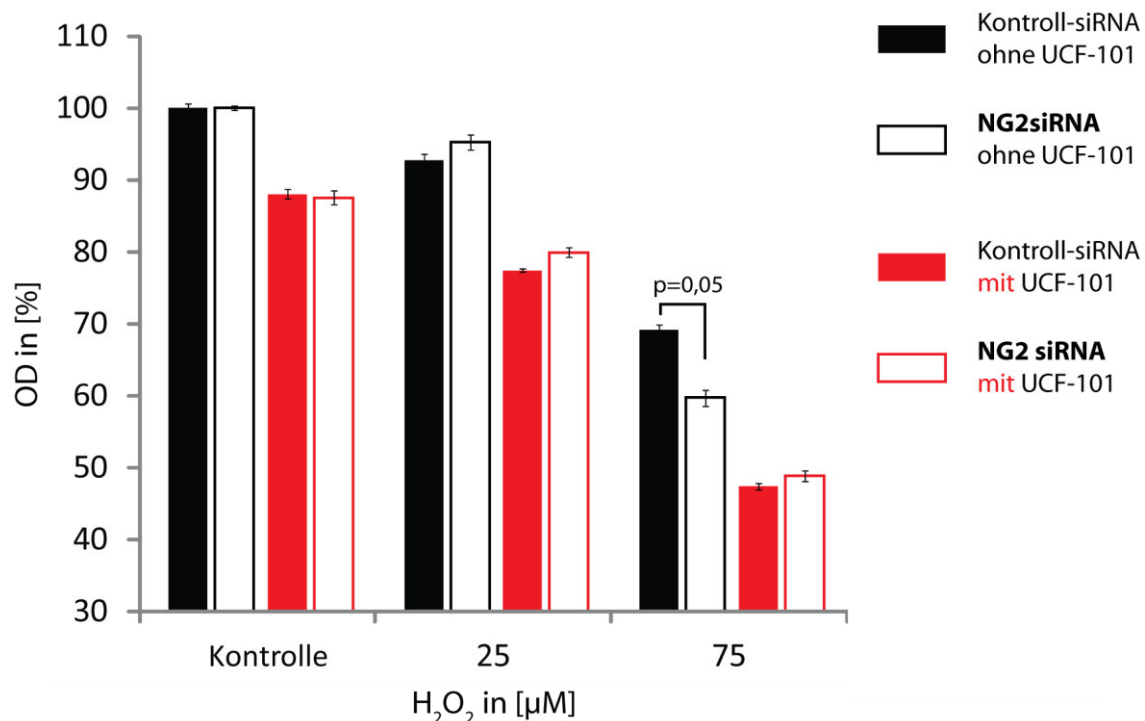
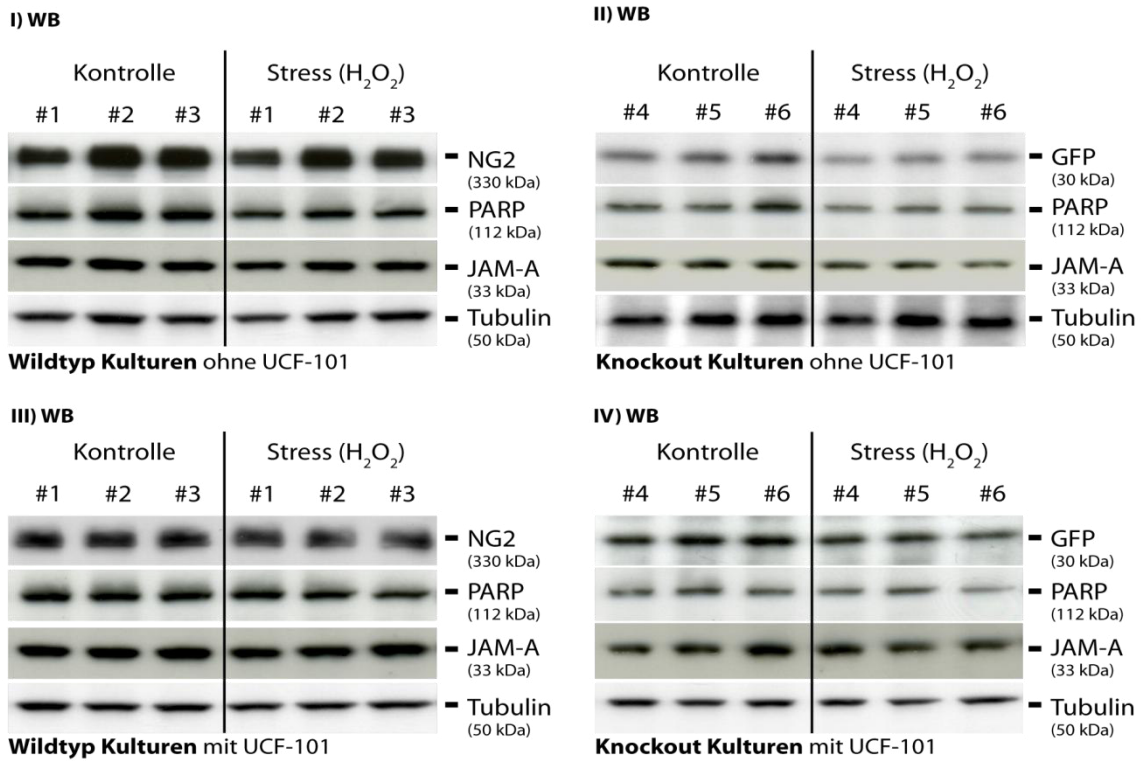


Abbildung 4-8: Der OMI/HtrA2-Inhibitor neutralisiert den Unterschied in der Viabilität zwischen NG2-Knockdown und Kontrolle

MTT Assay mit Oli-neu Zellen transfiziert mit NG2-siRNA und Kontroll-siRNA mit (rot) und ohne (schwarz) den OMI/HtrA2-Inhibitor UCF-101 und Inkubation mit H₂O₂ (x-Achse) für 4 h im Verhältnis zu den nicht gestressten, ohne Inhibitor inkubierten Kontrollen [n=1 mit 6 Replikaten].

Die Resultate zeigen, dass der OMI/HtrA2 Inhibitor UCF-101 den MTT-Umsatz in den Kontroll-Zellen reduziert und eventuell selbst zellulären Stress bzw. auch Zelltod hervorruft. In der Kontrolle ist eine Verminderung von ungefähr 12% zu registrieren. Wie in den Versuchen in 4.4.1 konnte bei 75 µM H₂O₂ ohne UCF-101 ein verminderter MTT-Umsatz in NG2-siRNA transfizierten Oli-neu Zellen beobachtet werden. Durch UCF-101 wird dieser Unterschied zwischen NG2-siRNA und Kontrolle aufgehoben. Jedoch wird durch die Nebenwirkung des Inhibitors der MTT-Umsatz weiter verringert. Für Experimente mit Cerebellum Kulturen wurde eine Konzentration des Inhibitors von 10 µM gewählt, da bei dieser Konzentration die spezifischen zellprotektiven NG2-Effekte in Oli-neu Zellen aufgehoben werden.

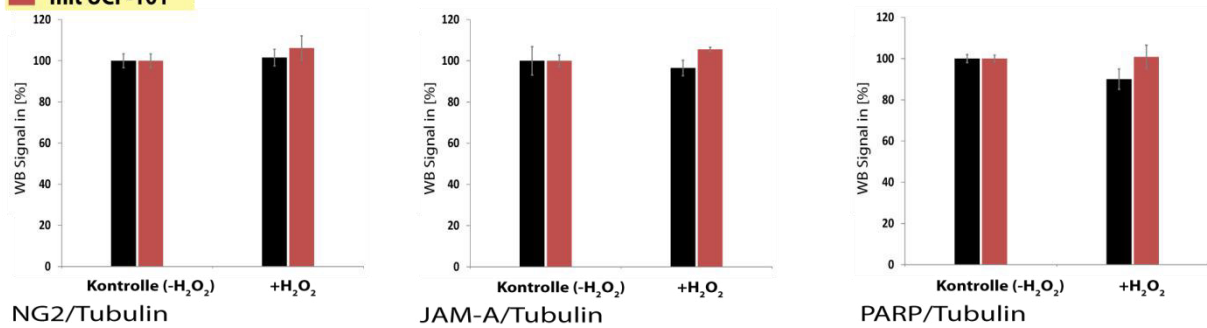
A



B

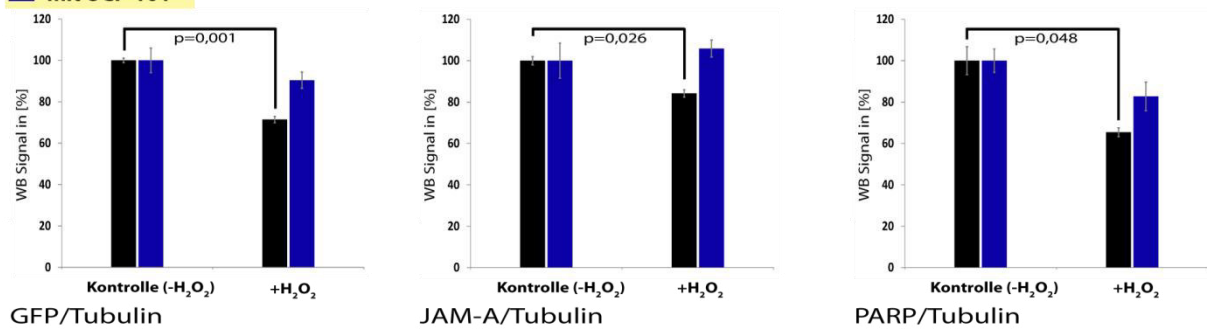
Cerebellum Kulturen (Wildtyp)

■ ohne UCF-101
■ mit UCF-101



Cerebellum Kulturen (Knock-out)

■ ohne UCF-101
■ mit UCF-101



C

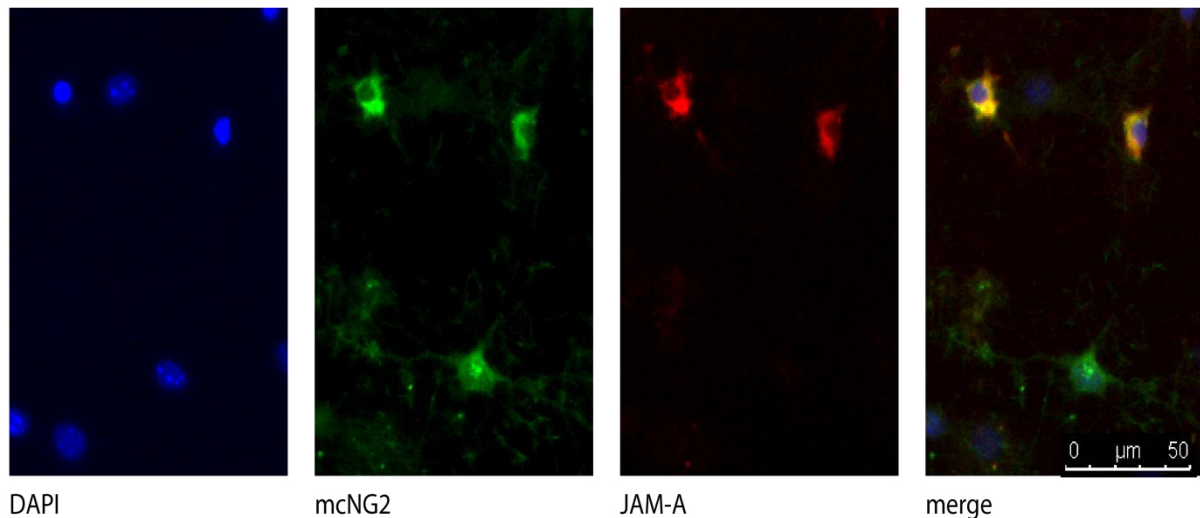


Abbildung 4-9: Protektiver Effekt des OMI/HtrA2-Inhibitor auf den verstärkten Zelltod von NG2-Knockout-OPC

Cerebellum Kulturen von Wildtyp- und NG2-Knockout Mäusen (P8). Die Zugabe von 10 μ M UCF-101 erfolgte eine Stunde vor Stressinduktion durch H_2O_2 . Nach 18 h wurden die Kulturen lysiert und mittels WB analysiert. Es wurden folgende Marker verwendet: NG2 bzw. GFP und JAM-A für die Existenz von OPC, PARP für den Nachweis des apoptotischen Zelltods und Tubulin als Ladekontrolle. A) WB von jeweils 3 „Littermates“ (Wt: #1, #2, #3; Ko: #4, #5, #6; n=3) und in (B) die densitometrische Auswertung und Normalisierung gegen Tubulin. Die beiden nicht gestressten Kontrollen (mit und ohne UCF-101) wurden als 100% definiert [n=3, SEM, gepaarter t-Test]. C) Immunzytochemische Färbung von Wildtyp-Kulturen mit JAM-A (rot), mc NG2 (NG2) und DAPI (Blau) zeigen, dass in den Cerebellum Kulturen nicht alle NG2-positiven Zellen auch positiv für JAM-A sind.

In Cerebellum Kulturen von jeweils drei individuellen Tieren zeigte sich abermals, dass es in den Knockout-Kulturen nach H_2O_2 -Stress verstärkt zu einem Zelltod in der OPC-Population kommt, erkennbar an der Abnahme des GFP bzw. auch des JAM-A Signals. Wobei das JAM-A-Signal weniger reduziert ist als das GFP-Signal. Im Gegensatz dazu ist in den Wildtyp-Kulturen keine stressabhängige Signalabnahme von spezifischen OPC-Markerproteinen zu beobachten. Auch eine verstärkte Abnahme des PARP-Signals in den Knockout-Kulturen gegenüber dem Wildtyp ist ein Indiz, dass die Reduktion von OPC-Markern nach oxidativem Stress von dem Mechanismus der Apoptose abhängig ist. Jedoch ist auch in den Wildtyp-Kulturen eine leichte Reduktion des PARP-Signals zu beobachten, die allerdings nicht signifikant ist. Die Behandlung mit dem spezifischen OMI/HtrA2-Inhibitor UCF-101

bewirkte in den Knockout-Kulturen einen verminderten Zelltod nach oxidativem Stress im Vergleich zur Kontrolle ohne Inhibitor. Gemessen an der Stärke des GFP-Signals im WB verhindert der Inhibitor die Signalabnahme durch den Zelltod der OPC um 19% (p von 0,001 auf 0,48). Das JAM-A Signal ist um 21,6% höher als ohne UCF-101 (p von 0,026 auf 0,74) und das PARP-Signal um 17,3% (p von 0,048 auf 0,33).

	Knockout		Wildtyp	
	<u>ohne UCF-101</u>	<u>mit UCF-101</u>	<u>ohne UCF-101</u>	<u>mit UCF-101</u>
GFP bzw. NG2	-28,6	-9,57	1,5	6,2
JAM-A	-15,8	5,8	-3,5	0,8
PARP	-34,59	-17,28	-9,96	5,56

Tabelle 4-1: Signalabnahmen in WB-Analysen von Markerproteinen für OPC unter oxidativem Stress (NG2 bzw. GFP und JAM-A) und Apoptose (PARP) im Vergleich zu den jeweiligen nicht gestressten Kulturen. Signifikante Werte ($p < 0,05$) in Rot [n=3, gepaarter t-Test].

Dies ist ein Indiz dass, die erhöhte Empfindlichkeit von den Knockout-Kulturen gegenüber oxidativem Stress direkt von OMI/HtrA2 abhängig ist und möglicherweise durch die fehlende Interaktion mit NG2 ausgelöst wird.

4.7 Die Interaktion mit NG2 reduziert die Proteaseaktivität von OMI/HtrA2

Wenn die Interaktion von OMI/HtrA2 mit NG2 die erhöhte Stressresistenz von NG2-positiven OPC gegenüber den Knockout-OPC bewirkt, so kann dies mit der Proteaseaktivität von OMI/HtrA2 verbunden sein, da UCF-101 die Proteasedomäne von OMI/HtrA2 inhibiert. Eine Reduktion der Aktivität würde z. B. eine verminderte Degradation der IAP bedeuten. Folglich wäre die Aktivierung der Caspasen beeinflusst. Bekannt ist, dass über die PDZ-Domäne verschiedener Proteine, deren Funktion bzw. Aktivität reguliert wird. Die Proteaseaktivität von OMI/HtrA2 kann z. B. durch Presenilin reguliert werden. Diese Interaktion führt allerdings zu einer Erhöhung der Aktivität (Gupta, Singh et al. 2004). Allerdings ist es durchaus möglich,

dass andere Liganden einen inhibitorischen Einfluss auf die Proteaseaktivität ausüben. Um dies zu überprüfen wurde ein Protease-Assay entwickelt, in dem getestet werden sollte, wie die Bindung von NG2 an die PDZ-Domäne von OMI/HtrA2 sich auf dessen Proteaseaktivität auswirkt. Für diesen Assay wurde ein Fusionsprotein mit dem intrazellulären Teil inklusive PDZ-Bindemotiv, einem verkürzten extrazellulären Anteil und einem HIS-Tag verwendet (NG2del+). Über den HIS-Tag ist eine Aufreinigung von NG2del-HIS mittels Chromatographie (IMAC) möglich. Die Relevanz des PDZ-Bindemotivs für die Bindung an die PDZ-Domäne von OMI/HtrA2 sollte durch ein NG2del-Konstrukt ohne PDZ-Bindemotiv überprüft werden (NG2del-). Die Aufreinigung des OMI/HtrA2-FLAG Fusionsproteins wurde über eine Immunpräzipitation mit einem mcFLAG-Antikörper verwirklicht. Aufgereinigtes NG2del- bzw. NG2del+ Protein wurde dann mit der OMI/HtrA2-IP inkubiert, so dass eine Bindung bzw. Interaktion möglich ist. Schließlich wurde die Spaltung eines OMI/HtrA2 Substrats (β -Casein) analysiert. Die Casein-Degradation wurde anhand einer Silberfärbung des SDS-Gels und Darstellung der unprozessierten Casein-Bande analysiert. Außerdem wurde mit dem Inhibitor UCF-101 getestet, ob der Verdau des β -Caseins OMI/HtrA2 abhängig ist. Nach dem Verdau von β -Casein wurde zudem die Immunpräzipitation von OMI/HtrA2 im WB analysiert, um zu zeigen, dass die Konzentration an OMI/HtrA2 in den einzelnen Ansätzen gleich war und um das co-immunpräzipitierte NG2del-Protein nachzuweisen.

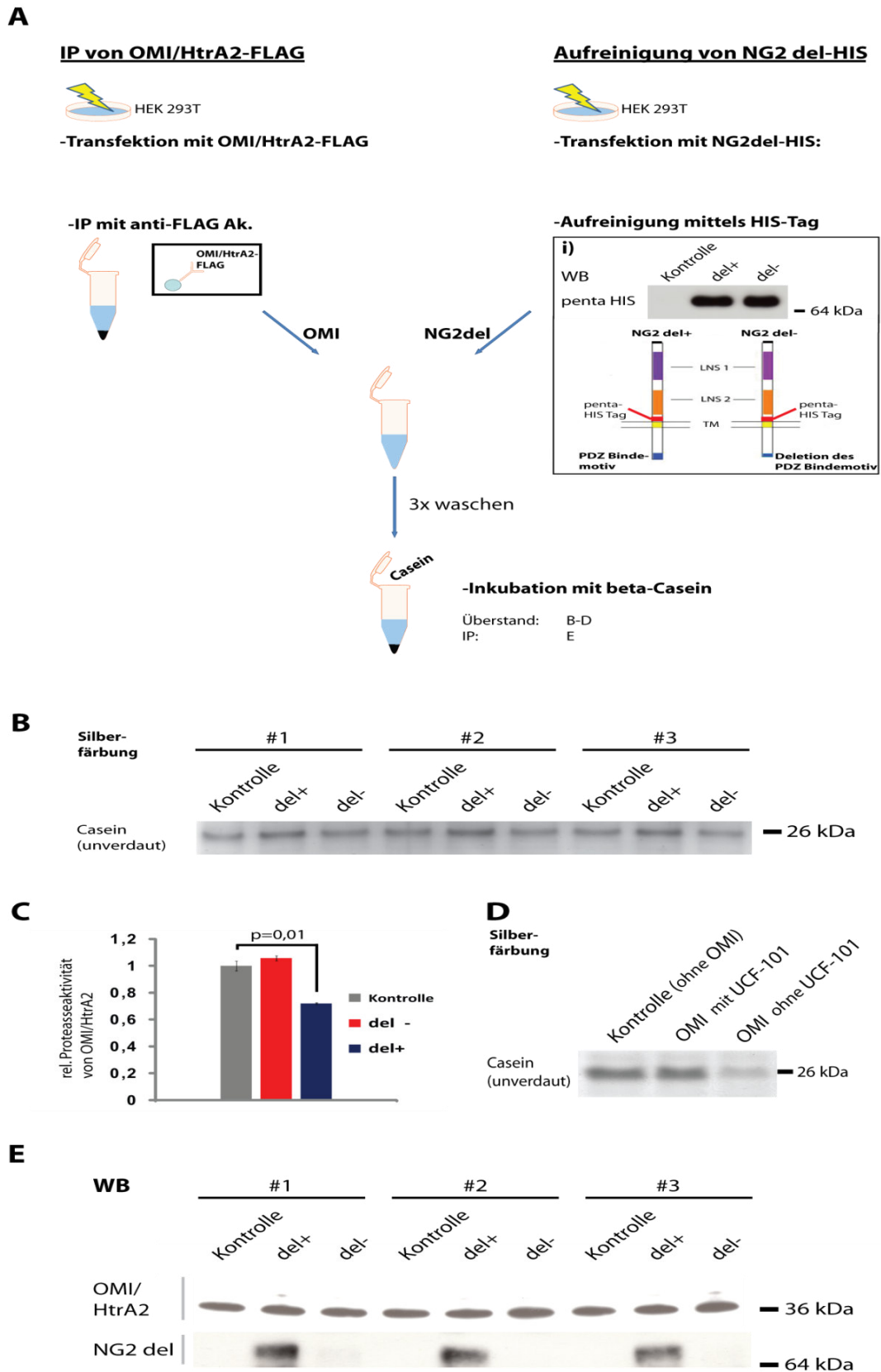


Abbildung 4-10: Die Interaktion mit NG2 reduziert die Proteaseaktivität von OMI/HtrA2

A) Schematische Darstellung des Protease-Assays mit β -Casein. Die Transfektionen erfolgten in HEK293T-Zellen. OMI/HtrA2-FLAG wurde über einen mcFLAG-Antikörper präzipitiert. Die Aufreinigung der NG2del-HIS Fusionsproteine erfolgte über den HIS-Tag mittels HIS-Select-Gel (Sigma). NG2del- besitzt kein PDZ-Bindemotiv während NG2del+ aus der vollständigen intrazellulären Sequenz von NG2 besteht. In Ausschnitt (i) wurden die NG2del Fusionsproteine im WB mit pentaHIS-Antikörper nach der Aufreinigung und Konzentrationsanpassung nachgewiesen. Kontrolle hierbei war ein Lysat von untransfizierten HEK Zellen. B) Darstellung der unprozessierten Casein-Bande mittels Gelelektrophorese und Silberfärbung. Als Kontrolle wurde die OMI/HtrA2-FLAG IP nur mit dem Elutionspuffer der Aufreinigung der beiden Proteine (NG2del- bzw. NG2del+) inkubiert. Die einzelnen Experimente wurden als #1, #2 und #3 dargestellt. Die Inkubation mit β -Casein erfolgte bei 36°C für 6 h. C) Densitometrische Auswertung von (B). Die Intensität der unverdauten β -Casein Bande der Kontrolle (nur mit Elutionspuffer) wurde als Referenz (=1) definiert. Mit NG2del+ war die Degradation von β -Casein deutlich geringer als mit NG2del- bzw. in der Kontrolle. E) Die IP von OMI/HtrA2 und die CoIP von NG2del+ wurden mittels WB nachgewiesen. Eine Co-Immünpräzipitation mit OMI/HtrA2 konnte nur mit NG2del+ nachgewiesen werden. In D) wurde mittels des Inhibitors UCF-101 (100 μ M) gezeigt, dass der Verdau von β -Casein OMI/HtrA2 abhängig ist. In der Kontrolle wurde β -Casein nur mit Sepharose-Beads (gekoppelt mit mcFLAG-Antikörper und Inkubation mit untransfiziertem HEK-Lysat) inkubiert.

Die Interaktion von NG2del+ mit OMI/HtrA2 führte zu einem verminderten Verdau von β -Casein. Die densitometrische Quantifizierung von β -Casein ergab, dass mit dem NG2del+ Protein die Bandenstärke um 28% höher ist als in den Kontrollen (SEM; gepaarter t-Test $p=0,011$). Das NG2del- Fusionsprotein, welches kein PDZ-Bindemotiv besitzt, zeigte keinen verminderten Casein-Verdau im Vergleich zur Kontrolle mit Elutionspuffer (B und C). In dem Protease-Assay in Abbildung 4-10 D konnte gezeigt werden, dass der Verdau des β -Caseins OMI/HtrA2 abhängig ist. Mit dem Inhibitor UCF-101 findet kein Verdau von β -Casein statt. Nach (Klupsch et al. 2006) sollte mit einer Konzentration von 100 μ M UCF-101 die Proteaseaktivität um 90% reduziert sein, was dem gezeigten Ergebnis entspricht. Nach der Inkubation mit β -Casein wurde die OMI/HtrA2-IP gewaschen und im WB untersucht. Abbildung 4-10 E zeigt, dass in den Ansätzen die gleiche Menge an OMI/HtrA2 präsent war, so dass die Unterschiede im Casein-Verdau nicht aus Schwankungen aus der OMI/HtrA2-Konzentration resultieren können. Interessanterweise konnte nach der Inkubation bei 37°C für 6 h keine Vorläuferform von OMI/HtrA2 im WB detektiert werden. Allerdings kann die Prozessierung von OMI/HtrA2 zur reifen Form durch Autokatalyse stattfinden (Seong, Choi et al. 2004). Der NG2cyto-Antikörper erkennt NG2del

unabhängig vom PDZ-Bindemotiv. Die WB-Analysen zeigten, dass nur das Fusionsprotein mit dem PDZ-Bindemotiv an OMI/HtrA2 bindet. Weiterhin zeigt diese Analyse, dass es relativ unwahrscheinlich ist, dass NG2 selbst ein Substrat von OMI/HtrA2 ist, da sonst das NG2del+ Protein verdaut und es folglich nicht mit der OMI/HtrA2-IP co-immunpräzipitiert worden wäre. Die Ergebnisse belegen, dass die Interaktion von OMI/HtrA2 und NG2, die Proteaseaktivität von OMI/HtrA2 reduziert.

4.8 Astrogliose im Gehirn von NG2-EYFP-Knockout Maus

Zelluläre Schäden und Zelltod im ZNS, z. B. durch mechanische Traumata, Schlaganfall oder Multiple Sklerose führen zu einer Reaktion von Astrozyten, der sogenannten Gliose oder Astrogliose. Ein charakteristisches Merkmal der Astrogliose ist die Hochregulation der Intermediärfilamente Vimentin und GFAP (Pekny 2001). In der NG2-EYFP Maus wäre durch den Knockout des NG2-Proteins eine erhöhte Sensitivität der OPC gegenüber oxidativem Stress denkbar, da unter anderem die zellprotektive Interaktion zwischen OMI/HtrA2 und NG2 nicht möglich ist. Die erhöhte Apoptoserate der NG2-Knockout OPC könnte dann zu einer Reaktion der Astrozyten führen, die sich in einer Astrogliose ausdrückt. In den Versuchen mit Knockout Cerebellum Kulturen konnte gezeigt werden, dass unter oxidativem Stress OPC absterben und ein leichter Anstieg des GFAP-Signals detektiert werden konnte. Anhand von immunhistochemischen Färbungen von Gehirnschnitten aus Wildtyp- und NG2-EYFP-Knockout Mäusen sollte dies *in vivo* untersucht werden.

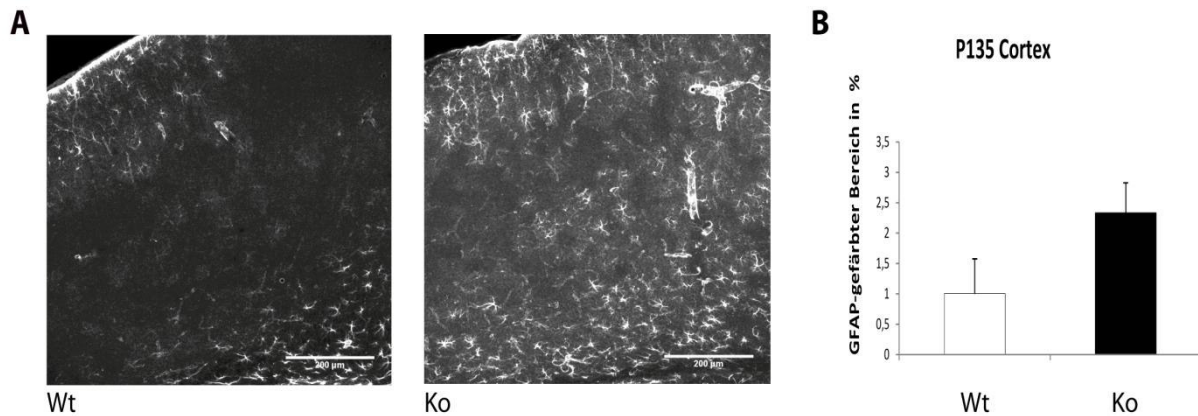


Abbildung 4-11: Gliose in der NG2-Knockout Maus

A) Sagittale Gehirnschnitte wurden mit GFAP-Antikörper gefärbt. Repräsentativer Ausschnitt aus dem Cortex. B) Zur Auswertung wurde pro Maus in einem Areal von $1,8 \text{ mm}^2$ im Cortex die Fluoreszenzintensität gemessen (ImageJ). Der Wert der GFAP-Färbung in Wildtyp-Mäusen wurde als 1 definiert. [n=3; SEM; gepaarter t-Test ($p=0,09$)]

Immunhistochemische Färbungen von jeweils 3 Mäusen (P135) zeigten, dass in der NG2-Knockout Maus im Cortex eine Steigerung um das 2,33-fache des GFAP-Signals gegenüber dem Wildtyp zu beobachten ist. Dies lässt den Rückschluss zu, dass die Astrozyten reaktiv werden und eine Astroglieose ausbilden. Allerdings existierten zwischen den individuellen Mäusen große Unterschiede in der Intensität der mit GFAP angefärbten Astrozyten, was sich in der Größe des SEM und der Signifikanz widerspiegelt.

In WB-Analysen von P15, P30 und adulten Knockout-Mäusen konnte mit zunehmendem Alter ein verstärktes GFAP-Signal detektiert werden (Daten nicht gezeigt)

Um eventuell eine verstärkte Apoptoserate in der OPC-Population der adulten NG2-Knockout Maus nachzuweisen, wurden sagittale Gehirnschnitte von Knockout- und Wildtyp-Mäusen mittels immunhistochemischer Färbungen verglichen. Die OPC wurden durch mcNG2-Antikörper oder endogenem EYFP dargestellt und die apoptotischen Zellen wurden durch die aktivierte-Caspase-3 identifiziert. Jedoch konnte keine gesteigerte Anzahl von OPC mit aktivierter-Caspase-3 in den Knockout-OPC detektiert werden. Auch in jüngeren Tieren (P15 und P30) konnte kein Unterschied detektiert werden (Färbungen nicht gezeigt).

5 Diskussion

5.1 Oxidativer Stress in OPC

Oligodendrogliale Zellen zeigen eine hohe Anfälligkeit gegenüber Substanzen die oxidativen Stress verursachen. Obwohl Oligodendrozyten für ihre physiologischen Funktionen einen hohen oxidativen Stoffwechsel betreiben, z. B. durch die Synthese von vielen ungesättigten Fettsäuren, ist ihre Ausstattung an antioxidierenden Molekülsystemen im Vergleich zu anderen Zellen eher gering ausgeprägt (Juurlink, Thorburne et al. 1998). Zusätzlich begünstigt ihre hohe Konzentration an freien Eisenionen die Bildung von Hydroxylradikalen via Fenton-Reaktion. Im Besonderen zeigen oligodendrogliale Vorläuferzellen hohe Sensitivität gegenüber toxischen Verbindungen (Fern and Moller 2000, Molina-Holgado, Vela et al. 2001). OPC zeigen eine deutlich höhere Anfälligkeit gegenüber oxidativem Stress als reife Oligodendrozyten, bedingt durch eine deutlich geringere Konzentration an Glutathion. Dieses Thiol stellt einen der wichtigsten zellulären Verteidigungsmechanismen gegen ROS-Verbindungen dar. Auch das Verhältnis zwischen proapoptotischen und antiapoptotischen Faktoren ist in OPC höher, sowie die Expression der Procaspase-3. Zusammen können diese Faktoren die erhöhte Sensitivität gegen oxidativen Stress erklären (Khorchid, Fragoso et al. 2002, Fragoso, Martinez-Bermudez et al. 2004).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Interaktion zwischen OMI/HtrA2 und NG2 nachgewiesen werden. Nach Beeinträchtigung des mitochondrialen Membransystems durch oxidativen Stress kann diese Interaktion in den OPC die Einleitung der Apoptose vermindern.

5.2 Interaktion zwischen OMI/HtrA2 und NG2

Der Y2H-Screen konnte die Serinprotease OMI/HtrA2 als Bindungspartner von NG2 identifizieren. Mutationsanalysen zeigten, dass die Bindung über das PDZ-Bindemotiv von NG2 und die PDZ-Domäne von OMI/HtrA2 erfolgt. Vergleiche mit

anderen Sequenzen die an eine PDZ-Domäne binden zeigen, dass hydrophobe Sequenzen für die Bindung notwendig sind und Liganden bevorzugt werden die über die Seitenkette von Tryptophan an Position (-1) binden (Martins, Turk et al. 2003). Auch die Serinprotease OMI/HtrA2 bevorzugt Bindungspartner die an der C-terminalen Position (0) Valin besitzen und an Position (-1) dominiert Tryptophan. Generell ist keine Aminosäure essentiell und kann daher zu einem weiten Spektrum an Bindungspartnern führen (Zhang, Appleton et al. 2007). NG2 exprimiert an seinem C-terminalen Ende die Aminosäuren (Pos.-3; Gln, Tyr, Trp und Val; Pos.0) und erfüllt damit zum größten Teil die Bedingungen als PDZ-Bindungspartner von OMI/HtrA2.

Mit biochemischen Methoden (IPs) konnte die Bindung über das PDZ-Bindemotiv von NG2 nachgewiesen und die Y2H-Analyse verifiziert werden. Da unter normalen physiologischen Bedingungen OMI/HtrA2 in dem Intermembranraum der Mitochondrien lokalisiert ist, kann die Interaktion eigentlich nur unter zellulären Stressbedingungen oder während der Apoptose stattfinden, wenn OMI/HtrA2 in das Zytosol translokalisiert wird.

Mit Wasserstoffperoxid konnte die Mitochondrienmembran permeabilisiert werden. Dies ist eine Voraussetzung für die Translokation von OMI/HtrA2 in das Zytosol. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass innerhalb einer Zelle die Färbung für intakte mitochondriale Membranen nach oxidativem Stress nicht gleichmäßig abnimmt. Das bedeutet, dass manche Mitochondrien in der Zelle durch oxidativen Stress schneller ihr Membranpotential verlieren als andere. Auch unter normalen physiologischen Bedingungen der Mitochondrien entstehen ROS-Verbindungen, die zu mitochondrialen Schäden führen. Die geschädigten Mitochondrien werden dann zur Gefahr für die Zelle, da sie durch fehlerhafte ATP-Synthese vermehrt weitere ROS-Verbindungen produzieren und proapoptische Moleküle, wie z. B. OMI/HtrA2 oder Cytochrom-c ins Zytosol freilassen. Um dies zu vermeiden, werden in einem gewissen Turnus Mitochondrien über Autophagie bzw. Mitophagie eliminiert (Kim, Rodriguez-Enriquez et al. 2007). Durch unterschiedliche Vorbelastungen an oxidativem Stress wäre es denkbar, dass einzelne Mitochondrien innerhalb einer Zelle schneller durch die H₂O₂-Inkubation angegriffen werden als andere Mitochondrien. Der Verlust des Membranpotentials durch oxidative Schädigungen kann somit nur wenige Mitochondrien betreffen. So könnten die freigesetzten

proapoptotischen Proteine der permeabilisierten Mitochondrien durch zytosolische Prozesse abgepuffert werden, so dass die Induktion der Apoptose ausbleibt. In OPC führt oxidativer Stress zwar zu einer generellen Abnahme des Membranpotentials, jedoch konnte nach einem längeren Zeitraum nur wenig Zelltod registriert werden.

Ein neu-etablierter Zell-ELISA konnte unter diesen oxidativen Stressbedingungen die Translokation von OMI/HtrA2 in das Zytosol und die Bindung mit NG2 in lebenden Zellen nachweisen. Bei erhöhtem oxidativen Stress lässt die Bindungskapazität nach. Unter diesen Bedingungen könnte ein fortschreitender Abbau der Zelle durch die Apoptose den Rückgang erklären. Bei sehr hohen Konzentrationen an ROS ist keine Bindung mehr feststellbar, da die Zellen sich vermutlich durch Nekrose auflösen. OMI/HtrA2 ist zu geringen Anteilen auch in anderen Organellen lokalisiert, z. B. im ER oder im Nukleus (Faccio, Fusco et al. 2000, Gray, Ward et al. 2000). So kann nicht ausgeschlossen werden, dass OMI/HtrA2 auch aus diesen Organellen freigesetzt wird und an NG2 bindet.

5.3 NG2 übt in OPC nach oxidativem Stress einen antiapoptotischen Effekt aus

Der Knockdown von NG2 in der Oli-neu Zelllinie führt zu verminderter Zellviabilität nach oxidativem Stress. Gleichzeitig konnte in diesen Zellen eine Degradation von PARP und eine Aktivierung der Caspase-3 nachgewiesen werden. So kann der Unterschied zu den Kontroll-Zellen durch eine erhöhte Apoptoserate bzw. mit einem vermehrten Zelltod in den Kulturen erklärt werden. So könnte das NG2-Proteoglykan in OPC unter oxidativem Stress eine zellprotektive Funktion erfüllen.

Dieser protektive Effekt konnte auch in gemischten Cerebellum Kulturen von Wildtyp im Vergleich zu der NG2-Knockout Maus nachgewiesen werden. Denkbar wäre, dass andere Zellen des ZNS durch trophische Faktoren den Effekt ausgleichen. Astrozyten können durch lösliche Faktoren in Kokulturen die Phosphorylierung von ERK und AKT in OPC erhöhen und schützen OPC bei oxidativem Stress, Glukose- und Sauerstoff Entzug (Arai and Lo 2010). So könnten Astrozyten die OPC vor oxidativem Schaden schützen.

In den Cerebellum-Kulturen kann ausgeschlossen werden, dass die protektive Wirkung von NG2 nur in isolierten OPC-Kulturen besteht. Der Vergleich zwischen Cerebellum Kulturen von Wildtyp und der NG2-Knockout Maus hatte allerdings den Nachteil, dass das EYFP-Protein eventuell zu einem toxischen Effekt in den OPC führt. Da in der NG2-EYFP Maus das EYFP-Gen nur als einzelne Kopie unter dem NG2-Promotor steht, sollte der Expressionslevel nicht zu einer toxischen Akkumulation führen. In den Cerebellum Kulturen wurde nur in den OPC Zelltod detektiert. Andere Zelltypen wie Astrozyten, Neurone und Oligodendrozyten blieben in ihrer Anzahl erhalten. Dies bestätigt die Empfindlichkeit von OPC gegenüber oxidativem Stress auch in gemischten Kulturen.

Bekannt ist die protektive Wirkung von NG2 in Glioma-Zellen. In NG2-positiven Glioblastoma wird die $\beta 1$ -Untereinheit von $\alpha 3\beta 1$ -Integrin über die Komplexbildung mit NG2 aktiviert. Daraus resultiert eine erhöhte Chemoresistenz über den PI3K/Akt-Signalweg (Chekenya, Krakstad et al. 2008). Daher kann der protektive Mechanismus von NG2 in Oli-neu Zellen oder in Cerebellum Kulturen nicht ausschließlich der Interaktion mit OMI/HtrA2 zugeordnet werden. In einem heterologen Expressionssystem (HEK293T) konnte bei Präsenz des NG2-Proteins mit intaktem PDZ-Bindemotiv ein protektiver Effekt festgestellt werden, im Gegensatz zu dem NG2-Protein mit deletiertem PDZ-Bindemotiv. Im Vergleich mit den Ergebnissen der Oli-neu Zellen, transfiziert mit siRNA, ist die Abnahme der Viabilität zu höheren H_2O_2 Konzentration verschoben, was die erhöhte Anfälligkeit von OPC gegenüber oxidativem Stress bestätigt. Da die Konstrukte sich nur in dem PDZ-Bindemotiv unterscheiden, sollte kein Unterschied in der Aktivierung von $\alpha 3\beta 1$ -Integrin vorliegen. Außerdem besitzt $\alpha 3\beta 1$ -Integrin keine PDZ-Domäne. Festzustellen ist, dass NG2 mit dem PDZ-Bindemotiv einen protektiven Effekt auf die Zellen ausübt, unabhängig von $\alpha 3\beta 1$ -Integrin. Es ist nicht auszuschließen, dass in OPC und Glioblastoma-Zellen unterschiedliche zellschützende Mechanismen gegen toxische Substanzen oder ROS existieren. Der protektive Effekt von NG2 könnte mit der Interaktion mit OMI/HtrA2 in Verbindung stehen.

5.4 Der antiapoptotische Effekt von NG2 korreliert mit OMI/HtrA2

Wenn der protektive Effekt des PDZ-Bindemotivs von NG2 in Zusammenhang mit der Bindung an OMI/HtrA2 steht, sollte mit einem spezifischen OMI/HtrA2-Inhibitor die erhöhte Sterblichkeit der NG2-Knockout OPC gegenüber den Wildtyp OPC ausgeglichen werden. Denkbar wäre, dass der protektive Effekt des NG2-Bindemotivs über andere intrazellulären Signalkaskaden die Zellen vor Apoptose schützt.

Der Inhibitor der Proteasefunktion von OMI/HtrA2 konnte das Absterben der NG2-defizienten OPC unter oxidativem Stress erheblich mindern. Grund hierfür ist, dass der Anteil von OMI/HtrA2, der an der Induktion der Apoptose beteiligt ist, durch den Inhibitor im Zytosol blockiert ist. Andere Aktivatoren der Apoptose, wie z. B. Cytochrom-c, sollten durch den Inhibitor nicht beeinflusst werden. So ist der vermehrte Zelltod der NG2-Knockout OPC abhängig von der Proteaseaktivität von OMI/HtrA2, da der Inhibitor die proteolytische Aktivität der Protease-Domäne blockiert. Allerdings wird OMI/HtrA2 auch in den Mitochondrien blockiert. Da OMI/HtrA2 im Intermembranraum der Mitochondrien einen protektiven Effekt ausübt, könnte dieser auch durch den Inhibitor beeinflusst sein. Bei Vergleich von Wildtyp und NG2-Knockout sollte dieser Effekt jedoch für beide Kulturen gleich sein.

Der Inhibitor kann allerdings auch eine Stressantwort in den Zellen auslösen (Klusch and Downward 2006). Ein Vorversuch mit Oli-neu Zellen zeigte, dass der Inhibitor die Viabilität der Zellen reduziert. Diese Nebenwirkung dürfte aber auch in dem Vergleich zwischen Wildtyp und NG2-Knockout Kulturen keine Rolle spielen.

Der Vergleich der verschiedenen spezifischen OPC-Marker zeigte in den Knockout-Kulturen, dass die EYFP- und die JAM-A Expression mit dem Inhibitor wesentlich höher ist. Das heißt, dass durch den Inhibitor in den NG2-Knockout Kulturen Apoptose vermieden wird. Das EYFP-Signal bleibt allerdings unter dem Wert der Kontrolle ohne oxidativen Stress. Das JAM-A Signal hingegen erreicht mit dem Inhibitor den Wert der ungestressten Kontrolle. Auch ohne Inhibitor mit H₂O₂ ist das JAM-A Signal nicht so stark reduziert wie das EYFP-Signal in den Knockout-Kulturen. Wie in Abbildung 4-9 C dargestellt, sind nicht alle OPC positiv für JAM-A.

Gerade die OPC, die in ihrer Morphologie eher reifen Oligodendrozyten ähneln, sind nicht positiv für JAM-A. So wäre es denkbar, dass gerade die OPC die schon relativ weit differenziert sind und vielleicht schon mit der Synthese der Myelinproteine bzw. Lipiden begonnen haben, durch den erhöhten Stoffwechsel besonders anfällig gegenüber oxidativem Stress sind. Die anlaufende Synthese der Myelinkomponenten wird endogen zur gesteigerten ROS-Bildung beitragen. Durch den zusätzlich induzierten oxidativen Stress ist diese „Subpopulation“ an OPC auch mit dem OMI/HtrA2-Inhibitor nicht zu schützen. So ist zu erklären, dass das GFP Signal, in dem diese Zellen detektiert werden, nicht den Wert der ungestressten Kontrolle erreicht. Während das JAM-A Signal, in dem diese Zellen nicht dargestellt werden, mit dem Inhibitor kein Unterschied zur ungestressten Kontrolle zeigt. So verursachen Hyperoxia-Ischämie Ereignisse bei Frühgeborenen den größten Schaden in der weißen Substanz, während der Hauptphase der Migration und Differenzierung der Oligodendrozyten. Interessanterweise werden bei Hyperoxia-Ischämie hauptsächlich die Prä-Oligodendrozyten abgetötet (Gerstner, DeSilva et al. 2008).

Ob der Inhibitor den protektiven Effekt der Interaktion zwischen NG2 und OMI/HtrA2 in den NG2-Knockout OPC simuliert oder allein durch die Inhibition von OMI/HtrA2 die Apoptose in Knockout OPC verhindert, ist nicht eindeutig aufzulösen. Allerdings zeigte der Inhibitor mit Oli-neu Zellen keine zellprotektive Wirkung unter oxidativem Stress. Der Inhibitor reduzierte sogar die Zellviabilität.

Zusammenfassend kann die Interaktion zwischen NG2 und OMI/HtrA2 den detektierten antiapoptotischen Effekt verursachen. Zu einem, weil NG2 einen protektiven Effekt auf Zellen ausübt in Abhängigkeit des PDZ-Bindemotivs und zum anderen die erhöhte Apoptoserate ohne NG2 abhängig ist von der Proteaseaktivität von OMI/HtrA2. So kann die Interaktion mit NG2 einen Einfluss auf die Proteaseaktivität von OMI/HtrA2 ausüben und dadurch eine protektive Funktion gegen die Induktion der Apoptose ausüben.

5.5 Die Interaktion mit NG2 reguliert die Proteaseaktivität von OMI/HtrA2

PDZ-Domänen sind oft regulatorische Elemente innerhalb eines Proteins. So kann die Bindung eines Interaktionspartners über die PDZ-Domäne die Protease-Domäne innerhalb des Proteins beeinflussen. Die Proteaseaktivität von OMI/HtrA2 kann z. B. durch die Bindung von WARTS oder Presenilin an die PDZ-Domäne gesteigert werden. Erklärbar ist dies durch die Bindung, die eine Konformationsänderung innerhalb des Proteins auslöst und dadurch das Substrat effektiver prozessiert werden kann. Jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass ein Bindungspartner eine Konformationsänderung verursacht, die die basale Proteaseaktivität (ohne Bindungspartner) reduziert. Ein biochemischer Ansatz zeigte, dass NG2 an die PDZ-Domäne von OMI/HtrA2 bindet und infolgedessen die Proteaseaktivität reduziert wird. Dargestellt wurde dies anhand der Degradation von β -Casein, einem Substrat von OMI/HtrA2. Da in diesem Assay mit aufgereinigten Proteinen gearbeitet wurde, inhibiert NG2 direkt die proteolytische Aktivität von OMI/HtrA2. Jedoch kann die Interaktion auf die Proteaseaktivität von OMI/HtrA2 in Zellen auch indirekter Natur sein. So könnte die Bindung von NG2 an OMI/HtrA2 andere Aktivatoren daran hindern an die PDZ-Domäne von OMI/HtrA2 zu binden und dessen Proteaseaktivität zu steigern.

Mit der Bindung von NG2 an die PDZ-Domäne von OMI/HtrA2 in einem Protease-Assay konnte ein Mechanismus dargestellt werden, wie die Interaktion von OMI/HtrA2 und NG2 antiapoptotisch in Zellen wirkt. So ist durch die reduzierte Proteaseaktivität die Degradation der IAP vermindert und damit auch die Aktivierung verschiedener Caspasen. Aber auch die Einleitung des Caspase-unabhängigen Weg der Apoptose durch OMI/HtrA2 wird durch die verminderte Proteaseaktivität beeinflusst.

Zusätzlich kann die Rückkopplung von zytosolischem OMI/HtrA2 auf die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran durch die Interaktion reduziert werden. So könnte die Interaktion vermeiden, dass die Konzentration an proapoptotischen Molekülen aus dem Intermembranraum, durch die

Permeabilisierung weiterer Mitochondrien, im Zytosol ansteigt und dadurch Apoptose ausgelöst wird.

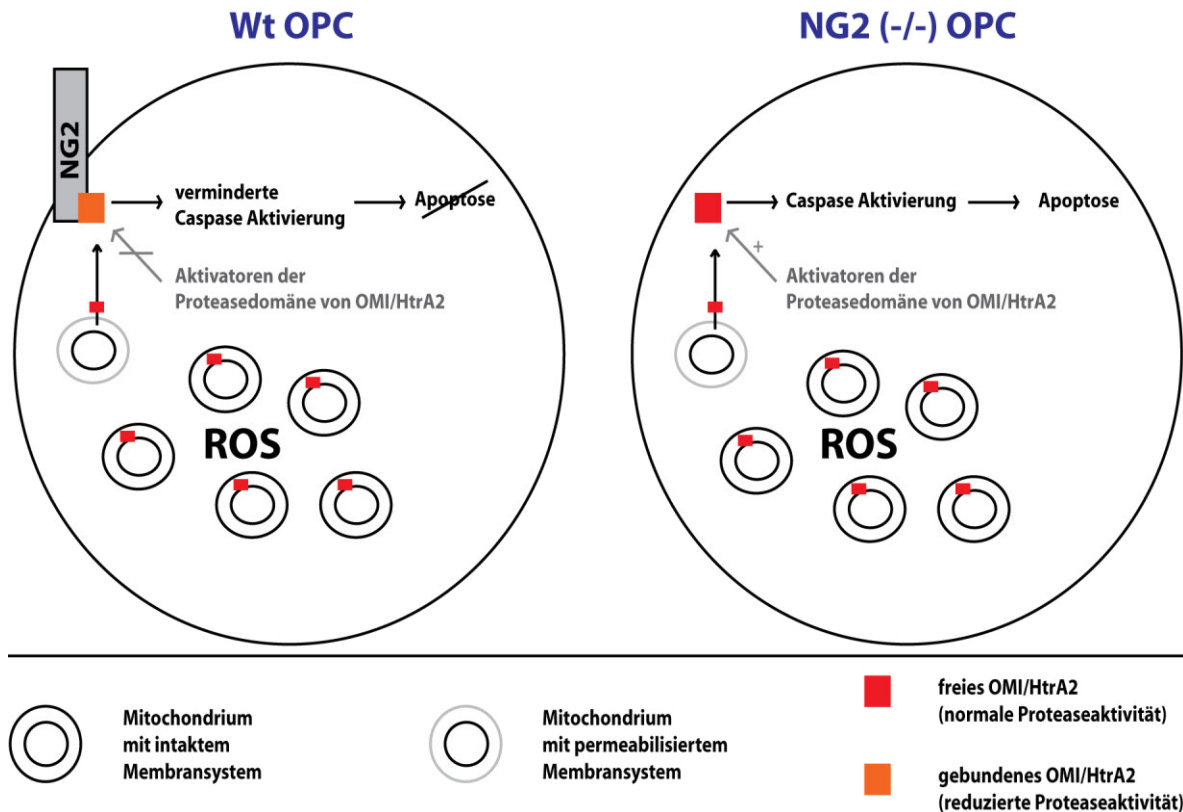


Abbildung 5-1: Interaktion zwischen OMI/HtrA2 und NG2 vermindert bei oxidativem Stress die Induktion der Apoptose

Schematische Darstellung des antiapoptotischen Effekts der Interaktion. Oxidativer Stress (ROS) induziert die Permeabilisierung der äußeren mitochondrialen Membran (MOMP). Dadurch gelangen proapoptotische Moleküle in das Zytosol. Durch Bindung von NG2 und OMI/HtrA2 über die PDZ-Domäne, wird die proteolytische Aktivität von OMI/HtrA2 vermindert. Da OMI/HtrA2 im Zytosol während der Einleitung der Apoptose Caspasen aktiviert, durch die proteolytische Degradation der Caspaseinhibitoren (IAP), folgt durch die Interaktion eine verminderte Aktivierung der Caspasen. Durch die verminderte Proteaseaktivität wird auch der Caspase-unabhängige Weg zur Einleitung der Apoptose durch OMI/HtrA2 beeinflusst (im Schema nicht gezeigt). Ein möglicher indirekter Effekt der Interaktion ist, dass die Bindung von Aktivatoren der Proteasedomäne an die PDZ-Domäne von OMI/HtrA2 durch die Bindung an NG2 blockiert wird.

Inwiefern die Interaktion zwischen NG2 und OMI/HtrA2 mit anderen Interaktionspartnern von NG2 konkurriert, ist wahrscheinlich abhängig von dem Entwicklungsstadium der OPC oder eventuell auch von der unterschiedlich

ausgerichteten Funktion. So wäre es vorstellbar, dass in migrierenden OPC die Interaktion von NG2 mit Syntenin-1 dominiert und in OPC, die in Verbindung mit neuronalen Synapsen stehen, die Interaktion zu GRIP physiologisch relevanter ist. Die Interaktion zu OMI/HtrA2 könnte im Vordergrund stehen, wenn aufgrund der Stoffwechselfysiologie hohe Belastungen an oxidativem Stress entstehen.

5.6 Gliose in der NG2-Knockout Maus

Die erhöhte Apoptose Empfindlichkeit der NG2-Knockout OPC unter oxidativem Stress könnte sich auch in der NG2-Knockout Maus *in vivo* auswirken. In NG2-Knockout Mäusen konnte festgestellt werden, dass während der Myelinisierung in der dorsalen weißen Substanz weniger OPC vorhanden sind (P4-P5). Grund hierfür war eine reduzierte Teilungsrates der Vorläuferzellen. Jedoch gleicht sich dieser Unterschied ab dem 14. Tag aus (Kucharova and Stallcup 2010). In dieser Arbeit konnte in der NG2-Knockout Maus mit zunehmendem Alter eine Gliose nachgewiesen werden. Grund der Gliose könnte eine vermehrte Apoptoserate der OPC sein. Da in adulten Tieren kein Unterschied in der Anzahl der OPC besteht, könnte eventuell eine gesteigerte „Turnover“ Rate der NG2-Knockout OPC den verstärkten Zelltod ausgleichen. Die immunzytochemischen Färbungen der aktivierten-Caspase-3 zeigten jedoch keine erhöhte Apoptoserate in der OPC Population der NG2-Knockout Maus. Bei verschiedenen ZNS-Erkrankungen kann die Glioseentwicklung eine Reaktion auf Schädigungen bzw. Zellsterben sein. Interessanterweise konnte in den NG2-Knockout Cerebellum Kulturen, in denen unter oxidativem Stress OPC absterben, ein tendenziell erhöhtes Signal für GFAP detektiert werden. Daher könnte die Astroglie eine Reaktion auf einen kontinuierlichen erhöhten OPC Zelltod sein, ohne dass die Gesamtzellzahl beeinflusst wird. Dies ist jedoch spekulativ und der Nachweis der vermehrten Apoptose in den Knockout OPC misslang. Jedoch war die immunhistochemische Färbung eine Momentaufnahme, während die Astroglie eine Antwort auf das OPC-Sterben über die gesamte Lebensspanne ist. So steigert sich auch die Astroglie der NG2-Knockout Maus mit zunehmendem Lebensalter.

5.7 Apoptose in OPC und Oligodendrozyten

Die leicht-induzierbare Apoptose in OPC kann während der Entwicklung des ZNS von biologischer Bedeutung sein. In der Entwicklung differenzieren wesentlich mehr OPC zu Oligodendrozyten als für die Myelinisierung erforderlich wären. Das Verhältnis zwischen myelinisierenden Oligodendrozyten und Axonen wird über den programmierten Zelltod angepasst. So werden z. B. im optischen Nerv während der Entwicklung bis zu 50% der entstehenden Oligodendrozyten wieder eliminiert (Barres, Hart et al. 1992, Raff 1996). Aber auch die Entstehung von neuen Oligodendrozyten im adulten ZNS kann über den apoptotischen Zelltod reguliert werden. Eine leicht zu induzierende Apoptose in OPC, die sich zu Oligodendrozyten differenzieren, wäre für die Regulation der myelinisierenden Oligodendrozyten ein unterstützender Mechanismus.

Ein anderer Aspekt ist, dass die OPC eine Population an Zellen im ZNS darstellen, die mitotisch bleiben und auch migratorisches Potential besitzen. Im adulten ZNS spielen sie durch diese Eigenschaften eine Rolle in Regenerationsprozessen. Allerdings begünstigen diese Eigenschaften auch die Bildung von Tumorzellen. Aus oligodendroglialen Zellen können NG2-positive Glioblastoma entstehen und einen hochaggressiven Gehirntumor ausbilden. Wie in verschiedenen Modellen gezeigt werden konnte, spielt eine verhinderte Induktion des apoptotischen Vorgangs, in der Entstehung von verschiedenen Tumorerkrankungen eine entscheidende Rolle. Nicht nur die unkontrollierte Vermehrung entarteter Zellen ist die Ursache von Tumorentwicklung, sondern auch eine beeinträchtigte Apoptose. So liegt der Grund für die Resistenz mancher Tumorzellen gegenüber Chemo- oder Bestrahlungstherapie in der fehlerhaften Einleitung bzw. Ausführung des apoptotischen Vorgangs (Steinbach and Weller 2004). Ein sensitiver Regulationsmechanismus zur Einleitung der Apoptose kann so die Bildung und das Ausbreiten von Tumorzellen verhindern.

Evolutionär könnte die protektive Interaktion zwischen OMI/HtrA2 und NG2 neben anderen Prozessen Teil der Anpassung an den sensitiven Mechanismus zur Einleitung der Apoptose in OPC darstellen. Vor allem wenn in den OPC oxidativer Stress aufgrund ihrer physiologischen Funktion entsteht.

Die hohe Sensitivität gegenüber oxidativem Stress kann bei verschiedenen Erkrankungen, in denen im ZNS unphysiologische Konzentrationen an Sauerstoff entstehen, von Bedeutung sein. Bei Hypoxie-Ischämie ist hauptsächlich die weiße Substanz betroffen. Gerade bei Frühgeborenen entsteht durch die Sauerstoffunterversorgung u.a. ein Kalzium-Influx über die Glutamatrezeptoren. Dies führt zur erheblichen ROS-Generation. Apoptose konnte vor allem in den prämyelinisierenden Oligodendrozyten detektiert werden. Aber auch OPC scheinen betroffen zu sein, da im fortgeschrittenen Alter in den betroffenen Arealen eine Hypomyelinisierung bestehen bleibt. Aber auch in anderen neurodegenerativen Erkrankungen könnte die Sensitivität gegenüber oxidativem Stress eine Rolle spielen. So konnte in aktiven Läsionen der MS-Erkrankung hohe Konzentration an ROS Substanzen, wie z. B. NO, nachgewiesen werden. In vielen chronischen MS-Läsionen konnten OPC nachgewiesen werden. Die Anzahl kann vergleichbar sein mit gesundem Gewebe der weißen Substanz, jedoch ist sie geringer im Vergleich zu experimentell induzierter Demyelinisierung (Murtie, Zhou et al. 2005, Kuhlmann, Miron et al. 2008). Die Frage die sich stellt ist, warum die Remyelinisierung der betroffenen Areale scheitert. Da in diesen Läsionen oxidativer Stress entsteht, kann die erhöhte Empfindlichkeit der OPC gegenüber ROS die Remyelinisierung verhindern. Bei Patienten in der progressiven Phase der MS-Erkrankung, in der die Remyelinisierung der betroffenen Areale scheitert, konnten in verschiedenen Regionen der Läsionen oxidative Schädigungen und apoptotische Vorgänge detektiert werden. Der Nachweis erfolgte über oxidierte DNA und oxidierten Phospholipiden, die man hauptsächlich den oligodendrogialen Zellen zuteilen konnte (Haider, Fischer et al. 2011). Durch den oxidativen Stress in den Läsionen könnte die Migration bzw. die Differenzierung der OPC zu myelinisierenden Oligodendrozyten durch Apoptose verhindert sein. So wäre eine Remyelinisierung der betroffenen Axone nicht mehr möglich.

So kann der leichtauslösende apoptotische Mechanismus der OPC Fluch und Segen für das ZNS sein.

6 **Ausblick**

Die durchgeführten Studien belegten die Interaktion zwischen OMI/HtrA2 und NG2 unter oxidativem Stress. Die Interaktion übt einen reduzierenden Effekt auf die Proteaseaktivität von OMI/HtrA2 aus. Dadurch kann die Interaktion unter zellulären Stressbedingungen die Einleitung der Apoptose vermeiden.

Inwiefern andere Moleküle während des apoptotischen Vorgangs an die PDZ-Domäne von OMI/HtrA2 binden, gilt es noch zu untersuchen. Gerade wenn es sich hierbei um Aktivatoren der Proteaseaktivität von OMI/HtrA2 handelt, kann die Interaktion mit NG2 eine kompetitive Inhibition über die PDZ-Domäne von OMI/HtrA2 ausüben.

Eine interessante Frage ist, ob die Interaktion auch in NG2-positiven Glioma stattfindet. Hier wäre der Einfluss auf die Chemoresistenz der Tumorzellen genauer zu untersuchen.

Um die Gründe der verstärkten Glioseentwicklung aufzuklären, sind weitere Untersuchungen der NG2-Knockout Maus erforderlich.

7 Referenzen

Abbott, N. J. (2002). "Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability." J Anat **200**(6): 629-638.

Agostini, M., P. Tucci and G. Melino (2011). "Cell death pathology: perspective for human diseases." Biochem Biophys Res Commun **414**(3): 451-455.

Aguirre, A. and V. Gallo (2004). "Postnatal neurogenesis and gliogenesis in the olfactory bulb from NG2-expressing progenitors of the subventricular zone." J Neurosci **24**(46): 10530-10541.

Al-Mayhany, M. T., R. Grenfell, M. Narita, S. Piccirillo, E. Kenney-Herbert, J. W. Fawcett, V. P. Collins, K. Ichimura and C. Watts (2011). "NG2 expression in glioblastoma identifies an actively proliferating population with an aggressive molecular signature." Neuro Oncol **13**(8): 830-845.

Arai, K. and E. H. Lo (2010). "Astrocytes protect oligodendrocyte precursor cells via MEK/ERK and PI3K/Akt signaling." J Neurosci Res **88**(4): 758-763.

Armstrong, J. S. (2006). "The role of the mitochondrial permeability transition in cell death." Mitochondrion **6**(5): 225-234.

Asher, R. A., D. A. Morgenstern, F. Properzi, A. Nishiyama, J. M. Levine and J. W. Fawcett (2005). "Two separate metalloproteinase activities are responsible for the shedding and processing of the NG2 proteoglycan in vitro." Mol Cell Neurosci **29**(1): 82-96.

Back, S. A., N. L. Luo, N. S. Borenstein, J. M. Levine, J. J. Volpe and H. C. Kinney (2001). "Late oligodendrocyte progenitors coincide with the developmental window of vulnerability for human perinatal white matter injury." J Neurosci **21**(4): 1302-1312.

Barres, B. A., I. K. Hart, H. S. Coles, J. F. Burne, J. T. Voyvodic, W. D. Richardson and M. C. Raff (1992). "Cell death in the oligodendrocyte lineage." Journal of neurobiology **23**(9): 1221-1230.

Barres, B. A., I. K. Hart, H. S. Coles, J. F. Burne, J. T. Voyvodic, W. D. Richardson and M. C. Raff (1992). "Cell death in the oligodendrocyte lineage." J Neurobiol **23**(9): 1221-1230.

Barres, B. A., R. Schmid, M. Sendtner and M. C. Raff (1993). "Multiple extracellular signals are required for long-term oligodendrocyte survival." Development **118**(1): 283-295.

- Barritt, D. S., M. T. Pearn, A. H. Zisch, S. S. Lee, R. T. Javier, E. B. Pasquale and W. B. Stallcup (2000). "The multi-PDZ domain protein MUPP1 is a cytoplasmic ligand for the membrane-spanning proteoglycan NG2." Journal of cellular biochemistry **79**(2): 213-224.
- Barritt, D. S., M. T. Pearn, A. H. Zisch, S. S. Lee, R. T. Javier, E. B. Pasquale and W. B. Stallcup (2000). "The multi-PDZ domain protein MUPP1 is a cytoplasmic ligand for the membrane-spanning proteoglycan NG2." J Cell Biochem **79**(2): 213-224.
- Barron, K. D. (2003). "Microglia: history, cytology, and reactions." J Neurol Sci **207**(1-2): 98.
- Baumann, N. and D. Pham-Dinh (2001). "Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system." Physiol Rev **81**(2): 871-927.
- Bedard, K. and K. H. Krause (2007). "The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology." Physiol Rev **87**(1): 245-313.
- Bergles, D. E., R. Jabs and C. Steinhauser (2010). "Neuron-glia synapses in the brain." Brain Res Rev **63**(1-2): 130-137.
- Bergles, D. E., J. D. Roberts, P. Somogyi and C. E. Jahr (2000). "Glutamatergic synapses on oligodendrocyte precursor cells in the hippocampus." Nature **405**(6783): 187-191.
- Birnbaum, M. J., R. J. Clem and L. K. Miller (1994). "An apoptosis-inhibiting gene from a nuclear polyhedrosis virus encoding a polypeptide with Cys/His sequence motifs." J Virol **68**(4): 2521-2528.
- Blink, E., N. A. Maianski, E. S. Alnemri, A. S. Zervos, D. Roos and T. W. Kuijpers (2004). "Intramitochondrial serine protease activity of Omi/HtrA2 is required for caspase-independent cell death of human neutrophils." Cell Death Differ **11**(8): 937-939.
- Breckenridge, D. G., M. Nguyen, S. Kuppig, M. Reth and G. C. Shore (2002). "The procaspase-8 isoform, procaspase-8L, recruited to the BAP31 complex at the endoplasmic reticulum." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(7): 4331-4336.
- Brunori, M., E. Forte, M. Arese, D. Mastronicola, A. Giuffre and P. Sarti (2006). "Nitric oxide and the respiratory enzyme." Biochim Biophys Acta **1757**(9-10): 1144-1154.
- Burg, M. A., A. Nishiyama and W. B. Stallcup (1997). "A central segment of the NG2 proteoglycan is critical for the ability of glioma cells to bind and migrate toward type VI collagen." Exp Cell Res **235**(1): 254-264.

- Burg, M. A., E. Tillet, R. Timpl and W. B. Stallcup (1996). "Binding of the NG2 proteoglycan to type VI collagen and other extracellular matrix molecules." J Biol Chem **271**(42): 26110-26116.
- Butts, B. D., C. Houde and H. Mehmet (2008). "Maturation-dependent sensitivity of oligodendrocyte lineage cells to apoptosis: implications for normal development and disease." Cell Death Differ **15**(7): 1178-1186.
- Cai, J., Y. Qi, X. Hu, M. Tan, Z. Liu, J. Zhang, Q. Li, M. Sander and M. Qiu (2005). "Generation of oligodendrocyte precursor cells from mouse dorsal spinal cord independent of Nkx6 regulation and Shh signaling." Neuron **45**(1): 41-53.
- Cain, K., S. B. Bratton and G. M. Cohen (2002). "The Apaf-1 apoptosome: a large caspase-activating complex." Biochimie **84**(2-3): 203-214.
- Chatterjee, N., J. Stegmuller, P. Schatzle, K. Karram, M. Koroll, H. B. Werner, K. A. Nave and J. Trotter (2008). "Interaction of syntenin-1 and the NG2 proteoglycan in migratory oligodendrocyte precursor cells." J Biol Chem **283**(13): 8310-8317.
- Chekenya, M., C. Krakstad, A. Svendsen, I. A. Netland, V. Staalesen, B. B. Tysnes, F. Selheim, J. Wang, P. O. Sakariassen, T. Sandal, P. E. Lonning, T. Flatmark, P. O. Enger, R. Bjerkvig, M. Sioud and W. B. Stallcup (2008). "The progenitor cell marker NG2/MPG promotes chemoresistance by activation of integrin-dependent PI3K/Akt signaling." Oncogene **27**(39): 5182-5194.
- Chittajallu, R., A. Aguirre and V. Gallo (2004). "NG2-positive cells in the mouse white and grey matter display distinct physiological properties." J Physiol **561**(Pt 1): 109-122.
- Cilenti, L., G. A. Kyriazis, M. M. Soundarapandian, V. Stratico, A. Yerkes, K. M. Park, A. M. Sheridan, E. S. Alnemri, J. V. Bonventre and A. S. Zervos (2005). "Omi/HtrA2 protease mediates cisplatin-induced cell death in renal cells." Am J Physiol Renal Physiol **288**(2): F371-379.
- Cilenti, L., Y. Lee, S. Hess, S. Srinivasula, K. M. Park, D. Junqueira, H. Davis, J. V. Bonventre, E. S. Alnemri and A. S. Zervos (2003). "Characterization of a novel and specific inhibitor for the pro-apoptotic protease Omi/HtrA2." J Biol Chem **278**(13): 11489-11494.
- Cilenti, L., M. M. Soundarapandian, G. A. Kyriazis, V. Stratico, S. Singh, S. Gupta, J. V. Bonventre, E. S. Alnemri and A. S. Zervos (2004). "Regulation of HAX-1 anti-apoptotic protein by Omi/HtrA2 protease during cell death." J Biol Chem **279**(48): 50295-50301.

- Clausen, T., C. Southan and M. Ehrmann (2002). "The HtrA family of proteases: implications for protein composition and cell fate." Mol Cell **10**(3): 443-455.
- Clemens, M. J., M. Bushell, I. W. Jeffrey, V. M. Pain and S. J. Morley (2000). "Translation initiation factor modifications and the regulation of protein synthesis in apoptotic cells." Cell Death Differ **7**(7): 603-615.
- Dalkara, T., Y. Gursoy-Ozdemir and M. Yemisci (2011). "Brain microvascular pericytes in health and disease." Acta Neuropathol **122**(1): 1-9.
- Dawson, M. R., A. Polito, J. M. Levine and R. Reynolds (2003). "NG2-expressing glial progenitor cells: an abundant and widespread population of cycling cells in the adult rat CNS." Mol Cell Neurosci **24**(2): 476-488.
- Debatin, K. M. and P. H. Krammer (2004). "Death receptors in chemotherapy and cancer." Oncogene **23**(16): 2950-2966.
- Decker, P. and S. Muller (2002). "Modulating poly (ADP-ribose) polymerase activity: potential for the prevention and therapy of pathogenic situations involving DNA damage and oxidative stress." Curr Pharm Biotechnol **3**(3): 275-283.
- Del Bigio, M. R. (1995). "The ependyma: a protective barrier between brain and cerebrospinal fluid." Glia **14**(1): 1-13.
- Diers-Fenger, M., F. Kirchhoff, H. Kettenmann, J. M. Levine and J. Trotter (2001). "AN2/NG2 protein-expressing glial progenitor cells in the murine CNS: isolation, differentiation, and association with radial glia." Glia **34**(3): 213-228.
- Downward, J. (2004). "PI 3-kinase, Akt and cell survival." Semin Cell Dev Biol **15**(2): 177-182.
- Dringen, R., J. M. Gutterer and J. Hirrlinger (2000). "Glutathione metabolism in brain metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species." Eur J Biochem **267**(16): 4912-4916.
- Dringen, R., B. Pfeiffer and B. Hamprecht (1999). "Synthesis of the antioxidant glutathione in neurons: supply by astrocytes of CysGly as precursor for neuronal glutathione." J Neurosci **19**(2): 562-569.
- Dringen, R., B. Pfeiffer and B. Hamprecht (1999). "Synthesis of the antioxidant glutathione in neurons: supply by astrocytes of CysGly as precursor for neuronal glutathione." The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience **19**(2): 562-569.

- Duprez, L., E. Wirawan, T. Vanden Berghe and P. Vandenabeele (2009). "Major cell death pathways at a glance." Microbes Infect **11**(13): 1050-1062.
- Eckelman, B. P. and G. S. Salvesen (2006). "The human anti-apoptotic proteins cIAP1 and cIAP2 bind but do not inhibit caspases." J Biol Chem **281**(6): 3254-3260.
- Eckelman, B. P., G. S. Salvesen and F. L. Scott (2006). "Human inhibitor of apoptosis proteins: why XIAP is the black sheep of the family." EMBO Rep **7**(10): 988-994.
- Eckhart, L., C. Ballaun, M. Hermann, J. L. VandeBerg, W. Sipos, A. Uthman, H. Fischer and E. Tschachler (2008). "Identification of novel mammalian caspases reveals an important role of gene loss in shaping the human caspase repertoire." Mol Biol Evol **25**(5): 831-841.
- Faccio, L., C. Fusco, A. Chen, S. Martinotti, J. V. Bonventre and A. S. Zervos (2000). "Characterization of a novel human serine protease that has extensive homology to bacterial heat shock endoprotease HtrA and is regulated by kidney ischemia." J Biol Chem **275**(4): 2581-2588.
- Fern, R. and T. Moller (2000). "Rapid ischemic cell death in immature oligodendrocytes: a fatal glutamate release feedback loop." J Neurosci **20**(1): 34-42.
- Fitch, M. T. and J. Silver (2008). "CNS injury, glial scars, and inflammation: Inhibitory extracellular matrices and regeneration failure." Exp Neurol **209**(2): 294-301.
- Folkerth, R. D., R. L. Haynes, N. S. Borenstein, R. A. Belliveau, F. Trachtenberg, P. A. Rosenberg, J. J. Volpe and H. C. Kinney (2004). "Developmental lag in superoxide dismutases relative to other antioxidant enzymes in premyelinated human telencephalic white matter." J Neuropathol Exp Neurol **63**(9): 990-999.
- Formigli, L., L. Papucci, A. Tani, N. Schiavone, A. Tempestini, G. E. Orlandini, S. Capaccioli and S. Z. Orlandini (2000). "Aponecrosis: morphological and biochemical exploration of a syncretic process of cell death sharing apoptosis and necrosis." J Cell Physiol **182**(1): 41-49.
- Fragoso, G., A. K. Martinez-Bermudez, H. N. Liu, A. Khorchid, S. Chemtob, W. E. Mushynski and G. Almazan (2004). "Developmental differences in HO-induced oligodendrocyte cell death: role of glutathione, mitogen-activated protein kinases and caspase 3." J Neurochem **90**(2): 392-404.
- Franklin, R. J. and C. Ffrench-Constant (2008). "Remyelination in the CNS: from biology to therapy." Nat Rev Neurosci **9**(11): 839-855.

- Gallo, V., J. M. Mangin, M. Kukley and D. Dietrich (2008). "Synapses on NG2-expressing progenitors in the brain: multiple functions?" J Physiol **586**(16): 3767-3781.
- Galluzzi, L., K. Blomgren and G. Kroemer (2009). "Mitochondrial membrane permeabilization in neuronal injury." Nat Rev Neurosci **10**(7): 481-494.
- Gerstner, B., T. M. DeSilva, K. Genz, A. Armstrong, F. Brehmer, R. L. Neve, U. Felderhoff-Mueser, J. J. Volpe and P. A. Rosenberg (2008). "Hyperoxia causes maturation-dependent cell death in the developing white matter." J Neurosci **28**(5): 1236-1245.
- Golstein, P. and G. Kroemer (2005). "Redundant cell death mechanisms as relics and backups." Cell Death Differ **12 Suppl 2**: 1490-1496.
- Goretzki, L., C. R. Lombardo and W. B. Stallcup (2000). "Binding of the NG2 proteoglycan to kringle domains modulates the functional properties of angiostatin and plasmin(ogen)." J Biol Chem **275**(37): 28625-28633.
- Gorman, A. M. (2008). "Neuronal cell death in neurodegenerative diseases: recurring themes around protein handling." J Cell Mol Med **12**(6A): 2263-2280.
- Gourine, A. V. and S. Kasparov (2011). "Astrocytes as brain interoceptors." Exp Physiol **96**(4): 411-416.
- Graham, F. L., J. Smiley, W. C. Russell and R. Nairn (1977). "Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5." J Gen Virol **36**(1): 59-74.
- Gray, C. W., R. V. Ward, E. Karran, S. Turconi, A. Rowles, D. Viglienghi, C. Southan, A. Barton, K. G. Fantom, A. West, J. Savopoulos, N. J. Hassan, H. Clinkenbeard, C. Hanning, B. Amegadzie, J. B. Davis, C. Dingwall, G. P. Livi and C. L. Creasy (2000). "Characterization of human HtrA2, a novel serine protease involved in the mammalian cellular stress response." Eur J Biochem **267**(18): 5699-5710.
- Guo, F., J. Ma, E. McCauley, P. Bannerman and D. Pleasure (2009). "Early postnatal proteolipid promoter-expressing progenitors produce multilineage cells in vivo." J Neurosci **29**(22): 7256-7270.
- Gupta, S., R. Singh, P. Datta, Z. Zhang, C. Orr, Z. Lu, G. Dubois, A. S. Zervos, M. H. Meisler, S. M. Srinivasula, T. Fernandes-Alnemri and E. S. Alnemri (2004). "The C-terminal tail of presenilin regulates Omi/HtrA2 protease activity." The Journal of biological chemistry **279**(44): 45844-45854.

- Gupta, S., R. Singh, P. Datta, Z. Zhang, C. Orr, Z. Lu, G. Dubois, A. S. Zervos, M. H. Meisler, S. M. Srinivasula, T. Fernandes-Alnemri and E. S. Alnemri (2004). "The C-terminal tail of presenilin regulates Omi/HtrA2 protease activity." J Biol Chem **279**(44): 45844-45854.
- Haider, L., M. T. Fischer, J. M. Frischer, J. Bauer, R. Hoffberger, G. Botond, H. Esterbauer, C. J. Binder, J. L. Witztum and H. Lassmann (2011). "Oxidative damage in multiple sclerosis lesions." Brain **134**(Pt 7): 1914-1924.
- Hamilton, N., S. Vayro, R. Wigley and A. M. Butt (2010). "Axons and astrocytes release ATP and glutamate to evoke calcium signals in NG2-glia." Glia **58**(1): 66-79.
- Hegde, R., S. M. Srinivasula, Z. Zhang, R. Wassell, R. Mukattash, L. Cilenti, G. DuBois, Y. Lazebnik, A. S. Zervos, T. Fernandes-Alnemri and E. S. Alnemri (2002). "Identification of Omi/HtrA2 as a mitochondrial apoptotic serine protease that disrupts inhibitor of apoptosis protein-caspase interaction." J Biol Chem **277**(1): 432-438.
- Hernandez, M. R., O. A. Agapova, P. Yang, M. Salvador-Silva, C. S. Ricard and S. Aoi (2002). "Differential gene expression in astrocytes from human normal and glaucomatous optic nerve head analyzed by cDNA microarray." Glia **38**(1): 45-64.
- Horvitz, H. R. (1999). "Genetic control of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*." Cancer Res **59**(7 Suppl): 1701s-1706s.
- Huang, J. K., G. R. Phillips, A. D. Roth, L. Pedraza, W. Shan, W. Belkaid, S. Mi, A. Fex-Svenningsen, L. Florens, J. R. Yates, 3rd and D. R. Colman (2005). "Glial membranes at the node of Ranvier prevent neurite outgrowth." Science **310**(5755): 1813-1817.
- Iozzo, R. V. (1998). "Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function." Annu Rev Biochem **67**: 609-652.
- Itoh, T., A. Itoh and D. Pleasure (2003). "Bcl-2-related protein family gene expression during oligodendroglial differentiation." J Neurochem **85**(6): 1500-1512.
- Jacobson, M. D., M. Weil and M. C. Raff (1997). "Programmed cell death in animal development." Cell **88**(3): 347-354.
- Jones, J. M., R. L. Albin, E. L. Feldman, K. Simin, T. G. Schuster, W. A. Dunnick, J. T. Collins, C. E. Chrisp, B. A. Taylor and M. H. Meisler (1993). "mnd2: a new mouse model of inherited motor neuron disease." Genomics **16**(3): 669-677.
- Jones, J. M., P. Datta, S. M. Srinivasula, W. Ji, S. Gupta, Z. Zhang, E. Davies, G. Hajnoczky, T. L. Saunders, M. L. Van Keuren, T. Fernandes-Alnemri, M. H. Meisler

and E. S. Alnemri (2003). "Loss of Omi mitochondrial protease activity causes the neuromuscular disorder of mnd2 mutant mice." Nature **425**(6959): 721-727.

Joy, A. M., C. E. Beaudry, N. L. Tran, F. A. Ponce, D. R. Holz, T. Demuth and M. E. Berens (2003). "Migrating glioma cells activate the PI3-K pathway and display decreased susceptibility to apoptosis." J Cell Sci **116**(Pt 21): 4409-4417.

Jung, M., E. Kramer, M. Grzenkowski, K. Tang, W. Blakemore, A. Aguzzi, K. Khazaie, K. Chlichlia, G. von Blankenfeld, H. Kettenmann and et al. (1995). "Lines of murine oligodendroglial precursor cells immortalized by an activated neu tyrosine kinase show distinct degrees of interaction with axons in vitro and in vivo." Eur J Neurosci **7**(6): 1245-1265.

Juurlink, B. H. (1997). "Response of glial cells to ischemia: roles of reactive oxygen species and glutathione." Neurosci Biobehav Rev **21**(2): 151-166.

Juurlink, B. H., S. K. Thorburne and L. Hertz (1998). "Peroxide-scavenging deficit underlies oligodendrocyte susceptibility to oxidative stress." Glia **22**(4): 371-378.

Karimi-Abdolrezaee, S. and R. Billakanti (2012). "Reactive Astrogliosis after Spinal Cord Injury-Beneficial and Detrimental Effects." Mol Neurobiol.

Karram, K., S. Goebbels, M. Schwab, K. Jennissen, G. Seifert, C. Steinhauser, K. A. Nave and J. Trotter (2008). "NG2-expressing cells in the nervous system revealed by the NG2-EYFP-knockin mouse." Genesis **46**(12): 743-757.

Khorchid, A., G. Fragoso, G. Shore and G. Almazan (2002). "Catecholamine-induced oligodendrocyte cell death in culture is developmentally regulated and involves free radical generation and differential activation of caspase-3." Glia **40**(3): 283-299.

Kim, D. Y. and K. K. Kim (2005). "Structure and function of HtrA family proteins, the key players in protein quality control." J Biochem Mol Biol **38**(3): 266-274.

Kim, H., H. C. Tu, D. Ren, O. Takeuchi, J. R. Jeffers, G. P. Zambetti, J. J. Hsieh and E. H. Cheng (2009). "Stepwise activation of BAX and BAK by tBID, BIM, and PUMA initiates mitochondrial apoptosis." Mol Cell **36**(3): 487-499.

Kim, I., S. Rodriguez-Enriquez and J. J. Lemasters (2007). "Selective degradation of mitochondria by mitophagy." Arch Biochem Biophys **462**(2): 245-253.

Kim, S. J., T. Y. Yune, C. T. Han, Y. C. Kim, Y. J. Oh, G. J. Markelonis and T. H. Oh (2007). "Mitochondrial isocitrate dehydrogenase protects human neuroblastoma SH-SY5Y cells against oxidative stress." J Neurosci Res **85**(1): 139-152.

- Kirchhoff, F., R. Dringen and C. Giaume (2001). "Pathways of neuron-astrocyte interactions and their possible role in neuroprotection." Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci **251**(4): 159-169.
- Klupsch, K. and J. Downward (2006). "The protease inhibitor Ucf-101 induces cellular responses independently of its known target, HtrA2/Omi." Cell death and differentiation **13**(12): 2157-2159.
- Klupsch, K. and J. Downward (2006). "The protease inhibitor Ucf-101 induces cellular responses independently of its known target, HtrA2/Omi." Cell Death Differ **13**(12): 2157-2159.
- Kofuji, P. and E. A. Newman (2004). "Potassium buffering in the central nervous system." Neuroscience **129**(4): 1045-1056.
- Kroemer, G., W. S. El-Deiry, P. Golstein, M. E. Peter, D. Vaux, P. Vandenabeele, B. Zhivotovsky, M. V. Blagosklonny, W. Malorni, R. A. Knight, M. Piacentini, S. Nagata, G. Melino and D. Nomenclature Committee on Cell (2005). "Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death." Cell Death Differ **12 Suppl 2**: 1463-1467.
- Kroemer, G. and M. Jaattela (2005). "Lysosomes and autophagy in cell death control." Nat Rev Cancer **5**(11): 886-897.
- Kroemer, G. and S. J. Martin (2005). "Caspase-independent cell death." Nat Med **11**(7): 725-730.
- Kucharova, K. and W. B. Stallcup (2010). "The NG2 proteoglycan promotes oligodendrocyte progenitor proliferation and developmental myelination." Neuroscience **166**(1): 185-194.
- Kuhlmann, T., V. Miron, Q. Cui, C. Wegner, J. Antel and W. Bruck (2008). "Differentiation block of oligodendroglial progenitor cells as a cause for remyelination failure in chronic multiple sclerosis." Brain **131**(Pt 7): 1749-1758.
- Kukley, M., E. Capetillo-Zarate and D. Dietrich (2007). "Vesicular glutamate release from axons in white matter." Nat Neurosci **10**(3): 311-320.
- Kuninaka, S., M. Nomura, T. Hirota, S. Iida, T. Hara, S. Honda, N. Kunitoku, T. Sasayama, Y. Arima, T. Marumoto, K. Koja, S. Yonehara and H. Saya (2005). "The tumor suppressor WARTS activates the Omi / HtrA2-dependent pathway of cell death." Oncogene **24**(34): 5287-5298.
- Kuwana, T., M. R. Mackey, G. Perkins, M. H. Ellisman, M. Latterich, R. Schneider, D. R. Green and D. D. Newmeyer (2002). "Bid, Bax, and lipids cooperate to form

supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane." Cell **111**(3): 331-342.

Lafemina, M. J., R. A. Sheldon and D. M. Ferriero (2006). "Acute hypoxia-ischemia results in hydrogen peroxide accumulation in neonatal but not adult mouse brain." Pediatr Res **59**(5): 680-683.

Lamkanfi, M., N. Festjens, W. Declercq, T. Vanden Berghe and P. Vandenabeele (2007). "Caspases in cell survival, proliferation and differentiation." Cell Death Differ **14**(1): 44-55.

Lazebnik, Y. A., S. H. Kaufmann, S. Desnoyers, G. G. Poirier and W. C. Earnshaw (1994). "Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE." Nature **371**(6495): 346-347.

Lee, Y., B. M. Morrison, Y. Li, S. Lengacher, M. H. Farah, P. N. Hoffman, Y. Liu, A. Tsingalia, L. Jin, P. W. Zhang, L. Pellerin, P. J. Magistretti and J. D. Rothstein (2012). "Oligodendroglia metabolically support axons and contribute to neurodegeneration." Nature **487**(7408): 443-448.

Lemasters, J. J. (2005). "Dying a thousand deaths: redundant pathways from different organelles to apoptosis and necrosis." Gastroenterology **129**(1): 351-360.

Levine, J. M., R. Reynolds and J. W. Fawcett (2001). "The oligodendrocyte precursor cell in health and disease." Trends Neurosci **24**(1): 39-47.

Li, W., S. M. Srinivasula, J. Chai, P. Li, J. W. Wu, Z. Zhang, E. S. Alnemri and Y. Shi (2002). "Structural insights into the pro-apoptotic function of mitochondrial serine protease HtrA2/Omi." Nat Struct Biol **9**(6): 436-441.

Liddell, J. R., S. R. Robinson, R. Dringen and G. M. Bishop (2010). "Astrocytes retain their antioxidant capacity into advanced old age." Glia **58**(12): 1500-1509.

Lillien, L. E. and M. C. Raff (1990). "Differentiation signals in the CNS: type-2 astrocyte development in vitro as a model system." Neuron **5**(2): 111-119.

Lin, S. C., J. H. Huck, J. D. Roberts, W. B. Macklin, P. Somogyi and D. E. Bergles (2005). "Climbing fiber innervation of NG2-expressing glia in the mammalian cerebellum." Neuron **46**(5): 773-785.

Liu, F. T. and G. A. Rabinovich (2005). "Galectins as modulators of tumour progression." Nat Rev Cancer **5**(1): 29-41.

Liu, H. R., E. Gao, A. Hu, L. Tao, Y. Qu, P. Most, W. J. Koch, T. A. Christopher, B. L. Lopez, E. S. Alnemri, A. S. Zervos and X. L. Ma (2005). "Role of Omi/HtrA2 in

apoptotic cell death after myocardial ischemia and reperfusion." Circulation **111**(1): 90-96.

Liu, Z., H. Li, M. Derouet, A. Berezkin, T. Sasazuki, S. Shirasawa and K. Rosen (2006). "Oncogenic Ras inhibits anoikis of intestinal epithelial cells by preventing the release of a mitochondrial pro-apoptotic protein Omi/HtrA2 into the cytoplasm." J Biol Chem **281**(21): 14738-14747.

Lockshin, R. A. and Z. Zakeri (2004). "Apoptosis, autophagy, and more." Int J Biochem Cell Biol **36**(12): 2405-2419.

Majno, G. and I. Joris (1995). "Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death." Am J Pathol **146**(1): 3-15.

Mallon, B. S., H. E. Shick, G. J. Kidd and W. B. Macklin (2002). "Proteolipid promoter activity distinguishes two populations of NG2-positive cells throughout neonatal cortical development." J Neurosci **22**(3): 876-885.

Martins, L. M., I. Iaccarino, T. Tenev, S. Gschmeissner, N. F. Totty, N. R. Lemoine, J. Savopoulos, C. W. Gray, C. L. Creasy, C. Dingwall and J. Downward (2002). "The serine protease Omi/HtrA2 regulates apoptosis by binding XIAP through a reaper-like motif." J Biol Chem **277**(1): 439-444.

Martins, L. M., A. Morrison, K. Klupsch, V. Fedele, N. Moiso, P. Teismann, A. Abuin, E. Grau, M. Geppert, G. P. Livi, C. L. Creasy, A. Martin, I. Hargreaves, S. J. Heales, H. Okada, S. Brandner, J. B. Schulz, T. Mak and J. Downward (2004). "Neuroprotective role of the Reaper-related serine protease HtrA2/Omi revealed by targeted deletion in mice." Mol Cell Biol **24**(22): 9848-9862.

Martins, L. M., B. E. Turk, V. Cowling, A. Borg, E. T. Jarrell, L. C. Cantley and J. Downward (2003). "Binding specificity and regulation of the serine protease and PDZ domains of HtrA2/Omi." The Journal of biological chemistry **278**(49): 49417-49427.

Martins, L. M., B. E. Turk, V. Cowling, A. Borg, E. T. Jarrell, L. C. Cantley and J. Downward (2003). "Binding specificity and regulation of the serine protease and PDZ domains of HtrA2/Omi." J Biol Chem **278**(49): 49417-49427.

Missler, M., R. E. Hammer and T. C. Sudhof (1998). "Neurexophilin binding to alpha-neurexins. A single LNS domain functions as an independently folding ligand-binding unit." J Biol Chem **273**(52): 34716-34723.

Molina-Holgado, E., J. M. Vela, A. Arevalo-Martin and C. Guaza (2001). "LPS/IFN-gamma cytotoxicity in oligodendroglial cells: role of nitric oxide and protection by the anti-inflammatory cytokine IL-10." Eur J Neurosci **13**(3): 493-502.

- Murtie, J. C., Y. X. Zhou, T. Q. Le, A. C. Vana and R. C. Armstrong (2005). "PDGF and FGF2 pathways regulate distinct oligodendrocyte lineage responses in experimental demyelination with spontaneous remyelination." Neurobiol Dis **19**(1-2): 171-182.
- Nakagawa, T., S. Shimizu, T. Watanabe, O. Yamaguchi, K. Otsu, H. Yamagata, H. Inohara, T. Kubo and Y. Tsujimoto (2005). "Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death." Nature **434**(7033): 652-658.
- Nam, M. K., Y. M. Seong, H. J. Park, J. Y. Choi, S. Kang and H. Rhim (2006). "The homotrimeric structure of HtrA2 is indispensable for executing its serine protease activity." Exp Mol Med **38**(1): 36-43.
- Nave, K. A. (2010). "Myelination and support of axonal integrity by glia." Nature **468**(7321): 244-252.
- Nave, K. A. and B. D. Trapp (2008). "Axon-glia signaling and the glial support of axon function." Annu Rev Neurosci **31**: 535-561.
- Ness, J. K., M. J. Romanko, R. P. Rothstein, T. L. Wood and S. W. Levison (2001). "Perinatal hypoxia-ischemia induces apoptotic and excitotoxic death of periventricular white matter oligodendrocyte progenitors." Dev Neurosci **23**(3): 203-208.
- Nicotera, P., M. Leist and E. Ferrando-May (1998). "Intracellular ATP, a switch in the decision between apoptosis and necrosis." Toxicol Lett **102-103**: 139-142.
- Niehaus, A., J. Stegmüller, M. Diers-Fenger and J. Trotter (1999). "Cell-surface glycoprotein of oligodendrocyte progenitors involved in migration." J Neurosci **19**(12): 4948-4961.
- Nishiyama, A. (2007). "Polydendrocytes: NG2 cells with many roles in development and repair of the CNS." Neuroscientist **13**(1): 62-76.
- Nishiyama, A., M. Komitova, R. Suzuki and X. Zhu (2009). "Polydendrocytes (NG2 cells): multifunctional cells with lineage plasticity." Nat Rev Neurosci **10**(1): 9-22.
- Nishiyama, A., X. H. Lin, N. Giese, C. H. Heldin and W. B. Stallcup (1996). "Interaction between NG2 proteoglycan and PDGF alpha-receptor on O2A progenitor cells is required for optimal response to PDGF." J Neurosci Res **43**(3): 315-330.
- Nishiyama, A., X. H. Lin and W. B. Stallcup (1995). "Generation of truncated forms of the NG2 proteoglycan by cell surface proteolysis." Mol Biol Cell **6**(12): 1819-1832.

- Oka, A., M. J. Bellow, P. A. Rosenberg and J. J. Volpe (1993). "Vulnerability of oligodendroglia to glutamate: pharmacology, mechanisms, and prevention." J Neurosci **13**(4): 1441-1453.
- Ortega, A. and J. Moran (2011). "Role of cytoskeleton proteins in the morphological changes during apoptotic cell death of cerebellar granule neurons." Neurochem Res **36**(1): 93-102.
- Pallen, M. J. and B. W. Wren (1997). "The HtrA family of serine proteases." Mol Microbiol **26**(2): 209-221.
- Parras, C. M., C. Hunt, M. Sugimori, M. Nakafuku, D. Rowitch and F. Guillemot (2007). "The proneural gene Mash1 specifies an early population of telencephalic oligodendrocytes." J Neurosci **27**(16): 4233-4242.
- Parsons, D. W., S. Jones, X. Zhang, J. C. Lin, R. J. Leary, P. Angenendt, P. Mankoo, H. Carter, I. M. Siu, G. L. Gallia, A. Olivi, R. McLendon, B. A. Rasheed, S. Keir, T. Nikolskaya, Y. Nikolsky, D. A. Busam, H. Tekleab, L. A. Diaz, Jr., J. Hartigan, D. R. Smith, R. L. Strausberg, S. K. Marie, S. M. Shinjo, H. Yan, G. J. Riggins, D. D. Bigner, R. Karchin, N. Papadopoulos, G. Parmigiani, B. Vogelstein, V. E. Velculescu and K. W. Kinzler (2008). "An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme." Science **321**(5897): 1807-1812.
- Paukert, M. and D. E. Bergles (2006). "Synaptic communication between neurons and NG2+ cells." Curr Opin Neurobiol **16**(5): 515-521.
- Pekny, M. (2001). "Astrocytic intermediate filaments: lessons from GFAP and vimentin knock-out mice." Progress in brain research **132**: 23-30.
- Pluschke, G., M. Vanek, A. Evans, T. Dittmar, P. Schmid, P. Itin, E. J. Filardo and R. A. Reisfeld (1996). "Molecular cloning of a human melanoma-associated chondroitin sulfate proteoglycan." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(18): 9710-9715.
- Pop, C. and G. S. Salvesen (2009). "Human caspases: activation, specificity, and regulation." J Biol Chem **284**(33): 21777-21781.
- Raff, M. C. (1996). "Size control: the regulation of cell numbers in animal development." Cell **86**(2): 173-175.
- Raff, M. C., B. A. Barres, J. F. Burne, H. S. Coles, Y. Ishizaki and M. D. Jacobson (1993). "Programmed cell death and the control of cell survival: lessons from the nervous system." Science **262**(5134): 695-700.

- Raff, M. C., R. H. Miller and M. Noble (1983). "A glial progenitor cell that develops in vitro into an astrocyte or an oligodendrocyte depending on culture medium." Nature **303**(5916): 390-396.
- Raine, C. S. and E. Wu (1993). "Multiple sclerosis: remyelination in acute lesions." J Neuropathol Exp Neurol **52**(3): 199-204.
- Rathke-Hartlieb, S., U. Schlomann, P. Heimann, M. H. Meisler, H. Jockusch and J. W. Bartsch (2002). "Progressive loss of striatal neurons causes motor dysfunction in MND2 mutant mice and is not prevented by Bcl-2." Exp Neurol **175**(1): 87-97.
- Ricci, G., L. Volpi, L. Pasquali, L. Petrozzi and G. Siciliano (2009). "Astrocyte-neuron interactions in neurological disorders." J Biol Phys **35**(4): 317-336.
- Richardson, W. D., N. Kessaris and N. Pringle (2006). "Oligodendrocyte wars." Nat Rev Neurosci **7**(1): 11-18.
- Richardson, W. D., K. M. Young, R. B. Tripathi and I. McKenzie (2011). "NG2-glia as multipotent neural stem cells: fact or fantasy?" Neuron **70**(4): 661-673.
- Rivers, L. E., K. M. Young, M. Rizzi, F. Jamen, K. Psachoulia, A. Wade, N. Kessaris and W. D. Richardson (2008). "PDGFRA/NG2 glia generate myelinating oligodendrocytes and piriform projection neurons in adult mice." Nat Neurosci **11**(12): 1392-1401.
- Rubbo, H., A. Trostchansky and V. B. O'Donnell (2009). "Peroxynitrite-mediated lipid oxidation and nitration: mechanisms and consequences." Arch Biochem Biophys **484**(2): 167-172.
- Saelens, X., M. Kalai and P. Vandenabeele (2001). "Translation inhibition in apoptosis: caspase-dependent PKR activation and eIF2-alpha phosphorylation." J Biol Chem **276**(45): 41620-41628.
- Sakry, D., K. Karram and J. Trotter (2011). "Synapses between NG2 glia and neurons." J Anat **219**(1): 2-7.
- Salvesen, G. S. and S. J. Riedl (2008). "Caspase mechanisms." Adv Exp Med Biol **615**: 13-23.
- Sandvig, A., M. Berry, L. B. Barrett, A. Butt and A. Logan (2004). "Myelin-, reactive glia-, and scar-derived CNS axon growth inhibitors: expression, receptor signaling, and correlation with axon regeneration." Glia **46**(3): 225-251.
- Santello, M. and A. Volterra (2012). "TNFalpha in synaptic function: switching gears." Trends Neurosci.

- Savopoulos, J. W., P. S. Carter, S. Turconi, G. R. Pettman, E. H. Karran, C. W. Gray, R. V. Ward, O. Jenkins and C. L. Creasy (2000). "Expression, purification, and functional analysis of the human serine protease HtrA2." Protein Expr Purif **19**(2): 227-234.
- Schneider, S., F. Bosse, D. D'Urso, H. Muller, M. W. Sereda, K. Nave, A. Niehaus, T. Kempf, M. Schnolzer and J. Trotter (2001). "The AN2 protein is a novel marker for the Schwann cell lineage expressed by immature and nonmyelinating Schwann cells." J Neurosci **21**(3): 920-933.
- Schulze-Osthoff, K., D. Ferrari, M. Los, S. Wesselborg and M. E. Peter (1998). "Apoptosis signaling by death receptors." Eur J Biochem **254**(3): 439-459.
- Schwab, M. E. (2004). "Nogo and axon regeneration." Curr Opin Neurobiol **14**(1): 118-124.
- Seong, Y. M., J. Y. Choi, H. J. Park, K. J. Kim, S. G. Ahn, G. H. Seong, I. K. Kim, S. Kang and H. Rhim (2004). "Autocatalytic processing of HtrA2/Omi is essential for induction of caspase-dependent cell death through antagonizing XIAP." J Biol Chem **279**(36): 37588-37596.
- Sheng, M. and C. Sala (2001). "PDZ domains and the organization of supramolecular complexes." Annu Rev Neurosci **24**: 1-29.
- Shi, Y. (2002). "Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis." Mol Cell **9**(3): 459-470.
- Simon, C., M. Gotz and L. Dimou (2011). "Progenitors in the adult cerebral cortex: cell cycle properties and regulation by physiological stimuli and injury." Glia **59**(6): 869-881.
- Sofroniew, M. V. (2009). "Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation." Trends Neurosci **32**(12): 638-647.
- Sofroniew, M. V. and H. V. Vinters (2010). "Astrocytes: biology and pathology." Acta Neuropathol **119**(1): 7-35.
- Spiess, C., A. Beil and M. Ehrmann (1999). "A temperature-dependent switch from chaperone to protease in a widely conserved heat shock protein." Cell **97**(3): 339-347.
- Srinivasula, S. M., S. Gupta, P. Datta, Z. Zhang, R. Hegde, N. Cheong, T. Fernandes-Alnemri and E. S. Alnemri (2003). "Inhibitor of apoptosis proteins are substrates for the mitochondrial serine protease Omi/HtrA2." J Biol Chem **278**(34): 31469-31472.

- Stallcup, W. B. (1981). "The NG2 antigen, a putative lineage marker: immunofluorescent localization in primary cultures of rat brain." Dev Biol **83**(1): 154-165.
- Stallcup, W. B. and K. Dahlin-Huppe (2001). "Chondroitin sulfate and cytoplasmic domain-dependent membrane targeting of the NG2 proteoglycan promotes retraction fiber formation and cell polarization." J Cell Sci **114**(Pt 12): 2315-2325.
- Stallcup, W. B., K. Dahlin and P. Healy (1990). "Interaction of the NG2 chondroitin sulfate proteoglycan with type VI collagen." J Cell Biol **111**(6 Pt 2): 3177-3188.
- Stallcup, W. B. and F. J. Huang (2008). "A role for the NG2 proteoglycan in glioma progression." Cell Adh Migr **2**(3): 192-201.
- Stegmuller, J., H. Werner, K. A. Nave and J. Trotter (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**(6): 3590-3598.
- Steinbach, J. P. and M. Weller (2004). "Apoptosis in Gliomas: Molecular Mechanisms and Therapeutic Implications." J Neurooncol **70**(2): 247-256.
- Stelzer, S., K. Ebnet and J. C. Schwamborn (2010). "JAM-A is a novel surface marker for NG2-Glia in the adult mouse brain." BMC neuroscience **11**: 27.
- Stelzer, S., K. Ebnet and J. C. Schwamborn (2010). "JAM-A is a novel surface marker for NG2-Glia in the adult mouse brain." BMC Neurosci **11**: 27.
- Strauss, K. M., L. M. Martins, H. Plun-Favreau, F. P. Marx, S. Kautzmann, D. Berg, T. Gasser, Z. Wszolek, T. Muller, A. Bornemann, H. Wolburg, J. Downward, O. Riess, J. B. Schulz and R. Kruger (2005). "Loss of function mutations in the gene encoding Omi/HtrA2 in Parkinson's disease." Hum Mol Genet **14**(15): 2099-2111.
- Sundararajan, R., G. Chen, C. Mukherjee and E. White (2005). "Caspase-dependent processing activates the proapoptotic activity of deleted in breast cancer-1 during tumor necrosis factor-alpha-mediated death signaling." Oncogene **24**(31): 4908-4920.
- Suzuki, Y., Y. Imai, H. Nakayama, K. Takahashi, K. Takio and R. Takahashi (2001). "A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death." Mol Cell **8**(3): 613-621.

- Suzuki, Y., K. Takahashi-Niki, T. Akagi, T. Hashikawa and R. Takahashi (2004). "Mitochondrial protease Omi/HtrA2 enhances caspase activation through multiple pathways." Cell death and differentiation **11**(2): 208-216.
- Talbott, J. F., Q. Cao, J. Bertram, M. Nkansah, R. L. Benton, E. Lavik and S. R. Whitemore (2007). "CNTF promotes the survival and differentiation of adult spinal cord-derived oligodendrocyte precursor cells in vitro but fails to promote remyelination in vivo." Exp Neurol **204**(1): 485-489.
- Tillet, E., F. Ruggiero, A. Nishiyama and W. B. Stallcup (1997). "The membrane-spanning proteoglycan NG2 binds to collagens V and VI through the central nonglobular domain of its core protein." J Biol Chem **272**(16): 10769-10776.
- Trapp, B. D., A. Nishiyama, D. Cheng and W. Macklin (1997). "Differentiation and death of premyelinating oligodendrocytes in developing rodent brain." J Cell Biol **137**(2): 459-468.
- Tripathi, R. B., L. E. Rivers, K. M. Young, F. Jamen and W. D. Richardson (2010). "NG2 glia generate new oligodendrocytes but few astrocytes in a murine experimental autoimmune encephalomyelitis model of demyelinating disease." J Neurosci **30**(48): 16383-16390.
- Trotter, J., K. Karram and A. Nishiyama (2010). "NG2 cells: Properties, progeny and origin." Brain Res Rev **63**(1-2): 72-82.
- Uren, A. G., E. J. Coulson and D. L. Vaux (1998). "Conservation of baculovirus inhibitor of apoptosis repeat proteins (BIRPs) in viruses, nematodes, vertebrates and yeasts." Trends Biochem Sci **23**(5): 159-162.
- Vallstedt, A., J. M. Klos and J. Ericson (2005). "Multiple dorsoventral origins of oligodendrocyte generation in the spinal cord and hindbrain." Neuron **45**(1): 55-67.
- van Loo, G., M. van Gorp, B. Depuydt, S. M. Srinivasula, I. Rodriguez, E. S. Alnemri, K. Gevaert, J. Vandekerckhove, W. Declercq and P. Vandenabeele (2002). "The serine protease Omi/HtrA2 is released from mitochondria during apoptosis. Omi interacts with caspase-inhibitor XIAP and induces enhanced caspase activity." Cell Death Differ **9**(1): 20-26.
- Vande Walle, L., M. Lamkanfi and P. Vandenabeele (2008). "The mitochondrial serine protease HtrA2/Omi: an overview." Cell death and differentiation **15**(3): 453-460.
- Vande Walle, L., M. Lamkanfi and P. Vandenabeele (2008). "The mitochondrial serine protease HtrA2/Omi: an overview." Cell Death Differ **15**(3): 453-460.

- Vande Walle, L., P. Van Damme, M. Lamkanfi, X. Saelens, J. Vandekerckhove, K. Gevaert and P. Vandenabeele (2007). "Proteome-wide Identification of HtrA2/Omi Substrates." J Proteome Res **6**(3): 1006-1015.
- Vaux, D. L. and J. Silke (2005). "IAPs--the ubiquitin connection." Cell Death Differ **12**(9): 1205-1207.
- Ventura, R. E. and J. E. Goldman (2007). "Dorsal radial glia generate olfactory bulb interneurons in the postnatal murine brain." J Neurosci **27**(16): 4297-4302.
- Verhagen, A. M., J. Silke, P. G. Ekert, M. Pakusch, H. Kaufmann, L. M. Connolly, C. L. Day, A. Tikoo, R. Burke, C. Wrobel, R. L. Moritz, R. J. Simpson and D. L. Vaux (2002). "HtrA2 promotes cell death through its serine protease activity and its ability to antagonize inhibitor of apoptosis proteins." J Biol Chem **277**(1): 445-454.
- Verrier, F., B. Mignotte, G. Jan and C. Brenner (2003). "Study of PTPC composition during apoptosis for identification of viral protein target." Ann N Y Acad Sci **1010**: 126-142.
- Wake, H., P. R. Lee and R. D. Fields (2011). "Control of local protein synthesis and initial events in myelination by action potentials." Science **333**(6049): 1647-1651.
- Warf, B. C., J. Fok-Seang and R. H. Miller (1991). "Evidence for the ventral origin of oligodendrocyte precursors in the rat spinal cord." J Neurosci **11**(8): 2477-2488.
- Wei, M. C., W. X. Zong, E. H. Cheng, T. Lindsten, V. Panoutsakopoulou, A. J. Ross, K. A. Roth, G. R. MacGregor, C. B. Thompson and S. J. Korsmeyer (2001). "Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death." Science **292**(5517): 727-730.
- Wen, Y., I. T. Makagiansar, J. Fukushi, F. T. Liu, M. N. Fukuda and W. B. Stallcup (2006). "Molecular basis of interaction between NG2 proteoglycan and galectin-3." J Cell Biochem **98**(1): 115-127.
- Wolter, K. G., Y. T. Hsu, C. L. Smith, A. Nechushtan, X. G. Xi and R. J. Youle (1997). "Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis." J Cell Biol **139**(5): 1281-1292.
- Yang, J., M. A. Price, C. L. Neudauer, C. Wilson, S. Ferrone, H. Xia, J. Iida, M. A. Simpson and J. B. McCarthy (2004). "Melanoma chondroitin sulfate proteoglycan enhances FAK and ERK activation by distinct mechanisms." J Cell Biol **165**(6): 881-891.

Yang, Q. H., R. Church-Hajduk, J. Ren, M. L. Newton and C. Du (2003). "Omi/HtrA2 catalytic cleavage of inhibitor of apoptosis (IAP) irreversibly inactivates IAPs and facilitates caspase activity in apoptosis." Genes Dev **17**(12): 1487-1496.

Zamzami, N., S. A. Susin, P. Marchetti, T. Hirsch, I. Gomez-Monterrey, M. Castedo and G. Kroemer (1996). "Mitochondrial control of nuclear apoptosis." J Exp Med **183**(4): 1533-1544.

Zhang, Y., B. A. Appleton, P. Wu, C. Wiesmann and S. S. Sidhu (2007). "Structural and functional analysis of the ligand specificity of the HtrA2/Omi PDZ domain." Protein Sci **16**(8): 1738-1750.

Zhu, X., D. E. Bergles and A. Nishiyama (2008). "NG2 cells generate both oligodendrocytes and gray matter astrocytes." Development **135**(1): 145-157.

Ziskin, J. L., A. Nishiyama, M. Rubio, M. Fukaya and D. E. Bergles (2007). "Vesicular release of glutamate from unmyelinated axons in white matter." Nat Neurosci **10**(3): 321-330.

8 Anhang

8.1 Sequenzen

NG2del-HIS+

```

1 atgcttctcg gcccgggaca cccgctgtca gctccagccc tggccttggc tcttaccttg
61 gccttggttg tcagatctac agctcctgcc tccttcttcg gggagaacca cctggagggtg
121 cctgtgccct cagctctgac cagagtagac ctgctgctcc agttctccac atcccagccc
181 gaagccctgc tcctcttggc agcaggccaa gatgaccatc tcttgctcca gctccactca
241 ggatgcctcc aggtcagact tgccctggga cagaaggagc taaagctgca gacgccagca
301 gacaccgtgc tgagtgactc tgccccccac actgtagtgc tcaactgtctc cgacagctgg
361 gctgtgctgt ctgttgacgg agtgttgaac acctctgctc ccatccaag agcatcccac
421 ctcaaggcca cctacgggct ctctgtgggc tcctctggaa gccttgacct gccttacctg
481 aagggaatca gccgaccctc aaggggctgc ctccactcag ccattctcaa tggccgcaac
541 ctctccgctc cgctgacctc cgatgttcat gaaggttgtg ctgaagaatt ctctgctggt
601 gatgaagtgg gcctgggctt ctctgggccc cactcactgg ctgccttccc tgctggagc
661 actcgggagg aaggcaccct ggagtttacg ctccacctc ggagtcagca agcaccctg
721 gccttccaag caggggacaa gcgtggcaac tttatctacg tggacatatt tgagggccac
781 ttgcgggctg tggttgagaa aggccaaggt accatgctac tccgcaacag cgtgctgtg
841 gctgatgggc agccccacga ggtcagcgta cacatagatg ttcaccggct ggaaatctct
901 gtagaccaat accctacgcg tactttcaac cgtggggctc tcagctacct ggagccacgt
961 ggcagtctcc tccttggggg tctggacaca gaagcctctc gccacctcca agagcacctg
1021 ctgggcctgg caccgggggc tgccaatatc tcctggtag gctgcataga agatttcagt
1081 gttaatggca ggaggcaggg cctccgggat gcctggctga cccgtgacat gtcagcagga
1141 tgcaggcctg aggaggatga atatgaagaa gaggtctatg gcccatatga aactttctcc
1201 accctggcac cagaagcttg gccagccatg gaactgccag agccatgtat tcctgagccg
1261 ggactgcctg ctgtctttgc aaacttcacc cagctgctta ccatcagccc cctgggtggtg
1321 gccgagggtg gcacggcctg gcttgagtgg cggcacgtgc agcccacct ggacctgaca
1381 gaggcagagc tgcgcaagtc ccaggtgctg ttcagcgtga gccagagtgc acctgctggc
    gccCATCATCACCATCACCAC
                                     aaagg tggtttctg
6661 ggcttcttag aggccaad[at gttcagcatc atcattccgg tgtgcctgat cctcctgctc]
6721 [ctggccctta tcttgcctct gcacttctac ct]cgcaaac gcaacaagac gggcaagcac
6781 gatgtccagg tgttgaccgc caaacccgc aatggcctag ccggtgacac agagacctt
6841 cgaaaggtag agccaggcca agctattcca ctcataactg tgctggcca gggccctca
6901 ccaggaggcc agcctgacct agaactattg cagttttgcc ggacacccaa tcctgcctc
6961 aggaatggcc agta[ctgggt gtga]

```

NG2del-HIS-

1 atgcttctcg gcccgggaca cccgctgtca gctccagccc tggccttggc tcttaccttg
 61 gccttggttg tcagatctac agctcctgcc tccttcttcg gggagaacca cctggagggtg
 121 cctgtgccct cagctctgac cagagtagac ctgctgctcc agttctccac atcccagccc
 181 gaagccctgc tcctcttggc agcaggccaa gatgaccatc tcttgctcca gctccactca
 241 ggatgcctcc aggtcagact tgccctggga cagaaggagc taaagctgca gacgccagca
 301 gacaccgtgc tgagtgactc tgccccccac actgtagtgc tcaactgtctc cgacagctgg
 361 gctgtgctgt ctgttgacgg agtgttgaac acctctgctc ccatcccaag agcatcccac
 421 ctcaaggcca cctacgggct ctctgtgggc tcctctggaa gccttgacct gccttacctg
 481 aagggaaatca gccgaccctt aaggggctgc ctccactcag ccattctcaa tggccgcaac
 541 ctctccgctc cgctgacctc cgatgttcat gaaggttgtg ctgaagaatt ctctgctggt
 601 gatgaagtgg gcctgggctt ctctgggccc cactcactgg ctgccttccc tgctggagc
 661 actcgggagg aaggcaccct ggagtttacg ctccacctc ggagtcagca agcaccctg
 721 gccttccaag caggggacaa gcgtggcaac tttatctacg tggacatatt tgagggccac
 781 ttgcgggctg tggttgagaa aggccaaggt accatgctac tccgcaacag cgtgctgtg
 841 gctgatgggc agccccacga ggtcagcgta cacatagatg ttcaccggct ggaaatctct
 901 gtagaccaat accctacgcg tactttcaac cgtggggctc tcagctacct ggagccacgt
 961 ggcagtctcc tccttggggg tctggacaca gaagcctctc gccacctcca agagcaccgt
 1021 ctgggcctgg caccgggggc tgccaatatc tcctggtag gctgcataga agatttcaagt
 1081 gttaatggca ggaggcaggg cctccgggat gcctggctga cccgtgacat gtcagcagga
 1141 tgcaggcctg aggaggatga atatgaagaa gaggtctatg gcccatatga aactttctcc
 1201 accctggcac cagaagcttg gccagccatg gaactgccag agccatgtat tcctgagccg
 1261 ggactgcctg ctgtctttgc aaacttcaac cagctgctta ccatcagccc cctgggtggtg
 1321 gccgagggtg gcacggcctg gcttgagtgg cggcacgtgc agccccctt ggacctgaca
 1381 gaggcagagc tgcgcaagtc ccagggtctg ttcagcgtga gccagagtgc acctgctggc
 gcc**CATCATCACCATCACCAC**
 aaagg tggtttctcg
 6661 ggetttcttag aggccaaatggtcagcatc atcattccgg tgtgcctgat cctcctgctc
 6721 ctggccctta tcttgctctc gcacttctac ctccgcaaac gcaacaagac gggcaagcac
 6781 gatgtccagg tgttgaccgc caaacccgc aatggcctag ccggtgacac agagacctt
 6841 cgaaaggtag agccaggcca agctattcca ctcataactg tgctggcca gggccctca
 6901 ccaggaggcc agcctgacct agaactattg cagttttgcc ggacacccaa tcctgcctc
 6961 aggaatggcc agtaa-----

CATCATCACCATCACCAC**=HIS-Tag bzw.****CTTAACATGGGCGCCCGGGTCCGGGCT****=FLAG-Tag****-----****=deletiertes PDZ-Bindemotiv von NG2del-**

8.2 Verzeichnisse

8.2.1 Abkürzungsverzeichnis

a	Jahre
Abb.	Abbildung
Ak.	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
BBB	Blood-Brain-Barrier (Blut-Hirn-Schranke)
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	Rinderserum-Albumin (Bovine serum albumin)
bzw.	Beziehungsweise
ca.	Circa
CSF	Cerebrospinal-Flüssigkeit
d.h.	das heißt
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
dH₂O ddH₂O	destilliertes Wasser bzw. doppelt destilliertes Wasser
Dg	Deckgläser
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle Grundmedium
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (Deoxyribonucleic-Acid)
DTT	1,4-Dithiotreitol
EAE	Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis
ECL	verstärkte Chemilumineszenz (enhanced chemiluminescence)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatische Retikulum
et al.	und andere

EtOH	Ethanol
evtl.	Eventuell
FCS	Fötiales Kälberserum (fetal calf serum)
g	Gramm
g	relative Zentrifugalbeschleunigung
h	Stunde
HIS	Histidin
HRP	Meerrettich-Peroxidase (horseradish peroxidase)
HS	Pferdeserum (horse serum)
IAP	Inhibitor of Apoptosis Proteins
IMAC	Immobilized-Metalion-Affinity-Chromatography
IP	Immunpräzipitation
Kap.	Kapitel
kDa	Kilodalton
Konz.	Konzentrierte bzw. Konzentration
L	Liter
LB-Medium	Lysogeny-Broth
Lsg.	Lösung
M	Molar
mA	Milliampere
MAG	Myelin-assoziiertes Glykoprotein
MBP	Myelin basisches Protein
mc	Monoklonal
MCS	Multiple Cloning Site
MeOH	Methanol
Min.	Minuten
mind.	Mindestens
mM	Millimolar

MOG	Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein
mRNA	Messenger-RNA
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NaBut	Natrium-Butyrat
ng	Nanogramm
OD	Optische Dichte
OPC	Oligodendrozyten-Vorläufer Zellen (Oligodendrocytes-precursor-cells)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PBST	Phosphat-gepufferte Salzlösung mit Tween 20
pc	polyklonal
PDZ-Domäne	PSD95, Dlg1, Zo-1-Domäne
PFA	Paraformaldehyd
PLL	Poly-L-Lysin
PLP	Proteolipid-Protein
PNS	peripheres Nervensystem
ROS	Reactive oxygen species
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RT	Raumtemperatur
SB	Probenpuffer (Sample-buffer)
SDS	Natriumdodecylsulfat (Sodium-dodecyl-sulfate)
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Tab.	Tabelle
TE	Trypsin-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
Tween20	Polyoxyethylenmonosorbitanlaurat
u.a.	unter anderem
unverd.	unverdünnt

ü. N.	über Nacht
V	Volt
W	Watt
WB	Western-Blot
z. B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem

8.2.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2-1: Verschiedene Zelltypen im ZNS.....	5
Abbildung 2-2: Schematische Übersicht der Entwicklungsstadien von OPC.....	8
Abbildung 2-3: Domänenorganisation des NG2 Proteoglykan.....	11
Abbildung 2-4: Schematische Darstellung apoptotischer Signale von verschiedenen Organellen. ...	14
Abbildung 2-5: Extrinsischer (a) und intrinsischer (b) Signalweg der Apoptose	17
Abbildung 2-6: Mitochondriale-Membran-Permeabilisation (MMP).....	19
Abbildung 2-7: Organisation der Domänen von OMI/HtrA2	21
Abbildung 2-8: Zelluläre Funktionen und Lokalisation von OMI/HtrA2.....	24
Abbildung 3-1: OMI/HtrA2-FLAG Expressionsvektor	33
Abbildung 3-2: NG2del-Expressionsvektor	33
Abbildung 3-3: Schematischer Aufbau des Western-Blot Systems	45
Abbildung 3-4: Schematische Darstellung des Zell-ELISA	48
Abbildung 3-5: Schematische Darstellung des Protease Assay	51
Abbildung 4-1: Charakterisierung der Interaktion zwischen NG2 und OMI/HtrA2 mittels Y2H-Analyse.....	54
Abbildung 4-2: Immunpräzipitationen mit Oli-neu Zelllysaten bestätigen die Interaktion.....	55
Abbildung 4-3: Auswirkung verschiedener H ₂ O ₂ -Konzentrationen auf das Transmembranpotential von Mitochondrien (A) und die Bindung von OMI/HtrA2 an NG2 (B).....	59
Abbildung 4-4: NG2 wird von OMI/HtrA2 nicht proteolytisch prozessiert.....	61
Abbildung 4-5: NG2-Knockdown führt zur Reduktion der Zellviabilität	64
Abbildung 4-6: Protektiver Einfluss des PDZ-Bindemotivs von NG2 auf	

HEK293T Zellen unter oxidativem Stress	67
Abbildung 4-7: Auswirkung von oxidativem Stress auf verschiedene Zelltypen der Cerebellum Kulturen aus Wildtyp- und NG2-Knockout Mäusen	70
Abbildung 4-8: Ein OMI-Inhibitor neutralisiert den Unterschied in der Viabilität..... zwischen NG2-Knockdown und Kontrolle	73
Abbildung 4-9: Protektiver Effekt des OMI-Inhibitor auf den verstärkten Zelltod von NG2-Knockout-OPC	75
Abbildung 4-10: Die Interaktion mit NG2 reduziert die Proteaseaktivität von OMI/HtrA2	78
Abbildung 4-11: Gliose in der NG2-EYFP-Knockout Maus.....	81
Abbildung 5-1: Interaktion zwischen OMI/HtrA2 und NG2 vermindert bei oxidativem Stress die Induktion der Apoptose	89

8.2.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 3-1: Materialien	27
Tabelle 3-2: Technische Geräte	28
Tabelle 3-3: Chemikalien.....	29
Tabelle 3-4: Kits.....	29
Tabelle 3-5: Puffer, Nährmedien und Lösungen.....	31
Tabelle 3-6: Primäre Antikörper.....	32
Tabelle 3-7: Sekundäre Antikörper.....	32
Tabelle 3-8: Primer	34
Tabelle 3-9: Co-Immunpräzipitationen mit verschiedenen Antikörpern.....	43
Tabelle 3-10: Pipettierschema von Trenn- und Sammelgel für SDS-Page.....	44
Tabelle 4-1: Signalabnahmen in WB-Analysen von Markerproteinen für OPC unter oxidativem Stress	76

8.3 Publikationen

In Bearbeitung:

The mitochondrial serine protease OMI/HtrA2 interacts with the NG2-protein expressed by oligodendrocyte progenitor cells: a role for NG2 in stress-protection

Frank Maus¹, Khalad Karram¹, Fabien Binamé¹, Dominik Sakry¹, Eva-Maria Krämer-Albers¹, Krishnaraj Rajalingam², Reijko Krüger³, Judith Stegmüller⁴, Hauke Werner⁴, Klaus Armin Nave⁴ and Jacqueline Trotter^{1*}

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

² Institute für Biochemie II, Clinic of the Goethe University, Frankfurt

³ Department of Neurodegenerative Diseases, Hertie-Institute for Clinical Brain Research, University of Tübingen, Germany

⁴ Max Planck Institute of Experimental Medicine, Göttingen, Germany

8.4 Kongressbeiträge

Glia in Health & Diseases, Cold Spring Harbor New York (2010)

The mitochondrial serine protease OMI/HtrA2 binds to the NG2 protein expressed by oligodendrocyte progenitor cells: a role for NG2 in stress-protection?

Biennial Meeting of the Rhine-Main Neuroscience network (*rmn²*), Oberwesel (2010)

The mitochondrial serine protease OMI/HtrA2 binds to the NG2 protein expressed by oligodendrocyte progenitor cells: a role for NG2 in stress-protection?

FTN/IAK Symposium: Molecular and Cellular Neuroscience, Mainz (2011)

The mitochondrial serine protease OMI/HtrA2 binds to the NG2 protein expressed by oligodendrocyte progenitor cells: a role for NG2 in homeostasis?

Biennial Meeting of the Rhine-Main Neuroscience network (*rmn²*), Oberwesel (2012)

The mitochondrial serine protease OMI/HtrA2 binds to the NG2 protein expressed by oligodendrocyte progenitor cells: a role for NG2 in homeostasis?

8.5 Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Name	Frank Maus
Geburtsdatum	10.12.1973
Geburtsort	Saarbrücken
Familienstand	Verheiratet
Staatsangehörigkeit	Deutsch

Schulbildung

1984-1990	<u>Realschule Heusweiler</u> Mittlere Reife
1996-2000	<u>Saarland Kolleg: Abitur auf zweitem Bildungsweg</u> Allgemeine Hochschulreife 30.06.2000

Berufsausbildung

1990-1994	<u>ZF Getriebe AG, Saarbrücken</u> Abschluss: Industriemechaniker/Fachrichtung Produktionstechnik
-----------	---

Studium

2000-2007	<u>Studium der Biologie an der Johannes Gutenberg Universität Mainz</u> Abschluss: Diplom (Zoologie, Molekulare Biophysik, Physiologische Chemie) Diplomarbeit unter Leitung von Prof. Dr. Jacqueline Trotter, Molekulare Zellbiologie Thema: <i>Multiple Sklerose und das NG2 Proteoglykan: Detektion von NG2 Antikörpern im Zerebrospinal-Liquor</i>
-----------	---

Promotion

Okt 2007-Sept 2012	<u>Promotion unter Leitung von Prof. Dr. Jacqueline Trotter, Molekulare Zellbiologie</u> Thema: <i>Die Interaktion zwischen OMI/HtrA2 und NG2 in oligodendroglialen Vorläuferzellen: NG2 und Homöostase?</i>
--------------------	---

8.6 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Frank Maus, geboren am 10.12.1973 in Saarbrücken, dass ich meine Dissertation selbständig und unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Ich habe keinen anderen Promotionsversuch unternommen.

Mainz, _____

(Frank Maus)