

„Posttranskriptionale Regulation von Myelin-mRNAs“

Dissertation zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften

Am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

von

Christina Müller

geb. am 02.10.1984 in Siegen

Mainz, August 2015

1 Inhaltsverzeichnis

1 Inhaltsverzeichnis..... 1

2 Einleitung 5

2.1 Das Nervensystem 5

2.1.1 Zellen des zentralen Nervensystems..... 5

2.1.1.1 Herkunft, Entwicklung und Regulation von Oligodendrozyten 7

2.1.1.2 Funktion von Oligodendrozyten..... 10

2.1.1.3 Myelinisierung im ZNS 12

2.1.1.4 Die Rolle des Myelin Basischen Proteins während der Myelinisierung im ZNS..... 14

2.1.1.4.1 hnRNP A2-Signalweg und lokale Translation von MBP 15

2.1.1.4.1.1 Die Fyn Kinase 17

2.1.2 Zellen des peripheren Nervensystems..... 20

2.1.2.1 Herkunft, Entwicklung und Regulation von Schwann Zellen 20

2.1.2.2 Funktion von Schwann Zellen 22

2.1.2.3 Myelinisierung im PNS 23

2.1.2.4 Regulation der Myelinisierung im PNS..... 25

2.2 Kleine nicht-codierende RNAs im Nervensystem 27

2.2.1 Unterschiedliche Formen von sncRNAs 28

2.2.2 Herkunft und Reifung von sncRNAs 28

2.2.3 Translationale Regulation durch sncRNAs 31

2.2.3.1 Argonaut-Proteine 31

2.2.3.1.1 Regulation von Argonaut-Proteinen 33

2.2.3.1.2 Argonaut-Proteine in Oligodendrozyten..... 33

2.2.4 Kleine nicht-codierende RNA 715 34

2.2.4.1 Translationale Regulation der *Mbp* mRNA durch sncRNA 715 in Oligodendrozyten 34

2.3 Zielsetzung 35

3 Material und Methoden 36

3.1 Materialien und Geräte 36

3.2 Puffer und Medien 37

3.3 Antikörper 39

3.3.1 Primäre Antikörper..... 39

3.3.2 Sekundäre Antikörper 40

3.4	Plasmide, Primer, LNA-Sonden, 715-mimic	40
3.5	Zellkulturen	43
3.5.1	Kultivierung von HEK293T Zellen	43
3.5.2	Kultivierung von Oli- <i>neu</i> Zellen	43
3.5.3	Kultivierung von IMS32 Zellen.....	43
3.5.4	Herstellung und Kultivierung von primären Oligodendrozyten.....	43
3.5.5	Herstellung und Kultivierung von primären Schwann Zellen.....	44
3.6	Herstellung von Gesamtlysaten aus optischen Nerven	45
3.7	Transfektionen	45
3.7.1	Transiente Transfektion von Oli- <i>neu</i> und HEK293T Zellen.....	45
3.7.2	Herstellung einer stabil exprimierenden hnRNP A2b-FLAG Oli- <i>neu</i> Zelllinie.....	45
3.7.3	Transiente Transfektion von kleinen RNAs	46
3.8	RNA Analyse	46
3.8.1	RNA-Extraktion aus kultivierten Zellen	46
3.8.2	cDNA-Synthese.....	46
3.8.3	Quantitative Realtime-PCR.....	47
3.8.3.1	Analyse der Ago-Isoformen mittels SYBR-Green Assays.....	47
3.8.3.2	Analyse von <i>Mbp</i> und <i>G6PDH</i> mRNA mittels TaqMan basierter qPCR.....	47
3.8.3.3	Analyse der sncRNA715 Expression mittels TaqMan basierter qPCR.....	47
3.8.3.4	Relative Quantifizierung nach der $\Delta\Delta C_t$ -Methode	48
3.8.3.5	Absolute Quantifizierung der sncRNA715	49
3.8.4	Northern Blot	49
3.9	DNA-Analysen	50
3.9.1	Nachweis der Ago-Isoformen in oligodendroglialen Zellen mittels Endpunkt-PCR	50
3.9.2	Auswertung der PCR-Reaktionen durch Agarosegelelektrophorese	50
3.9.3	Zielgerichtete Mutagenese	50
3.9.4	Herstellung der Myc/His-getagten Ago2-Konstrukte.....	51
3.9.5	Plasmidpräparation (Mini-/ Maxi-Präparation)	51
3.10	Proteinbiochemie.....	52
3.10.1	Herstellung von Zelllysaten	52
3.10.2	Aufreinigung von Proteinkomplexen mithilfe von Immunpräzipitationen.....	52
3.10.2.1	Immunpräzipitation von FLAG-getagten Proteinen.....	52
3.10.2.1.1	Extraktion der gebundenen RNAs aus FLAG-IPs.....	52
3.10.2.2	Immunpräzipitation von Myc/His-getagten Proteinen.....	53

3.10.2.3	Immunpräzipitation von endogenem hnRNP A2	53
3.10.3	SDS-PAGE und Western Blot	53
3.10.4	Immunzytochemie.....	54
3.10.4.1	Quantifizierung von Colokalisation in Cofärbungen	54
4	Ergebnisse	56
4.1	Expression und Regulation von Argonaut-Proteinen in Oligodendrozyten.....	56
4.1.1	Argonaut Expression in Oligodendrozyten.....	56
4.1.1.1	Expression der mRNAs von <i>Ago1</i> , <i>2</i> , <i>3</i> und <i>4</i> in <i>Oli-neu</i> und OPCs	56
4.1.1.2	Argonaut-Proteine <i>Ago1</i> und <i>Ago2</i> werden in <i>Oli-neu</i> Zellen und primären Oligodendrozyten synthetisiert	59
4.1.1.3	<i>Ago1</i> und <i>Ago2</i> können im murinen Nervus opticus nachgewiesen werden	60
4.1.1.4	<i>Ago2</i> ist in granulären Strukturen in oligodendroglialen Ausläufern lokalisiert.....	61
4.1.2	Colokalisation von hnRNP A2 und <i>Ago2</i>	62
4.1.2.1	<i>Ago2</i> und hnRNP A2 colokalisieren in granulären Strukturen in <i>Oli-neu</i> Zellen	63
4.1.2.2	<i>Ago2</i> und hnRNP A2 colokalisieren in primären Oligodendrozyten in den Rändern der Myelinmembranen	63
4.1.2.3	<i>Ago2</i> und hnRNP A2 interagieren in <i>Oli-neu</i> Zellen	65
4.1.3	<i>SncRNA715</i> und <i>Mbp</i> mRNA binden an <i>Ago2</i>	67
4.1.4	Argonaut-Proteine interagieren mit der Src-Kinase <i>Fyn</i>	69
4.1.5	Argonaut-Proteine werden von <i>Fyn</i> phosphoryliert	70
4.1.5.1	Phosphorylierung von Ago-Proteinen in HEK293T Zellen.....	70
4.1.5.2	Phosphorylierung von <i>Ago2</i> in <i>Oli-neu</i> Zellen.....	72
4.1.6	Phosphomutanten von FLAG/HA- <i>Ago2</i> an der Position Y393F und Y529F werden weiterhin phosphoryliert	74
4.1.7	Phosphorylierung der <i>Ago2</i> -Expressionskonstrukte ist unabhängig von dem assoziierten Tag.....	76
4.1.8	Hat die <i>Fyn</i> -abhängige Phosphorylierung von <i>Ago2</i> einen Einfluss auf die Bindung zur <i>sncRNA 715</i> ?.....	77
4.2	<i>SncRNA715</i> in Schwann Zellen.....	78
4.2.1	Translationale Repression von <i>Mbp</i> in der Schwann Zelllinie IMS32	79
4.2.2	Expression von <i>sncRNA715</i> in der Schwann Zelllinie IMS32 und in primären Schwann Zellen	80
4.2.3	Differenzierung von primären Schwann Zellen <i>in vitro</i>	81
4.2.4	Regulation der <i>sncRNA 715</i> in differenzierten Schwann Zellen <i>in vitro</i>	82
4.2.5	MBP Proteinmengen lassen sich durch Überexpression der <i>sncRNA715</i> reduzieren ...	83
5	Diskussion	86

5.1	Argonaut-Proteine in Oligodendrozyten	87
5.1.1	Argonaut-Proteine und der <i>Mbp</i> mRNA Lokalisationsweg	88
5.1.2	Ago2 wird von der Src-Kinase Fyn phosphoryliert	89
5.1.3	Derepression der miRNA-abhängigen translationalen Regulation von mRNAs.....	91
5.1.4	Deregulation von Ago2 Proteinen verursacht schwerwiegende Erkrankungen	92
5.2	MiRNA-abhängige translationale Regulation im peripheren Nervensystem	93
5.2.1	Translationale Regulation von <i>Mbp</i> mRNA durch sncRNA715 in Schwann Zellen	94
5.2.2	Regulation der Myelin-Genexpression nach axo-glialem Kontakt im peripheren Nervensystem	95
5.3	Ausblick	96
6	Zusammenfassung	99
7	Summary	100
8	Abkürzungen	101
9	Referenzen	102
10	Anhang	123
10.1	Quantifizierung der Colokalisation von Ago2 mit hnRNP A2 bzw. Fyn-Kinase	123

2 Einleitung

2.1 Das Nervensystem

Das Nervensystem besteht aus zwei miteinander kommunizierenden Untereinheiten, dem zentralen (ZNS) und peripheren Nervensystem (PNS). Das zentrale Nervensystem verarbeitet sensorische Informationen aus der Peripherie (Rezeptor) und gibt wiederum motorische Befehle zurück an das periphere Nervensystem (Effektor).

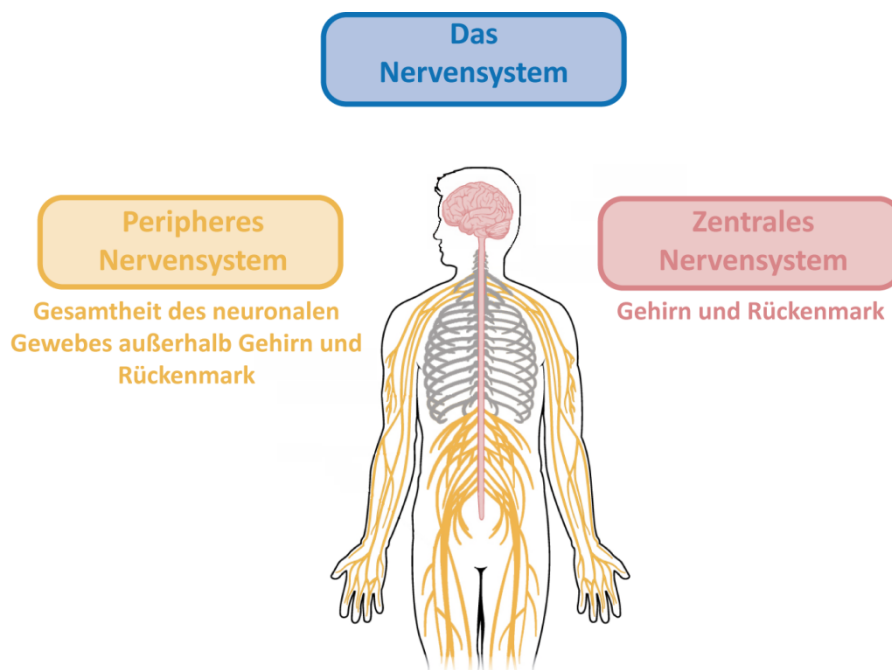


Abbildung 1: Das Nervensystem

Das Nervensystem von Vertebraten teilt sich auf in das Periphere Nervensystem (PNS, in Gelb dargestellt) und das zentrale Nervensystem (ZNS, in Rot dargestellt). Zum ZNS gehören das Gehirn und das Rückenmark und zum PNS alle außerhalb liegenden neuronalen Gewebe (modifiziert nach http://en.wikipedia.org/wiki/Central_nervous_system).

Das zentrale Nervensystem besteht aus dem Gehirn und dem daran anschließenden Rückenmark und es kann makroskopisch in die weiße und graue Substanz unterteilt werden. Die graue Substanz enthält Zellkörper von Neuronen, die weiße Substanz umfasst die Gesamtheit der Nervenzellfortsätze. Die Gesamtheit des Gewebes, welches nicht dem ZNS zugeordnet werden kann, wird als peripheres Nervensystem bezeichnet. Aus dem PNS aufgenommene, sensorische Informationen werden im ZNS integriert und entsprechende Antworten generiert, welche wiederum an das PNS weitergegeben und ausgeführt werden.

2.1.1 Zellen des zentralen Nervensystems

Im zentralen Nervensystem werden grundsätzlich zwei Zelltypen unterschieden. Zum einen Neurone und zum anderen Gliazellen.

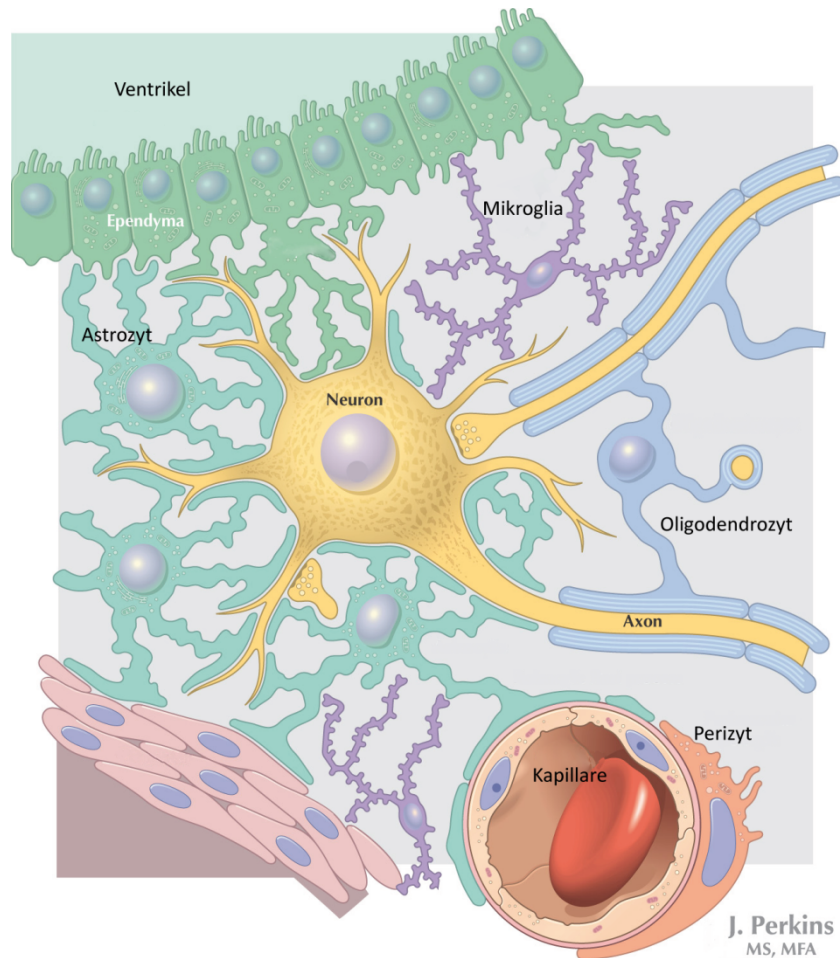


Abbildung 2: Zellen des zentralen Nervensystems

Das zentrale Nervensystem setzt sich zusammen aus Neuronen und Gliazellen. Neurone (gelb) bilden das elektrisch erregbare Netzwerk im Gehirn, welches Informationen verarbeitet und weitergibt. Zu den Gliazellen gehören Astrozyten (Türkis), Mikroglia (violett) und Oligodendrozyten (blau). Die Interaktion von Gliazellen mit benachbarten Neuronen beeinflusst das neuronale Netzwerk und trägt zum Überleben der Neurone bei (modifiziert nach pocketdentistry.com).

Neurone sind polare, elektrisch erregbare Zellen, die entlang eines gerichteten Membranpotentials elektrische Signale weiterleiten können, welche in spezifischen Hirnarealen verarbeitet werden und individuelle Antworten auslösen (in Abbildung 2 in Gelb dargestellt). Neurone besitzen einen universellen Aufbau. Sie bestehen aus einem Zellkörper, von dem zwei unterschiedliche Formen an Ausläufern abgehen. Die verzweigten Dendriten nehmen Informationen über einen spezialisierten Bereich der Zelloberfläche, die Post-Synapse, von anderen Zellen auf und geben diese über das Soma weiter in eine andere Ausläuferform, das Axon. In der Regel besitzt ein Neuron nur ein Axon, wodurch eine gerichtete Signalweiterleitung gewährleistet wird. Am Axon wird das Signal an einem spezialisierten Membranbereich, der Prä-Synapse, auf andere Zellen übertragen. Die Geschwindigkeit dieser gerichteten Reizweiterleitung hängt vom Durchmesser des Axons ab, je größer der Durchmesser des Axons, desto schneller die Reizweiterleitung (Hartline and Colman, 2007).

Der zweiten Zellform, den Gliazellen, wurde viele Jahre nur eine Stützfunktion innerhalb des neuronalen Netzwerkes unterstellt. Wie sich allerdings, dank andauernder Forschung, mehr und mehr herausstellt, üben die verschiedenen Gliazellen weit wichtigere Funktionen aus. Die Gesamtzahl an Gliazellen und Neuronen und deren genaues Verhältnis zueinander ist bislang noch

umfangreich diskutiert (Hilgetag and Barbas, 2009). Bisher wurde angenommen, dass 10mal mehr Gliazellen als Neurone im menschlichen Gehirn existieren, allerdings bleibt die genaue Herkunft dieser Informationen ungewiss (Bear et al., 2008). Es wurden allerdings mehrere Studien veröffentlicht, in denen ein deutlich geringeres Verhältnis von Gliazellen zu Neuronen beobachtet wurde, wobei die Zahlen in den unterschiedlichen Hirnregionen deutlich schwanken (Dombrowski et al., 2001; Kuskys and Colonnier, 1982; Lidow and Song, 2001; Christensen et al., 2007; Azevedo et al., 2009).

Gliazellen werden anhand ihrer Größe in zwei Gruppen unterteilt, Makroglia und Mikroglia. Mikrogliazellen sind an aktiven Immunantworten im Gehirn beteiligt (in Abbildung 2 in Violett dargestellt). Durch die Blut-Hirn-Schranke ist das Gehirn vom Rest des Körpers isoliert und damit auch weitgehend vom peripheren Immunsystem abgegrenzt (Obermeier et al., 2013). Mikroglia sorgen durch Bildung und Abgabe von proinflammatorischen Faktoren für die Entfernung und Verwertung von Zelltrümmern im zentralen Nervensystem. Außerdem wird vermutet, dass sie unpassende synaptische Verbindungen durch Phagozytose entfernen können (Allen and Barres, 2009). An der Bildung der Blut-Hirn-Schranke sind außerdem Perizyten beteiligt (in Abbildung 2 hellrot dargestellt). Sie ummanteln die Blutkapillare und verhindern damit eine ungerichtete Diffusion von Stoffen in die Hirnregionen (Obermeier et al., 2013).

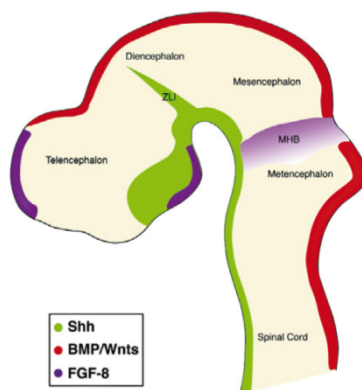
Zu den Makroglia gehören Oligodendrozyten, Astrozyten, NG2 positive Zellen und Ependymzellen. Astrozyten verdanken ihren Namen ihrer meist sternförmigen Morphologie (in Abbildung 2 in Türkis dargestellt). Sie kontrollieren die Formation, Reifung, Funktionalität und den Abbau von Synapsen während der Entwicklung des neuronalen Netzwerkes. Sie scheinen außerdem eine bedeutende Rolle bei neurologischen Erkrankungen zu spielen, welche aus Defekten innerhalb der Synapse resultieren (Clarke and Barres, 2013). In den letzten Jahren konnte ein weiterer glialer Zelltyp des zentralen Nervensystems identifiziert werden, die NG2+ Zellen. Bis vor einiger Zeit wurden diese Zellen als Oligodendrozyten-Vorläuferzellen deklariert und ihnen wurde keine weitere Funktion zugeschrieben. Allerdings stellte sich heraus, dass NG2+ Zellen sehr spezialisierte Zellen darstellen, welche synaptische Verbindungen von Neuronen erhalten und damit wahrscheinlich in das neuronale Netzwerk integriert sind (Sakry et al., 2011; Nishiyama et al., 2009; Sakry et al., 2014). Ependymzellen grenzen die Hirnventrikel ab und sorgen für die Zirkulation der Cerebrospinalflüssigkeit (in Abbildung 2 in Grün dargestellt).

Der vierte makrogliale Zelltyp umfasst die Oligodendrozyten (in Abbildung 2 blau dargestellt). Sie sind die myelinisierenden Zellen im ZNS. Da sich ein Großteil der vorliegenden Arbeit mit diesem Zelltyp beschäftigt, wird dieser in den folgenden Abschnitten genauer beschrieben.

2.1.1.1 Herkunft, Entwicklung und Regulation von Oligodendrozyten

Oligodendrozyten werden in drei aufeinanderfolgenden Wellen generiert. Im Rückenmark von Nagetieren beginnt die Bildung von Oligodendrozyten-Vorläuferzellen (*oligodendrocyte precursor cells*, OPC) im ventralen Neuroepithelium innerhalb einer Vorläuferdomäne etwa am embryonalen Tag (E) 12,5. Die zweite Welle der Oligodendrozyten-Bildung beginnt etwa an E15,5 in mehr dorsalen Bereichen und nach der Geburt werden in einer dritten und letzten Welle weitere Vorläuferzellen an einem bisher unbekanntem Ursprung gebildet (Pringle et al., 1996; Lu et al., 2000; Cai et al., 2005; Fogarty et al., 2005; Rowitch and Kriegstein, 2010). Im Großhirn werden Oligodendrozyten in der

ersten Welle in der medialen ganglionären Eminenz im ventralen Telencephalon bei E12,5 gebildet. In der zweiten Welle geht die Bildung von der lateralen und kaudalen ganglionären Eminenz bei E15,5 aus und in der dritten Welle nach der Geburt startet die Bildung von oligodendroglialen Vorläuferzellen direkt im Cortex (Olivier et al., 2001; Spassky et al., 2002; Tekki-kessarar et al., 2001; Kessarar et al., 2006). Die Bildung und darauffolgende Migration von OPCs in die unterschiedlichen Hirnareale hängt von verschiedenen extrazellulären Signalen ab.



(Maus Embryo E11,5)

Abbildung 3: Morphogenverteilung im embryonalen Mausgehirn

Sagittale Ansicht eines Mausgehirns am embryonalen Tag 11,5 (E11,5). Gezeigt ist die räumliche Verteilung der Morphogene *Sonic hedgehog* (Shh, grün), *bone morphogenic factor* (BMP, rot) und *Fibroblast growth factor 8* (FGF-8, lila). Shh wird von der ventralen Seite des Neuralrohrs sezerniert, während BMP auf der dorsalen Seite exprimiert wird. FGF-8 wird am stärksten an der Grenze zwischen Mesencephalon und Metencephalon exprimiert (*midbrain-hindbrain boundary* (MHB)) (Mitew et al., 2014).

An der ventralen Seite wird das Morphogen Sonic hedgehog (Shh) vom Notochord sezerniert, bindet an den Notch1-Rezeptor auf der Oberfläche der Vorläuferzelle und induziert die Expression zweier Transkriptionsfaktoren, Nkx6 und Olig2, welche wiederum die erste Welle der Oligodendrozyten-Generation starten (Pringle et al., 1996; Orentas et al., 1999). Dieser Effekt wird auf der dorsalen Seite durch die Expression des Knochenmorphogenetischen Proteins (*bone morphogenetic protein*, BMP) sowie Wnt/ β Catenin antagonisiert. Es wird außerdem ein Shh unabhängiger Signalweg beschrieben, in dem der Fibroblasten-Wachstumsfaktor (*fibroblast growth factor*, FGF) eine Rolle spielt (siehe Abbildung 3) (Mehler et al., 2000; Robertson et al., 2004). Zur Definition der unterschiedlichen dorso-ventralen Domänen sind verschiedene Transkriptionsfaktoren von Bedeutung wie PAX6, Olig2, Nkx2.2, Nkx6.1 und 6.2. Diese werden als Antwort auf den BMP/Wnt-Gradienten aktiviert (Vallstedt et al., 2005). Der bisher am umfangreichsten untersuchte Transkriptionsfaktor ist der Helix-loop-Helix-Transkriptionsfaktor Olig2. Er wird durch das ventral sezernierte Shh aktiviert und

der Knockout zeigt die Reduktion von OPCs in den meisten Hirnregionen, wobei die OPC Generation nicht komplett verhindert wird, was möglicherweise daran liegt, dass die Funktionen von Olig2 von dem sehr ähnlichen Transkriptionsfaktor Olig1 übernommen werden können (Lu et al., 2002).

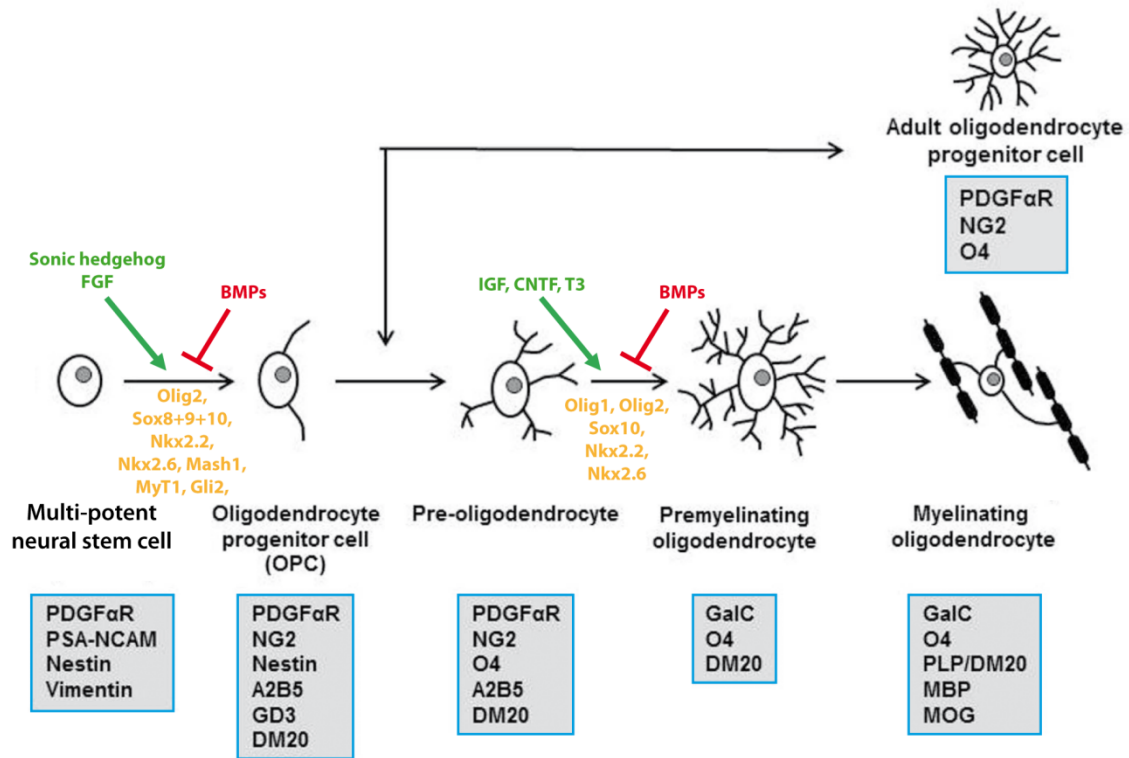


Abbildung 4: Entwicklung und Regulation von Oligodendrozyten

Oligodendrozyten entwickeln sich aus multipotenten neuronalen Stammzellen über Oligodendrozyten-Vorläuferzellen (*oligodendrocyte progenitor cell, OPC*) zu Prä-Oligodendrozyten (*pre-oligodendrocyte*) weiter zu prämyelinisierenden Oligodendrozyten (*premyelinating oligodendrocyte*), aus welchen anschließend reife myelinisierende Oligodendrozyten entstehen (*myelinating oligodendrocyte*). Eine Teilmenge der OPCs verbleibt als adulte OPCs (NG+ Zellen) im Stadium der Vorläuferzelle. Jedes Stadium wird durch verschiedene Markerproteine ausgezeichnet, welche in den blau umrandeten Boxen aufgeführt sind. Die Reifung ist abhängig von verschiedenen Faktoren. In Grün sind die fördernden, in rot die hemmenden Faktoren und in Gelb sind die jeweils wichtigen regulierenden Transkriptionsfaktoren der Reifungsstadien markiert (modifiziert nach Miron et al., 2011; Schumacher et al., 2012).

Die weitere Entwicklung der oligodendroglialen Zellen wird zeitlich sowie räumlich sehr genau reguliert (siehe Abbildung 4). Signale, die die Differenzierung der Zellen fördern, hemmen in der Regel gleichzeitig die Proliferation und umgekehrt (Wang et al., 2007). Folgende extrazelluläre Mitogene begünstigen die Proliferation und sichern das Überleben der Zelle: PDGF-A (*platelet-derived growth factor A*), welcher an die PDGF α (*platelet-derived growth factor receptor alpha*) auf der Oberfläche der OPCs bindet (Noble et al., 1988), Neuregulin-1 bindet an ErbB Rezeptoren der oligodendroglialen Membran (Flores et al., 2000) und Fibroblasten-Wachstumsfaktoren (*fibroblast growth factor, FGF*), sowie Insulin-ähnliche Wachstumsfaktoren (*insulin like growth factors, IGF*), welche über den PI3K/Akt-Signalweg die Proliferation antreiben (Frederick and Wood, 2004). Die räumliche Orientierung erfolgt über verschiedene andere Signale, wobei PDGF-AA (Homodimer von PDGF-A) und FGF-2 als Mitogene auch hier eine Rolle spielen. Adhäsion- und Kontakt-vermittelte Faktoren sind Moleküle, die in der Extrazellulären Matrix (*extracellular matrix, ECM*) sowie auf der Oberfläche der umliegenden Zellen exprimiert werden. Zu den Faktoren des ECM gehören: Laminine, Merosine, Fibronectine, Tenascin-C sowie Anosmin-1. Folgende Zelladhäsionsmoleküle wirken als Faktoren zur Migration: Polysialysiertes neuronales Zelladhäsionsmolekül (*polysialylated cell adhesion molecule, PSA-NCAM*), Ephrine, α v β 1 Integrine, Claudin 11, AN2/NG2 und N-Cadherine

(Garcion and Faissner, 2001; Chun et al., 2003; Bribián et al., 2008; Hu et al., 2009; Relucio et al., 2012). Desweiteren sorgen chemotaktische Stoffe wie Chemokine (Lockstoff) und Semaphorine (Abwehrstoff) für die korrekte Migration der OPCs (Dziembowska et al., 2005; Armendáriz et al., 2012). Proliferierende OPCs können zum einen weiter differenzieren in Prä-Oligodendrozyten, welche nun den Marker O4 exprimieren und nicht weiter proliferieren oder sie verbleiben im Stadium der Vorläuferzellen als NG2+ Zellen, welche während des gesamten Lebens im Gehirn nachzuweisen sind und die Eigenschaft besitzen jederzeit in Antwort auf bisher noch unbekannte Signale in myelinbildende Oligodendrozyten zu differenzieren (Nishiyama et al., 2009).

Die endgültige Differenzierung in prämyelinisierende Oligodendrozyten, welche positiv für die Marker Galc, O4 und DM20 sind, erfolgt wiederum unter der Kontrolle spezifischer extrazellulärer sowie transcriptioneller Signale. Das Transmembranprotein LINGO-1 (*leucine-rich repeat and immunoglobulin domain-containing-1*), welches auf Axonen sowie in der oligodendroglialen Membran exprimiert wird und möglicherweise *in trans* bindet, verringert die Aktivität der oligodendroglialen Tyrosinkinase Fyn, wodurch die Differenzierung inhibiert wird (Jepson et al., 2012). Außerdem spielt hier der Notch-Signalweg eine Rolle, wobei der axonale Ligand Jagged-1 den oligodendroglialen Notch-Rezeptor bindet und damit die Differenzierung verhindert (Kondo and Raff, 2000). Überraschenderweise kann der Notch-Signalweg allerdings auch die Differenzierung fördern, wenn der axonale Ligand F3/Contactin präsent ist (Hu et al., 2003). Weitere Faktoren, die die endgültige Differenzierung fördern sind Triiodothyronin/thyroid (T3) und IGF1 (Barres et al., 1994; Carson et al., 1993). Des Weiteren wird die terminale Differenzierung der OPCs durch verschiedene Transkriptionsfaktoren reguliert. Hier spielen *Ascl/Mash1* und *Olig2* eine bedeutende Rolle (Yu et al., 2013; Parras et al., 2007). Prä-myelinisierende Oligodendrozyten „suchen“ durch Ausstrecken ihrer Ausläufer nach zu myelinisierenden Axonen und entwickeln sich durch spezifische Signale zu myelinisierenden Oligodendrozyten. Dieser Prozess wird im Folgenden genauer beschrieben.

2.1.1.2 Funktion von Oligodendrozyten

Oligodendrozyten bilden die Myelinschicht im zentralen Nervensystem. Die Myelinschicht ummantelt Axone und ermöglicht dadurch eine beschleunigte Reizweiterleitung (Tasaki, 1939). Die Reizweiterleitungsgeschwindigkeit eines Axons hängt im Allgemeinen von seinem Durchmesser ab. Dies bedeutet allerdings, dass für eine schnelle Reizweiterleitung an langen Axonen diese sehr dick sein müssten. Dieser „Nachteil“ wird durch die Myelinisierung der Axone deutlich verbessert, da die Myelinschicht eine schnelle Signalweiterleitung bei geringem Axondurchmesser erlaubt. Durch die Ummantelung der axonalen Abschnitten mit der lipidreichen Myelinmembran wird der transversale Widerstand erhöht und damit Leckströme verhindert, wodurch die Stärke des Stromes über die Länge des Internodiums erhalten bleibt (Hartline and Colman, 2007). Die lipidreiche Myelinmembran wird gebildet, indem sich ein oligodendroglialer Ausläufer spiralig um das Axon wickelt und das Zytoplasma zurückzieht, sodass Membranstapel entstehen. Ein Oligodendrozyt kann mit verschiedenen Ausläufern mehrere axonale Segmente myelinisieren (Abbildung 5).

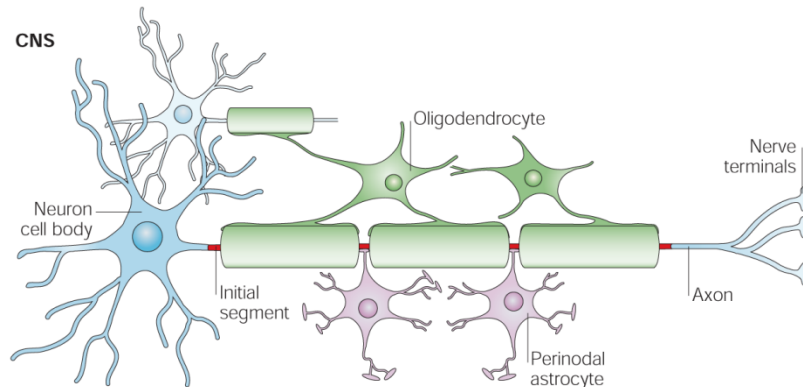


Abbildung 5: Schema eines myelinisierenden Oligodendrozyten

Ein myelinisierender Oligodendrozyt kann mit mehreren seiner Ausläufer verschiedene axonale Segmente auf unterschiedlichen Neuronen ummanteln. Perinodale Astrozyten sorgen für die Aufrechterhaltung des Ionenmilieus an den Ranvier'schen Schnürringen (Poliak and Peles, 2003; Nave and Werner, 2014).

Oligodendrozyten übernehmen nicht nur die Rolle der Isolation von Axonen, sondern sie stellen dem Axon auch trophische Faktoren zur Verfügung, bilden damit den sogenannten „*trophic support*“ (Nave, 2010; Funfschilling et al., 2012). Diese Unterstützung der Neurone ist von besonderer Bedeutung, wie in Knockout-Mausmodellen gezeigt werden konnte. Hier wurden spezifisch oligodendrogliale Proteine, wie Proteolipid Protein (PLP) oder 2', 3'-Cyclic Nukleotide 3'-Phosphodiesterase (CNP), ausgeschaltet, es konnten allerdings nur sehr geringe morphologische Defekte in der Myelinschicht beobachtet werden. Die Folge dieser genetischen Manipulation in Oligodendrozyten führte dagegen zu einer Degeneration der ummantelten Axone, was dafür spricht, dass Oligodendrozyten außerdem neuroprotektive Eigenschaften besitzen (Griffiths, 1998; Lappe-Siefke et al., 2003). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass oligodendrogliale Peroxisomen einen Einfluss auf das neuronale Überleben ausüben. Im Mausmodell wurde die Aktivität dieser Organellen Oligodendrozyten-spezifisch herunter reguliert und es kam innerhalb weniger Monate zu degenerierten Axonen und entzündlichen Demyelinisierungen (Kassmann et al., 2007). Der genaue molekulare Mechanismus hinter diesen neuroprotektiven Effekten von Oligodendrozyten bleibt allerdings bisher ungeklärt. Es konnten jedoch Hinweise darauf gefunden werden, dass die oligodendrogliale Unterstützung der Axone auf dem Transport von Laktat vom Oligodendrozyt über spezialisierte Laktattransporter zum Axon vermittelt wird (Lee et al., 2012).

Es ist bekannt, dass Oligodendrozyten Exosomen abgeben, welche von Neuronen aufgenommen werden können (Frühbeis et al., 2013). Exosomen sind endosomal-abgeleitete Mikrovesikel, die den Transfer von Proteinen, RNAs und miRNAs von einer Zelle zur anderen ermöglichen. Diese Kommunikation zwischen Zellen über Exosomen ist bereits in unterschiedlichen Zelltypen beschrieben (Denzer et al., 2000). Während der oligodendroglialen-axonalen Kommunikation scheinen Exosomen unter anderem eine neuroprotektive Rolle zu spielen, da spezifisch oligodendrogliale Exosomen in einer oxidativen Stresssituation die Vitalität von Neurone schützen können (Frühbeis et al., 2013). Des Weiteren beeinflussen oligodendrogliale Exosomen *in vitro* die neuronale Aktivität von kortikalen Neuronen und modulieren damit möglicherweise das neuronale Netzwerk (Fröhlich et al., 2014).

2.1.1.3 Myelinisierung im ZNS

Ein Prä-myelinisierender Oligodendrozyt sendet seine Ausläufer aus, findet ein zu myelinisierendes Axon und reagiert mit Hochregulation der Polymerisation von Mikrofilamenten in Antwort auf spezifische Interaktion mit der axonalen Membran oder auf Signale der Extrazellulären Matrix (Liang et al., 2004; Bauer et al., 2009). Die initiale Expansion der oligodendroglialen Ausläufer ist abhängig von der Assemblierung von Aktinfilamenten, wohingegen die finale Ummantelung der axonalen Abschnitte durch die oligodendrogliale Zellmembran durch den Abbau dieser Filamentgruppen vermittelt wird. Es wird ein sogenanntes „*blebbing model*“ vermutet, in welchem MBP während der Myelinisierung die Disassemblierung der Aktinfilamente herbeiführt und über Kompaktierung der Zellmembranen eine Erhöhung des zytoplasmatischen Drucks vermittelt, welcher zur weiteren Ausbreitung der Membran führt (Zuchero et al., 2015). Zu den inhibitorischen axonalen Signalen gehören PSA-NCAM, Jagged-1 und Lingo1. Die Initiation der Myelinisierung erfolgt durch die Interaktion des axonalen Zelladhäsionsmoleküls L1 mit dem oligodendroglialen Oberflächenrezeptor F3/Contactin, worüber die Tyrosinkinase Fyn in der Oligodendrozytenmembran aktiviert wird (White et al., 2008). Bei der Aktivierung der Fyn-Kinase spielt auch Laminin 2, ein extrazelluläres Matrixprotein, eine Rolle, welches an $\beta 1$ Integrine bindet, die wiederum mit der Fyn-Kinase assoziiert sind (Laursen et al., 2009). $\beta 1$ Integrine bilden einen Komplex mit F3/Contactin, sind allerdings nicht essentiell am Prozess der Myelinisierung per se beteiligt (Benninger et al., 2006). Durch den ersten axo-glialen-Kontakt werden eine Vielzahl von molekularen Mechanismen in Gang gesetzt, unter anderem die Assoziation der Src-Kinase Fyn mit lipidreichen Mikrodomänen (Krämer-Albers et al., 2011), die lokale Anreicherung von Phosphoinositolen wie PIP_2 und PIP_3 , welche wiederum weitere Signalkaskaden aktivieren (Goebbels et al., 2010; Snaidero et al., 2014) sowie der gerichtete Transport von mRNAs und die lokale Translation von Myelinproteinen werden gestartet (Müller et al., 2013).

Sobald das axonale Segment zur Myelinisierung ausgewählt ist, wickelt der Oligodendrozyt einen Ausläufer spiralg um das Axon. Dabei wird die Membran lateral und radial expandiert und die neu gebildete Schicht schiebt sich unter die bereits vorhandene (siehe Abbildung 6) (Snaidero et al., 2014). Eine Studie in 2013 konnte zeigen, dass Oligodendrozyten im Zebrafisch innerhalb von nur fünf Stunden neue Myelinschichten bilden (Czopka et al., 2013). Die Bildung von Oligodendrozyten und Myelinisierung in Nagetieren ist viel dynamischer als im Menschen. Die Plastizität der Myelinisierung im menschlichen Gehirn wird durch Erlebnisse beeinflusst (Scholz et al., 2009). Dies wird durch die Differenzierung von bereits bestehenden Oligodendrozyten vermittelt und die Umsatzrate an Oligodendrozyten ist nur sehr gering während der gesamten Lebenszeit nach dem fünften Lebensjahr (Yeung et al., 2014). Nachdem die Umwicklung des Axons abgeschlossen ist, wird das Zytoplasma aus dem Fortsatz gezogen, wodurch die Myelinmembranen kompaktiert werden. Die beiden gegenüber liegenden Membranen verschmelzen auf der zytoplasmatischen Seite miteinander. Dadurch entsteht die *Major Dense Line (MDL)*, welche im elektronenmikroskopischen Bild elektronendicht und damit dunkel erscheint. Die dazwischen liegende *Intraperiod Line (IPL)* wird durch das Aufeinandertreffen der extrazellulären Membranen gebildet. Die IPL erscheint weniger elektronendicht und damit heller in der elektronenmikroskopischen Aufnahme. Dadurch entsteht ein spezifisches Muster welches in einem Querschnitt des optischen Nerven oder des Ischiasnerven in Abbildung 6 dargestellt ist.

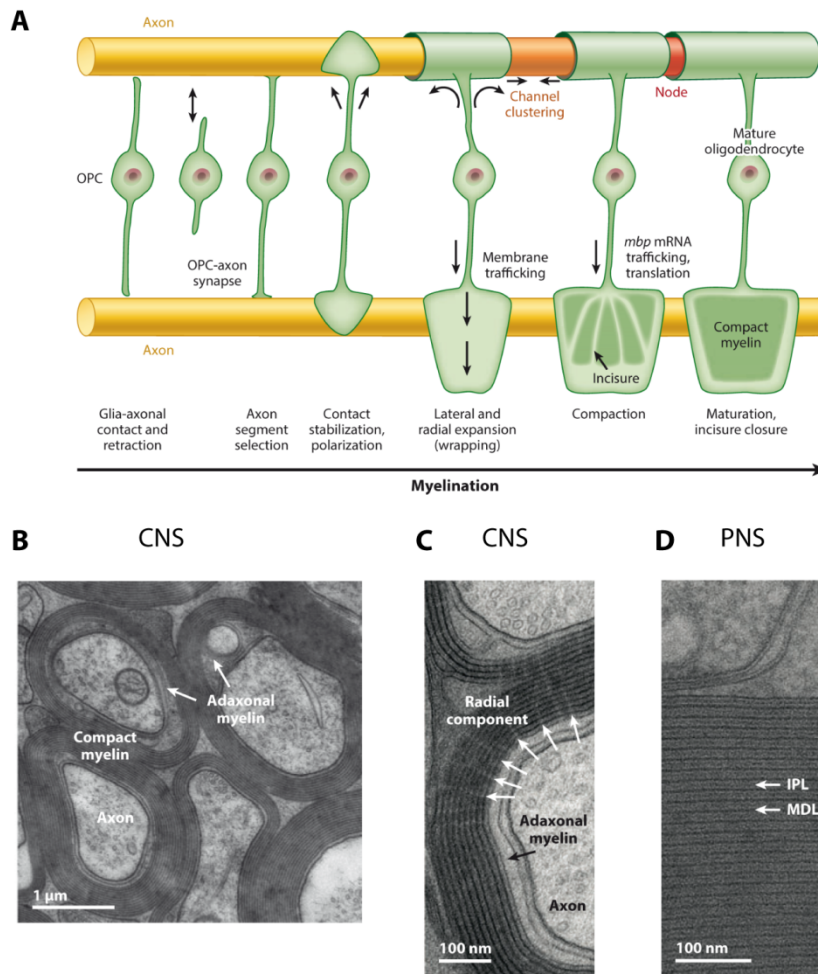


Abbildung 6: Prozess der Myelinisierung

A: Schematische Darstellung der Myelinisierung durch Oligodendrozyten. Ein OPC selektiert durch seine Ausläufer ein Axon und expandiert seinen Ausläufer. Durch laterale und radiale Expansion der Membranen an den Ausläufern wird die Myelinmembran um das axonale Segment gewickelt und das Zytoplasma heraus gezogen, wodurch kompaktes Myelin entsteht (Nave and Werner, 2014).

B: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Querschnitts durch den optischen Nerv. Die dunkleren Bereiche zeigen die Schicht aus kompaktem Myelin um das Axon. Der Zytoplasma-gefüllte adaxonale Bereich ist mit Pfeilen gekennzeichnet (Nave and Werner, 2014).

C: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Querschnitts durch den optischen Nerv. Mit weißen Pfeilen gekennzeichnet ist die radiale Komponente (Zytoplasma-gefüllte Kanäle) innerhalb der kompakten Myelinschicht (Nave and Werner, 2014).

D: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Querschnitts durch den Ischiasnerv. Zu erkennen ist die Struktur des Myelins mit der weniger elektronendichten *Intraperiod Line* (IPL), dem Bereich der extrazellulären Membranen im kompakten Myelin und der elektronendichteren *Major Dense Line* (MDL), den dazwischen liegenden Bereichen der kompaktierten inneren Membranen (Nave and Werner, 2014).

Den Bereich des Myelins, der dem Axon am nächsten liegt, nennt man adaxonales Myelin und der Bereich am äußeren Rand wird als abaxonales Myelin bezeichnet. Die kompakte Myelinschicht wird durch Zytoplasma-gefüllte lamellare Kanäle durchzogen, welche als Radiale Komponente bezeichnet werden (*Radial component*). Sie sind an der Aufrechterhaltung der Stabilität der Myelinschicht beteiligt (siehe Abbildung 6) (Nave and Werner, 2014).

Die Myelinmembran wächst etwa $5000\mu\text{m}^2$ pro Tag (Pfeiffer et al., 1993). Die Anzahl der einzelnen Schichten um ein axonales Segment kann nicht genau definiert werden, da diese vom Axondurchmesser abhängt. Es wird vermutet, dass bis zu 160 Schichten um ein axonales Segment gebildet werden können (Hildebrand et al., 1993). In einer Studie aus 2014 konnten allerdings mittels hochauflösender 3D-Rekonstruktionen nur 11 Umwicklungen um ein axonales Segment nachgewiesen werden (Snaidero et al., 2014).

Die myelinisierten Bereiche eines Axons (Internodien) werden durch unmyelinisierte Bereiche unterbrochen (Nodien), die als Ranvier'sche Schnürringe bezeichnet werden. An den Ranvier'schen Schnürringen befinden sich viele spannungsabhängige Natriumkanäle, wodurch das Axon an diesen Stellen depolarisiert werden kann. Das Aktionspotential springt von Schnürring zu Schnürring, wodurch die Signalweiterleitung deutlich schneller und energieeffizienter wird (Aggarwal et al., 2011a). Bei der lateralen Ausbreitung der Myelinschicht entlang des Axons sorgen verschiedene Signale zum Stopp und zur Ausbildung der Nodien (Susuki et al., 2013).

Die entstandene Myelinmembran besitzt eine einzigartige Komposition. Sie besteht zu 70-75% ihrer Trockenmasse aus Lipiden, wodurch die elektrische Isolation ermöglicht wird (Quarles et al., 2006). Des Weiteren erscheinen stark myelinisierte Bereiche im Gehirn durch den hohen Lipidanteil charakteristisch weiß und werden als weiße Substanz (*white matter*) bezeichnet. Zu den Myelin-Lipiden zählen hauptsächlich Glykosphingolipide, Cholesterin, Galactolipide und Phospholipide. Dabei spielt Cholesterin eine sehr entscheidende Rolle, da es Cholesterin-reiche Mikrodomänen bildet, an denen die Signalkaskaden zur Myelinisierung ausgelöst durch den axo-glialen Kontakt starten (White and Krämer-Albers, 2014). Zu den Hauptproteinen der Myelinmembran gehören das Proteolipid-Protein (PLP) (17% der Gesamtproteinmenge), das Myelin-basische Protein (MBP) (8% der Gesamtproteinmenge), die 2', 3'-Cyclic Nukleotide 3'-Phosphodiesterase (CNP) (4% der Gesamtproteinmenge), das Myelin-assoziierte Oligodendrozyten basische Protein (MOBP) und mit je 1% das Myelin-assoziierte Glykoprotein (MAG) und das Myelin-Oligodendrozyten Glykoprotein (MOG) (Jahn et al., 2009; Nave and Werner, 2014).

2.1.1.4 Die Rolle des Myelin Basischen Proteins während der Myelinisierung im ZNS

Die Myelinisierung im zentralen Nervensystem muss lokal sowie temporal genauestens reguliert werden, um auf Änderungen der Umgebung sowie Erfahrungen reagieren und eventuell darauf adaptieren zu können. Die komplexe Regulation der Bildung von Myelinproteinen soll im Folgenden am Beispiel des Myelin Basischen Proteins (MBP) erläutert werden. MBP ist ein basisches und damit, bei zellulärem pH-Wert, positiv geladenes Protein mit der Eigenschaft Membranen zu kompaktieren, indem es durch elektrostatische Bindung mit den negativ geladenen Phospholipiden interagiert und damit gegenüberliegende Membranen einander annähert (Wood et al., 1984). Im Menschen unterscheidet man vier MBP-Isoformen (17,2kDa, 18,5kDa, 20,2kDa und 21,5kDa) und in der Maus werden sechs Isoformen exprimiert (zwischen 14 und 21,5kDa), welche sich aus unterschiedlicher Kombination von sieben Exons auf dem *Golli*-Gen (*Genes of Oligodendrocyte Lineage*) ergeben (Harauz and Boggs, 2013; Kamholz et al., 1988). Das *Golli*-Gen enthält drei unterschiedliche Transkriptionsstartseiten, von welchen die klassischen MBP und die Golli-Proteine gebildet werden (Harauz et al., 2009). Die Transkription und damit die Expression werden räumlich und zeitlich reguliert. Golli-Proteine werden auch in Neuronen und in Zellen des Immunsystems synthetisiert,

wohingegen MBPs ausschließlich in myelinisierenden Zellen nachzuweisen sind (Fulton et al., 2010). Die genaue Funktion der Golli-Proteine ist bisher noch nicht komplett aufgeklärt, allerdings ist bekannt, dass sie in Oligodendrozyten vor allem während der Differenzierung gebildet werden. Sie sind im Gegensatz zu MBPs im Soma und Zellkern zu finden und fördern im frühen Differenzierungsstadium den Einstrom von Kalziumionen, womit sie möglicherweise am Aufrechterhalten der oligodendroglialen Homöostase beteiligt sind (Paez et al., 2007). Die essentielle Bedeutung des Myelin Basischen Proteins für die Bildung einer funktionalen Myelinschicht zeigt die natürlich vorkommende Maus-Mutante *shiverer*, in der ein Großteil des MBP Gens auf Chromosom 18 deletiert ist. Durch diesen Gendefekt wird kein funktionelles MBP gebildet und es entstehen schwerwiegende funktionale Störungen der Myelinisierung im ZNS (Nave, 1994). *Shiverer* Oligodendrozyten bilden kein kompaktes Myelin, die Axone im zentralen Nervensystem sind hypomyelinisiert. Im Gegensatz dazu scheint die Myelinisierung im peripheren Nervensystem auf den ersten Blick nicht von der Deletion des MBP Proteins betroffen zu sein (Details siehe 2.1.2.3) (Gould et al., 1995).

MBP ist entscheidend an der Bildung neuer Myelinmembranen beteiligt und wird damit am stärksten an der axo-glialen Kontaktstelle benötigt. MBP interagiert mit Phosphatidylinositol-(4,5)-biphosphat an der Innenseite der Membran, wodurch eine höhere Lipidordnung entsteht. Außerdem kann MBP mit sich selbst assoziieren. Dadurch entsteht ein molekulares Sieb, welches eine Diffusionsbarriere für andere Myelinproteine in die Bereiche des kompakten Myelins bildet. Moleküle mit großen zytoplasmatischen Domänen, wie CNP werden zurück gehalten (Aggarwal et al., 2011a, 2013). Damit bildet MBP eine Barriere zwischen kompaktem und nicht-kompaktem Myelin.

Die Besonderheit der MBP Synthese besteht darin, dass MBP als mRNA in einem translational inhibierten Zustand zur axo-glialen Kontaktstelle transportiert und in Antwort auf spezifische Signale lokal translatiert wird (Müller et al., 2013). *Mbp* mRNA kann bereits einen Tag vor dem Protein detektiert werden, wodurch eine translationale Repression der mRNA von Nöten ist (Colello et al., 1995; Besse and Ephrussi, 2008). Diese Form der lokalen Translation bringt verschiedene Vorteile. Zum einen wird die Zelle davor geschützt, dass intrazelluläre Membranen von MBP kompaktiert werden könnten (Staugaitis et al., 1990) und zum anderen kann sehr zeit- und energieeffizient neue Myelinmembran gebildet werden. Eine Hypothese ist, dass innerhalb der Ausläufer von prämyelinisierenden Oligodendrozyten ganze Pools an *Mbp* mRNAs zur Verfügung stehen, welche direkt translatiert werden können.

2.1.1.4.1 hnRNP A2-Signalweg und lokale Translation von MBP

MBP wird nicht als Protein, sondern als mRNA zur axo-glialen Kontaktstelle transportiert und lokal translatiert. Bereits im Jahr 1982 konnte gezeigt werden, dass die mRNA von MBP in Myelinfraktionen angereichert ist, wohingegen *Plp* mRNA nicht detektiert werden konnte (Colman et al., 1982). Der Transport der *Mbp* mRNA in die Peripherie findet in RNA Granulas statt, welche entlang des Zytoskeletts transportiert werden (siehe Abbildung 7) (Ainger et al., 1997; Brophy et al., 1993).

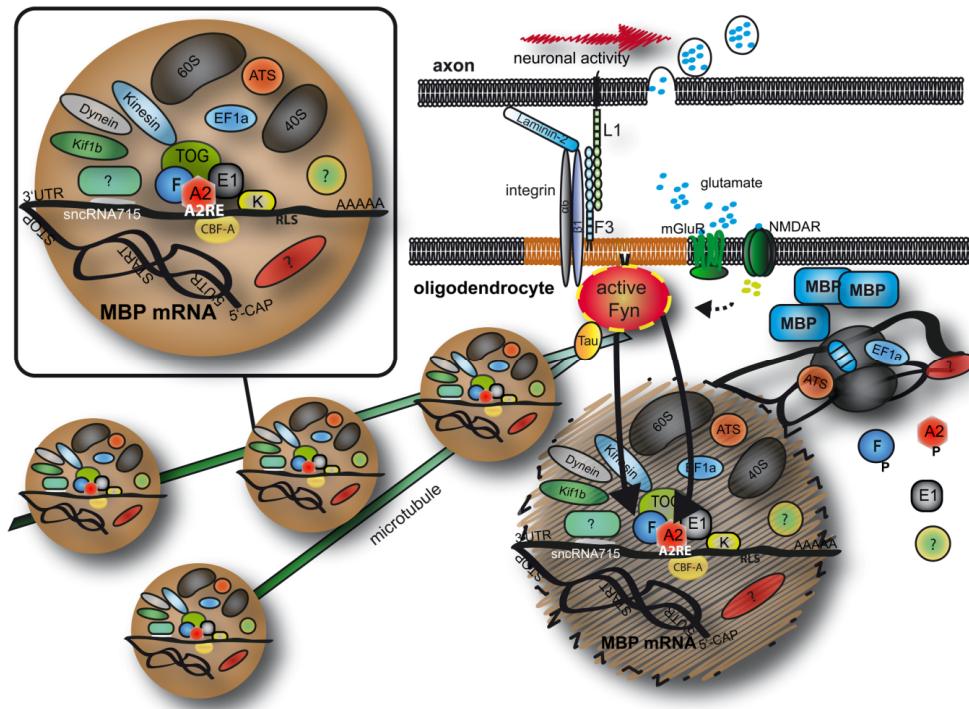


Abbildung 7: hnRNP A2-Weg und Aufbau des *Mbp* mRNA-enthaltenden RNA-Granulas in Oligodendrozyten

Schematische Darstellung des hnRNP-A2-Transportwegs, indem *Mbp* mRNA in RNA Granulas verpackt zur axo-glialen Kontaktstelle transportiert und in Antwort auf axonale Signale translatiert wird. Innerhalb des Granulas assoziieren verschiedene RNA-bindende Proteine sowie Motorproteine. Die Translation wird während des Transports wahrscheinlich über die sncRNA715 inhibiert (Müller et al., 2013). Details siehe Text.

Die Lokalisation ist abhängig von einer elf Nukleotid-langen Sequenz innerhalb der 3'UTR der *Mbp* mRNA, welche als heterogenes nukleäres Ribonukleoprotein A2 Response Elemente (hnRNP A2RE) bezeichnet wird und in allen MBP Isoformen konserviert wird (Munro et al., 1999). Innerhalb des Zellkerns bindet dieses *cis-acting element* einen *trans-acting factor*, das heterogene nukleäre Ribonukleoprotein A2 (hnRNP A2) und wird im Komplex aus dem Zellkern transportiert (Carson and Barbarese, 2005). Durch alternatives Spleißen entstehen vier hnRNP A2-Isoformen, B1, B1b, A2 und A2b, wobei hnRNP A2b als die häufigste Isoform im Zytoplasma beschrieben und möglicherweise hauptsächlich an dem *Mbp* mRNA Transportweg beteiligt ist (Han et al., 2010). Im Zytoplasma assoziieren weitere RNA-bindende Proteine wie *Tumor overexpressed Gene* (TOG) und die hnRNP's F, E1, K und CBF-A an die mRNA (Kosturko et al., 2005, 2006; White et al., 2012; Laursen et al., 2009; Raju et al., 2008), wodurch sich ein transportabler Ribonukleoprotein-Partikel bildet, welcher auch als RNA Granula bezeichnet und mithilfe des Kinesin-Motorproteins Kif1b entlang der oligodendroglialen Ausläufer in die Peripherie transportiert wird (Czaplinski and Singer, 2006; Lyons et al., 2009). Des Weiteren konnten innerhalb des Granulas Komponenten der Translationsmaschinerie wie der Elongationsfaktor 1a (EF1a), die Aminoacyl-tRNA Synthetase (ATS) und ribosomale RNA nachgewiesen werden (Barbarese et al., 1995). Während des Transports der mRNA muss diese translational inaktiviert werden. Dies wird vermittelt durch hnRNP E1 und/oder die kleine nicht-kodierende RNA 715 (*small non-coding RNA*, sncRNA715) (Bauer et al., 2012; Kosturko et al., 2006). Ein direkter translationaler Effekt von hnRNP E1 auf die Synthese von MBP konnte allerdings nicht nachgewiesen werden, da die Untersuchungen innerhalb dieser Studie nur an synthetischen A2RE RNAs in einem *in vitro* Translationsexperiment durchgeführt wurden, in welchem

ein Effekt auf die Translation durch die Co-Expression von hnRNP E1 gezeigt wurde (Kosturko et al., 2006). Die Rolle der sncRNA715 wird in 2.2.4 genauer behandelt.

Der *Mbp* mRNA enthaltende RNA Granula wird über das Zytoskelett in Richtung der axo-glialen Kontaktstelle transportiert. Hier wird durch die Bindung von axonalem L1 an oligodendrogliales F3/Contactin die Src-Kinase Fyn aktiviert, welche durch Phosphorylierung verschiedener Granula-Komponenten wie hnRNP A2 und F diesen auflöst und die Translation ermöglicht (Müller et al., 2013; White et al., 2008, 2012).

2.1.1.4.1.1 Die Fyn Kinase

Die nicht-Rezeptor Tyrosinkinase Fyn ist ein 59kDa großes Enzym, welches durch alternatives Spleißen in zwei Isoformen exprimiert wird. Zum einen FynT, welches ausnahmslos in T-Zellen exprimiert wird und zum anderen FynB welches in allen anderen Geweben und dem Gehirn exprimiert wird (Resh, 1998).

Alle Kinasen dieser Src-Familie weisen den gleichen molekularen Aufbau auf. Sie bestehen aus einer N-terminalen Src-homologe (SH) 4 Domäne mit Acetylierungsstelle, einer individuellen (*unique*) Domäne, einer SH3 und SH2 Proteinbinde-Domäne, einer SH1 oder auch Kinase-Domäne und einem C-terminalen Regulatorischen Ende (siehe Abbildung 8) (Martin, 2001). Ein Glycin- bzw. Cystein-Rest am N-Terminus kann myristoyliert bzw. palmitoyliert werden, wodurch die Kinase in der Membran innerhalb von Lipid Rafts verankert wird und ihre endgültige Position einnimmt (Rawat and Nagaraj, 2010).

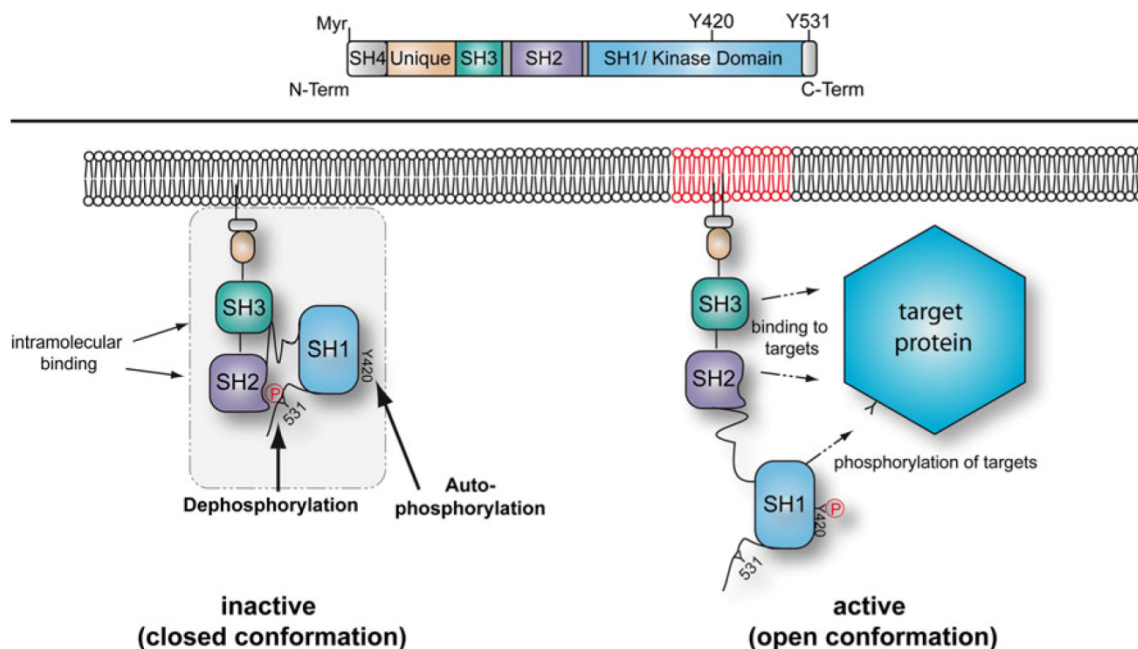


Abbildung 8: Struktur und Regulation der Fyn-Kinase

Struktureller Aufbau der Src-Kinase Fyn. Durch Dephosphorylierung und Auto-Phosphorylierung wird die Kinase aktiviert und kann Ziel-Proteine phosphorylieren. Details siehe Text (Krämer-Albers et al., 2011).

Die Kinase wird durch verschiedene Phosphorylierungs- bzw. Dephosphorylierungsschritte reguliert (in Abbildung 8 schematisch dargestellt). In der inaktiven Konformation liegt die Kinase in einer eher geschlossenen Form vor, wobei ein regulatorisches Tyrosin am C-Terminus (in Maus FynB an der Position Y531) phosphoryliert ist und eine intramolekulare Brücke mit der SH2 Domäne bildet. Diese Phosphorylierung wiederum wird von weiteren Kinasen wie womöglich der Csk (C-terminale Src Kinase) reguliert (Nada et al., 1993). Die inaktive Konformation wird des Weiteren durch eine intramolekulare Bindung zwischen der SH3 Domäne und einer Linker-Region zwischen der SH2 und der Kinase Domäne unterstützt. Zur Aktivierung der Kinase wird der C-terminale Tyrosin-Rest dephosphoryliert und die intramolekulare Bindung zur SH2 Domäne aufgehoben, wodurch die Fyn Kinase eine eher offene Konformation einnimmt und die SH2 und SH3 Domänen zugänglich werden. Die offene Konformation ermöglicht außerdem eine intermolekulare Auto-Phosphorylierung eines Tyrosin-Restes an der Position 420 (Y420), wodurch das aktive Zentrum stabilisiert wird (Roskoski, 2004). In der offenen, aktiven Konformation können Ziel-Proteine innerhalb der SH2 und SH3 Domäne mit der Fyn Kinase interagieren und von ihr phosphoryliert werden. In Oligodendrozyten kommen die Src-Kinasen Fyn, Lyn und Src vor, wobei Fyn am stärksten exprimiert wird (Colognato et al., 2004; Krämer-Albers et al., 2011).

In Oligodendrozyten erreicht die Aktivität der Fyn-Kinase ihren Höhepunkt während der Initiation der Myelinisierung (Krämer et al., 1999). Sie spielt eine entscheidende Rolle bei der Integration von neuronalen Signalen, welche die morphologische Differenzierung der Oligodendrozyten regulieren. Fyn-defiziente Mäuse weisen abnormale Oligodendrozyten-Entwicklung sowie Hypomyelinisierung im ZNS auf und in Zellkulturen mit inaktivierter Fyn-kinase wurde das Auswachsen von oligodendroglialen Ausläufern sowie die Reifung der Oligodendrozyten gestört (White and Krämer-Albers, 2014).

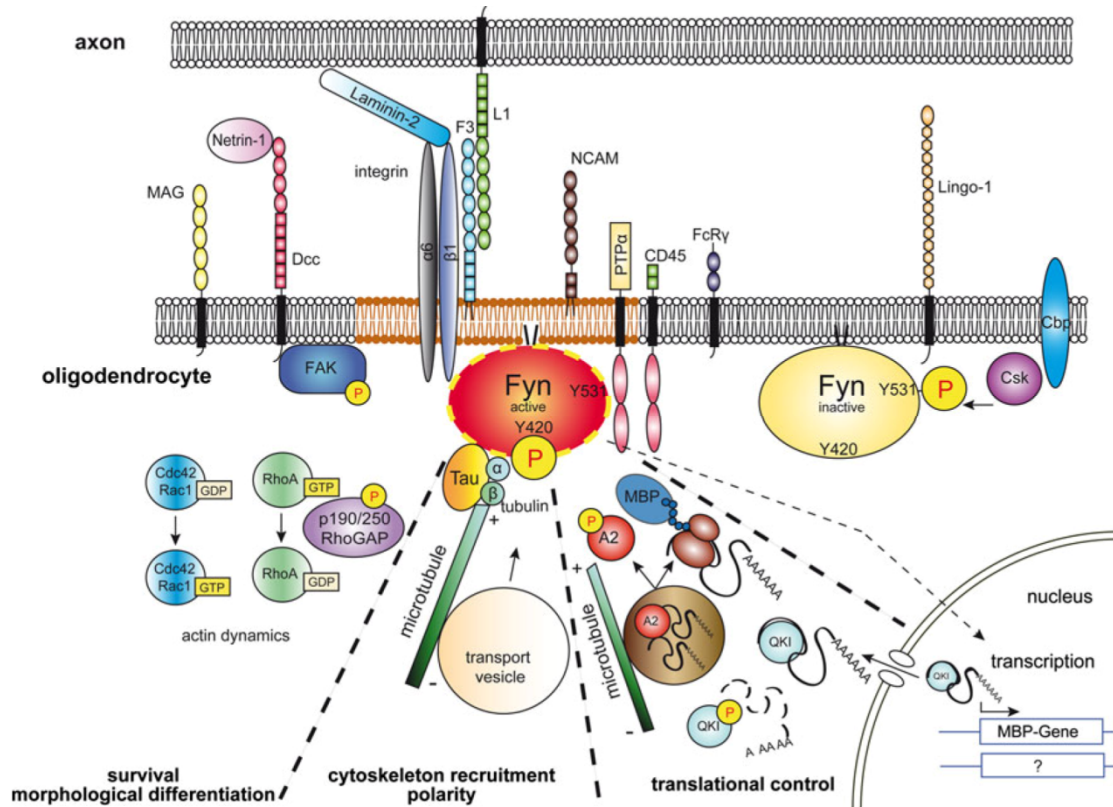


Abbildung 9: Funktionen der Fyn Kinase in Oligodendrozyten

Vom Axon abgeleitete Signale werden von oligodendroglialen Rezeptoren erkannt und resultieren in spezialisierten Membranbereichen, den Lipid Rafts, zu Aktivierung der Src-Kinase Fyn. Drei Haupt-Signalwege werden von Fyn reguliert. Die Aktivierung der morphologischen Differenzierung durch den RhoA-abhängigen Signalweg (links). Die Rekrutierung und Stabilisierung des mikrotubulären Zytoskeletts durch die Interaktion mit Tau (Mitte) und die Aktivierung der lokalen Translation von MBP durch Phosphorylierung verschiedener Transportgranula-Komponenten (rechts) (Krämer-Albers et al., 2011).

Während der Oligodendrozyten-Entwicklung bilden sich innerhalb der Membran so genannte Lipid Rafts, in welchen die Fyn-Kinase in seiner doppelt acylierten Form verankert ist (Krämer et al., 1999). Lipid Rafts sind spezialisierte, dynamische Mikrodomänen, welche reich an Sterol- und Sphingolipiden sind und im Golgi-Apparat gebildet werden. Diese Lipid Rafts stellen Signalplattformen für Oligodendrozyten dar, in denen verschiedene vom Axon stammende lösliche oder membrangebundene Faktoren die Fyn-kinase aktivieren und dadurch spezifisch Signalkaskaden aktiviert werden (White and Krämer-Albers, 2014). Aktiviertes Fyn wiederum setzt hauptsächlich drei Signalkaskaden in Gang. Über die Aktivierung der RhoA-GTPase wird die morphologische Differenzierung der Oligodendrozyten aktiviert, die Rekrutierung und Stabilisierung von mikrotubulären Zytoskelettelementen wird über die Bindung an das Tubulin-assoziierte Protein Tau gestartet und die Regulation der lokalen Translation des Myelin Basischen Proteins wird initiiert (siehe Abbildung 9) (Liang et al., 2004; Klein et al., 2002; White et al., 2008), wie in Abschnitt 2.1.1.4.1 bereits genauer beschrieben wurde.

2.1.2 Zellen des peripheren Nervensystems

Das periphere Nervensystem besteht wie das zentrale Nervensystem aus Neuronen und verschiedenen Gliazellen (siehe Abbildung 10).

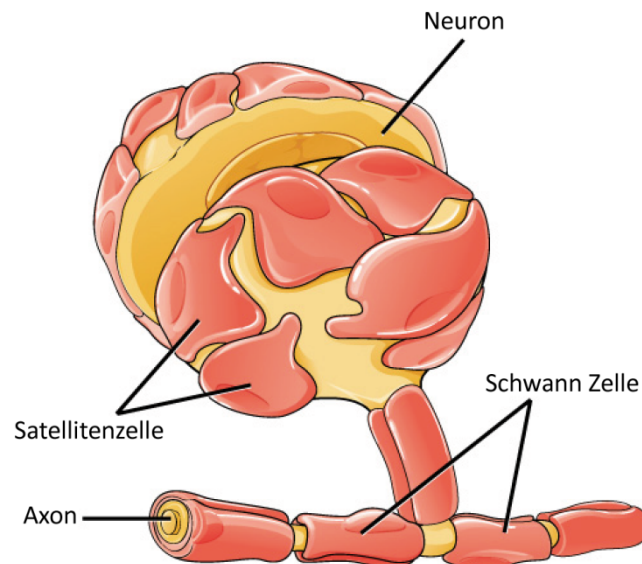


Abbildung 10: Zellen des Peripheren Nervensystems

Das periphere Nervensystem besteht aus Neuronen und unterschiedlicher Gliazellen. Satellitenzellen übernehmen eine vergleichbare Funktion im PNS wie Astrozyten im ZNS. Die myelinisierenden Zellen im PNS werden als Schwann Zellen bezeichnet (modifiziert nach <http://voer.edu.vn/file/53932>).

Satellitenzellen stellen das Gegenstück zu den Astrozyten im ZNS dar. Das Pendant zu Oligodendrozyten im peripheren Nervensystem sind Schwann-Zellen. Sie können einerseits als myelinisierende Zellen oder als nicht-myelinisierende Zellen auftreten. Myelinisierende Schwann-Zellen bilden die Myelinschicht um periphere Axone und sorgen damit für die saltatorische Reizweiterleitung im PNS. Des Weiteren existieren olfaktorische Hüllzellen, die Axone der Geruchsnerve ummanteln und terminale Gliazellen (Teloglia), welche axonale Endigungen an der motorischen Endplatte umhüllen (Jessen, 2004).

2.1.2.1 Herkunft, Entwicklung und Regulation von Schwann Zellen

Schwann Zellen entstehen aus Neuralleistenzellen (*neural crest cells*) während der frühen Entwicklung. Die Bildung von Schwann Zell-Vorläuferzellen (*Schwann cell precursors, SCPs*) aus Neuralleistenzellen findet zeitlich vor der Gliogenese im Rückenmark statt und ist abhängig von Survival-Faktoren, Mitogenen und Signalen von umliegenden Axonen (Jessen and Mirsky, 1999). SCPs dienen nicht nur als Quelle für Schwann Zellen, sondern haben noch weitere Funktionen. Sie bilden trophische Unterstützung für motorischen und sensorische Neuronen und scheinen essentiell für die normale Faszikulation der peripheren Nerven zu sein (Jessen and Mirsky, 2005). Aus den SCPs werden wiederum unreife Schwann Zellen (*immature Schwann cell*) und daraus myelinisierende oder unmyelinisierende Schwann Zellen gebildet (*myelinating/ non-myelinating Schwann cell*) (siehe

Abbildung 11). Das Schicksal der unreifen Schwann Zelle, ob sie sich in eine myelinisierende oder unmyelinisierende Zelle entwickelt, wird allein durch das assoziierte Axon bestimmt.

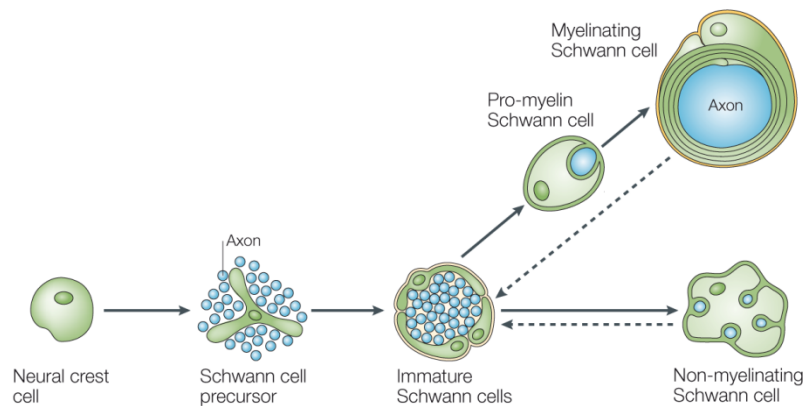


Abbildung 11: Entwicklung von Schwann Zellen

Schwann Zellen entwickeln sich aus Neuralleistenzellen (*neural crest cells*) über Schwann Zell-Vorläuferzellen (*Schwann cell precursor*) zu unreifen Schwann Zellen (*Immature Schwann cell*). Aus unreifen Schwann Zellen können sich myelinisierende (*myelinating Schwann cell*) oder unmyelinisierende Schwann Zellen (*unmyelinating Schwann cell*) bilden (Jessen and Mirsky, 2005).

Im Gegensatz zu den myelinisierenden Zellen des ZNS, den Oligodendrozyten, ist das Stadium der reifen Schwann Zelle nicht statisch, sie kann in Antwort auf Verletzungen dedifferenzieren und als unreife Schwann Zelle neue bzw. reparierte Axone erneut ummanteln (Parkinson et al., 2008).

Die unterschiedlichen Stadien der Schwann Zell-Entwicklung zeichnen sich durch die Expression verschiedener Marker aus, welche in fünf Gruppen unterteilt werden können. Marker exprimiert in allen Entwicklungsstadien wie SOX10. Proteine, welche nur von Neuralleistenzellen exprimiert werden und in unreifen Schwann Zellen herunter reguliert sind wie AP2 α (*activator protein 2 α*). Marker, welche nur auf SCPs nachgewiesen werden können wie Cadherin 19 (*Cad19*). Proteine, welche von SCPs und unreifen Schwann Zellen gebildet werden aber nicht auf Neuralleistenzellen nachgewiesen werden können wie BFABP (*brain fatty acid-binding protein*) und Marker für ausschließlich unreife Schwann Zellen wie GFAP und S100 (Jessen and Mirsky, 2005). Es ist zu erkennen, dass die Einteilung der unterschiedlichen Schwann Zell Entwicklungsstadien nicht durch spezifische Marker genau festgelegt werden kann, allerdings gibt es einen entscheidenden Unterschied zwischen dem Stadium der Vorläuferzellen und dem der unreifen Schwann Zellen. Schwann Zell Vorläuferzellen sind vollständig auf Überlebenssignale von assoziierten Axonen angewiesen, wobei das neuronale Protein der EGF-Rezeptor-Familie Neuregulin 1 (NRG1) eine entscheidende Rolle spielen soll. Dementgegen können unreife Schwann Zellen ohne neuronalen Kontakt ihr Überleben sichern, indem sie über autokrine Faktoren Signalkreisläufe aufrecht erhalten (Meier et al., 1999).

Die Bildung der peripheren Gliazellen ist von unterschiedlichen Faktoren abhängig, die hier im Weiteren aufgeführt werden sollen. SOX10 ist ein Transkriptionsfaktor, welcher ausschlaggebend an der Gliogenese beteiligt ist. In Abwesenheit von SOX10 werden keine Satellitenzellen und keine Schwann Zell-Vorläuferzellen gebildet und bei reduzierten SOX10-Mengen wird die gliale Rezeptor-Tyrosin-Kinase ErbB3 herunter reguliert, weshalb die Vermutung nahe liegt, dass SOX10 an der

Aufrechterhaltung der NRG1-vermittelten Antwort beteiligt ist (Britsch et al., 2001). Neuregulin 1 TypIII (NRG1) ist ein Protein der EGF-Familie (*epidermal growth factor*) und unverzichtbar an der Myelinisierung des PNS beteiligt. Es wirkt als axonaler Überlebensfaktor und Mitogen für Schwann Zellen (Jessen and Mirsky, 2005). NRG1 ist zur Differenzierung von glialen Zellen aus Neuralleistenzellen nicht erforderlich, da in NRG1 Knockout Modellen die aus der Neuralleiste stammenden Zellen nicht beeinflusst sind (Garratt et al., 2000). In diesen NRG1-Mutanten ist allerdings zu erkennen, dass Schwann Zell Vorläuferzellen sowie unreife Schwann Zellen in spinalen Nerven nicht nachzuweisen sind, was darauf hindeutet, dass NRG1 eine unerlässliche Rolle für die Migration der Neuralleistenzellen spielt (Britsch et al., 1998). Außerdem wird durch NRG1 die Proliferation der Schwann Zellen gefördert und dient damit als vorbereitendes Signal zur Myelinisierung (Morrissey et al., 1995). Eine weitere wichtige Eigenschaft von NRG1 liegt in dem inhibitorischen Effekt auf die Neurogenese, wodurch die Gliogenese indirekt verstärkt werden könnte (Shah et al., 1994). Weitere Transkriptionsfaktoren, welche an der Differenzierung von Schwann Zellen beteiligt sind, sind Krox20 und Oct6. Beide spielen eine Rolle bei der Entwicklung von unreifen Schwann Zellen in reife Schwann Zellen und hemmen Zelltod und Proliferation (Bhatheja and Field, 2006). Weitere Faktoren, die die Gliogenese beeinflussen, sind Notch sowie BMP2 und BMP4. Notch weist einige Gemeinsamkeiten mit NRG1 auf, weshalb vermutet wird, dass beide kooperativ interagieren könnten (Schmid et al., 2003). BMP2 und BMP4 wirken *in vitro* als Blocker der Schwann Zell Differenzierung, der Effekt *in vivo* bleibt allerdings bisher noch unklar (Shah et al., 1996).

2.1.2.2 Funktion von Schwann Zellen

Schwann Zellen übernehmen verschiedene Funktionen im peripheren Nervensystem. Sie helfen das Überleben und die Funktion von Neuronen zu sichern, sie eliminieren Zelltrümmer und bilden die Myelinschicht um Axone (Bhatheja and Field, 2006).

Schwann Zellen entwickeln sich entweder zu myelinisierenden oder zu unmyelinisierenden Schwann Zellen. Dies hängt unmittelbar vom Durchmesser des assoziierten Axons ab. Axone mit einem Durchmesser unter $1\mu\text{m}$ werden von nicht-myelinisierenden Schwann Zellen ummantelt. Sie bilden sogenannte Remak-Bundle, in welchen mehrere Axone von dünnen Zytoplasma-Schichten separiert werden (Orita et al., 2013) (siehe Abbildung 12B). Axone mit einem Durchmesser größer als $1\mu\text{m}$ assoziieren mit myelinisierenden Schwann Zellen und werden von einer mehrschichtigen Myelinschicht umgeben (Voyvodic, 1989).

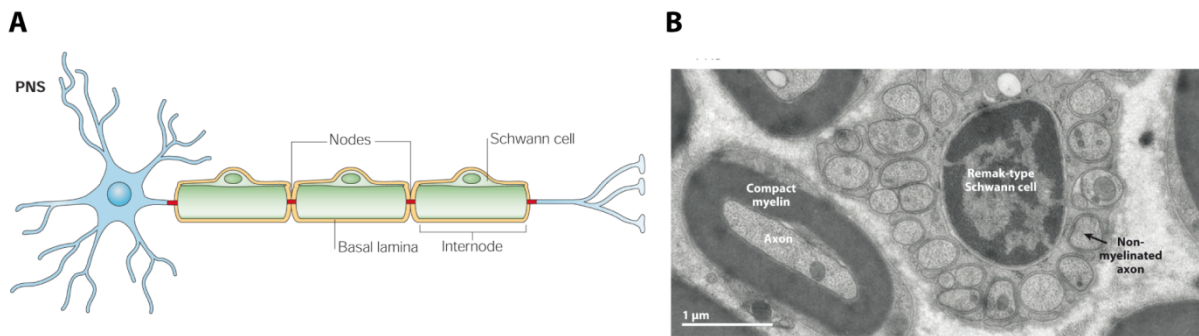


Abbildung 12: Myelinisierende Schwann Zelle

A: Eine Schwann Zelle kann im Gegensatz zu einem Oligodendrozyt nur ein axonales Segment myelinisieren (Poliak and Peles, 2003).

B: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Querschnitts durch den Ischiasnerv. Eine myelinisierende Schwann Zelle bildet kompaktes Myelin um ein Axon (links) und eine unmyelinisierende Schwann Zelle bildet Remak-Bundle (*Remak-type Schwann cell*) um eine Gruppe von Axonen (Nave and Werner, 2014).

Im Gegensatz zu Oligodendrozyten im ZNS, wo eine Zelle mehrere axonale Segmente myelinisiert, kann eine Schwann Zelle im PNS nur ein axonales Segment myelinisieren (Abbildung 12A).

Schwann Zellen helfen außerdem das neuronale Überleben zu gewährleisten, indem sie trophische Faktoren zur Verfügung stellen, sowie Zelladhäsionsmoleküle exprimieren, die den Neuriten-Auswuchs beeinflussen (Bunge, 1994; Kleitman et al., 1988). Zu den trophischen Faktoren, die Schwann Zellen sezernieren, gehören NGF (*nerve growth factor*), BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*) und CNTF (*ciliary neurotrophic factor*) (Bunge, 1994). Des Weiteren regulieren Schwann Zellen die Formation der Ranvier'schen Schnürringe indem sie Signale produzieren, welche das Clustern von Natriumkanälen in der axonalen Membran zur Folge haben (Bhatheja and Field, 2006).

2.1.2.3 Myelinisierung im PNS

Die Myelinisierung im peripheren Nervensystem unterliegt einer Vielzahl an regulatorischen Signalwegen. Bevor unreife Schwann Zellen in myelinisierende Schwann Zellen differenzieren, interagieren diese mit einer Vielzahl an Axonen. Im ersten Schritt der Myelinisierung findet das Radiale Sortieren (*radial sorting*) statt, bei dem die unreife Schwann Zelle seine Ausläufer in ein Axonbündel ausstreckt und Axone mit großem Durchmesser auswählt. Es wird ein 1:1 Verhältnis zwischen axonalem Abschnitt und Schwann Zelle gebildet, wobei eine Schwann Zelle mit nur noch einem Abschnitt des Axons interagiert (Raphael et al., 2011). Im zweiten Schritt wird die Anzahl an Schwann Zellen reguliert, damit die Zahl an Schwann Zellen und Axonen aufeinander abgestimmt ist. Hier spielt die Balance zwischen proliferationsfördernden und proliferationshemmenden Faktoren eine Rolle (Jessen and Mirsky, 2005). Zu den hier entscheidenden fördernden Faktoren gehören NRG1 und Laminin und zu den proliferationshemmenden Faktoren gehören P75 Neurotrophin Rezeptor und TGFβ (*transforming growth factor β*) (Meier et al., 1999; Einheber et al., 1995; Syroid et al., 2000; Yu et al., 2005). Im letzten Schritt der Myelinisierung wird eine sogenannte Differenzierungs-Bremse (*differentiation brake*) aktiviert, bei der Signalwege, welche die Myelin Differenzierung inhibieren, unterdrückt werden (Jessen and Mirsky, 2005). Signalkaskaden, wie der Notch-Signalweg,

der die Proliferation begünstigt, werden gehemmt, sowie proproliferierende Transkriptionsfaktoren wie PAX3 und SOX2 herunter reguliert, sobald die Myelinisierung startet (Kioussi et al., 1995; Le et al., 2005; Woodhoo et al., 2009).

Der makroskopische Aufbau der Myelinmembran im PNS unterscheidet sich nicht von dem im ZNS. Sie erscheint im elektronenmikroskopischen Bild eines querschnittenen Ischiasnervs gleich dem Bildes eines querschnittenen optischen Nerven (vergleiche Abbildung 6C und D). Ein Teil der Proteine im PNS sind homolog zu denen im ZNS, allerdings werden sie teilweise prozentual unterschiedlich exprimiert und es existieren zusätzlich andere Proteine. Andere sind spezifisch nur im ZNS Myelin nachzuweisen. Außerdem ist die Verteilung der Lipide im PNS zu der im ZNS verändert. Das PNS Myelin besteht weniger aus Galactolipiden und Cholesterol und mehr aus Sphingolipiden (Greenfield et al., 1973).

Zu den Hauptmyelinproteinen gehören, *Protein zero* (P0) (21%), Periaxin (16%) und MBP (8%) (Patzig et al., 2011). P0 ist ein Typ1-Transmembran-Glykoprotein mit einer extrazellulären Immunglobulin-ähnlichen Domäne, einer hydrophoben Transmembrandomäne und einer intrazellulären Domäne. Durch homophile Interaktion der extrazellulären Domäne wird die IL des peripheren Myelins stabilisiert, P0 übernimmt damit eine homologe Funktion zu PLP im ZNS (Filbin et al., 1990). P0-null Mutanten zeigen abnormale motorische Fähigkeiten und Hypomyelinisierung mit dünnen, unkompaktierten Myelinmembranen, wobei heterozygote Mutanten zu Anfang normales Myelin aufweisen, welches etwa nach 4 Monaten degeneriert (Martini et al., 1995b). Auch die Überexpression von P0 führt zu Myelindefekten, wodurch darauf zu schließen ist, dass die genaue Dosis des Proteins essentiell wichtig ist für die Bildung der korrekten Myelinschicht (Wrabetz et al., 2000). Periaxin wird ausschließlich von myelinisierenden Schwann Zellen exprimiert und ist bei Beginn der Myelinisierung in der adaxonalen Membran lokalisiert. In der reifen Myelinschicht kann Periaxin in der abaxonalen Schwann Zell Membran nachgewiesen werden. Es wird vermutet, dass es durch Membran-Protein-Interaktionen zur Stabilisierung der reifen Myelinschicht nötig ist (Scherer et al., 1995).

Für MBP können die gleichen Isoformen im ZNS sowie im PNS Myelin nachgewiesen werden, wobei die 14kDa Isoform auch als P1 und die 18,5kDa Isoform auch als P2 bezeichnet werden (Mentaberry et al., 1986; Greenfield et al., 1980). Auch die Lokalisation in der MDL innerhalb des Myelins ist homolog, allerdings unterscheiden sich die Funktion und damit die Wichtigkeit des Proteins für die Aufrechterhaltung des kompakten Myelins. Dies ist deutlich an der *shiverer* Mausmutante zu erkennen, in welcher kein Defekt im kompakten Myelin im PNS beobachtet werden kann (Gould et al., 1995). In dieser Mutante liegt allerdings eine Veränderung innerhalb des molekularen Aufbaus der Myelinmembran vor. Die Anzahl von zytoplasmatischen Kanälen, den sogenannten Schmidt-Lantermann Einkerbungen (*Schmidt-Lantermann incisure*, SLI) ist verdoppelt (Gould et al., 1995). SLIs sind zytoplasmatische Kanäle, welche das adaxonale und abaxonale Zytoplasma der Schwann Zelle verbinden und die Kommunikation zwischen den beiden Bereichen zulassen. SLIs sind untereinander durch *gap junctions* miteinander verbunden und exprimieren Connexin32 (Cx32), welches als Marker für SLIs eingesetzt werden kann (Kettenmann and Ransom, 2013). MBP scheint in Schwann Zellen Einfluss auf die Umsetzung von Proteinen wie Cx32 zu haben, denn in der *shiverer* Mutante verhalten sich die Proteinlevel von MBP und Cx32 invers proportional zueinander (Smith-Slatas and Barbarese, 2000). Im PNS von *shiverer* Mäusen scheint die positiv geladene zytoplasmatische Domäne des P0 Proteins die Rolle der Kompaktierung der Myelinmembran und damit der Ausprägung der MDL zu

übernehmen. In P0-MBP-Doppel Knockout Mäusen kann eine deutliche Hypomyelinisierung im PNS festgestellt werden, wobei die vereinzelt Myelin-ähnlichen Membranen keine MDL zeigten. Dies unterstreicht die Vermutung, dass P0 zusätzlich oder ausschließlich an der Kompaktierung und der Ausbildung der MDL beteiligt ist (Martini et al., 1995a). Während des Myelinisierungsprozesses kann die mRNA von MBP in der gesamten myelinisierenden Schwann Zelle nachgewiesen werden, wobei lokale Translation und damit verbundene translationale Inhibition der mRNA vermutet werden (Trapp et al., 1987). Außerdem konnte gezeigt werden, dass *Mbp* mRNA in den zytoplasmatischen Kanälen lokalisiert ist, in welchen möglicherweise der Transport in Richtung Peripherie stattfindet (Griffiths et al., 1989).

2.1.2.4 Regulation der Myelinisierung im PNS

Die Myelinisierung im peripheren Nervensystem unterliegt verschiedenen komplexen regulatorischen Mechanismen. Sie wird unter anderem durch transkriptionelle Kontrolle reguliert, bei der unterschiedliche Transkriptionsfaktoren eine Rolle spielen.

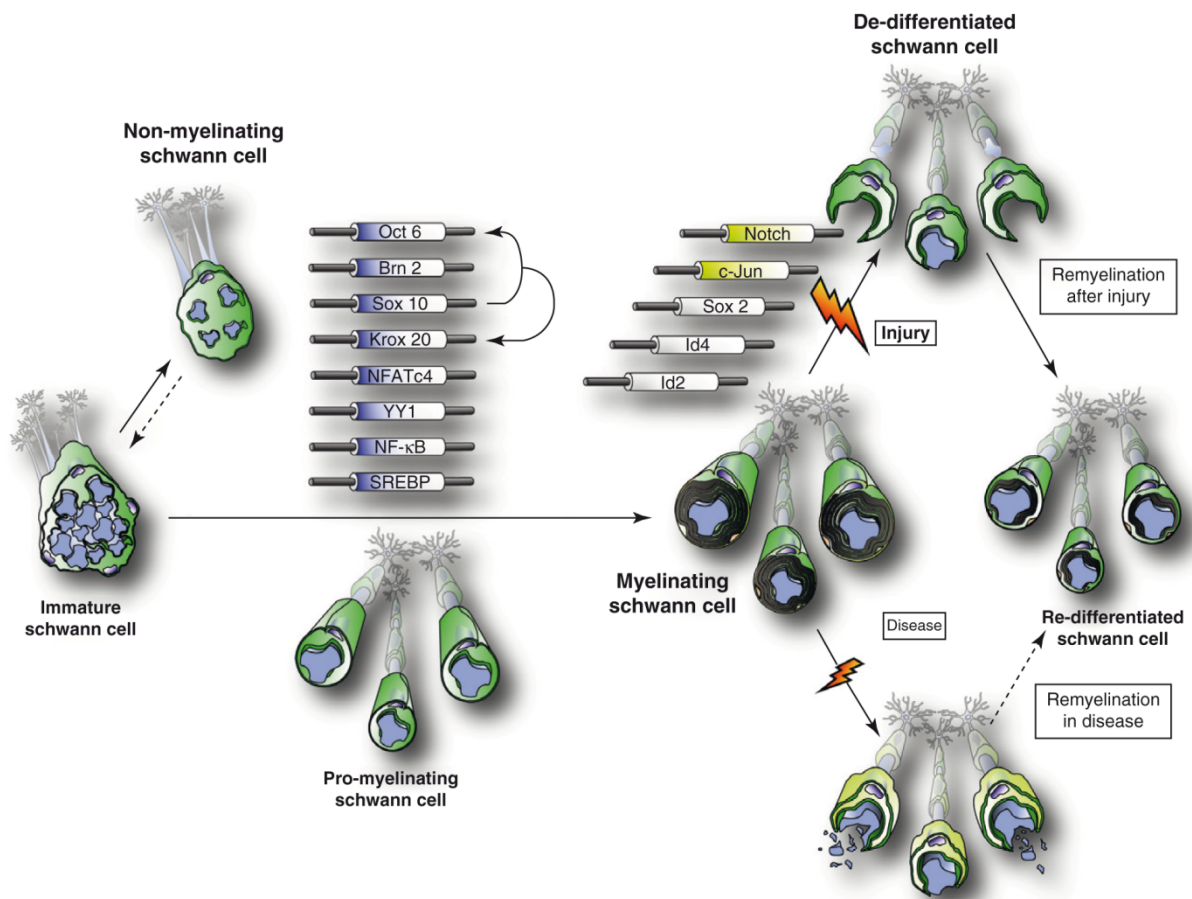


Abbildung 13: Regulation der Entwicklung von Schwann Zellen durch Transkriptionsfaktoren

Die Regulation von Schwann Zellen unterliegt verschiedensten Transkriptionsfaktoren sowie anschließender Signalkaskaden. In blau gekennzeichnete Transkriptionsfaktoren wirken promyelinisierend und in Weiß und Gelb markierte Faktoren wirken inhibierend auf die Myelinisierung (Pereira et al., 2012).

Die in Abbildung 13 blau gekennzeichneten Faktoren wie SOX10, Oct6 und Krox20 wirken positiv auf die Myelinisierung. Dabei wirken SOX10 und Oct6 zusammen aktivierend auf Krox20, wobei

verschiedene Myelogene gefördert und Myelin-Inhibitoren gehemmt werden (Jagalur et al., 2011). Die in Abbildung 13 weiß und gelb gekennzeichneten Faktoren wirken negativ auf die Myelinisierung. Zu diesen gehören Notch, c-Jun sowie die Transkriptionsfaktoren Sox2, Id2 und Id4 (Pereira et al., 2012). Diese negativen Regulatoren der Myelinisierung spielen auch eine Rolle bei Demyelinisierung der Axone nach Verletzungen, wie am Beispiel des Notch-Signalwegs gezeigt werden konnte (Woodhoo et al., 2009). Ein weiterer wichtiger Regulator der Myelinisierung im PNS ist NRG1 Typ III. NRG1 reguliert geradezu alle Schritte der Schwann Zell Differenzierung.

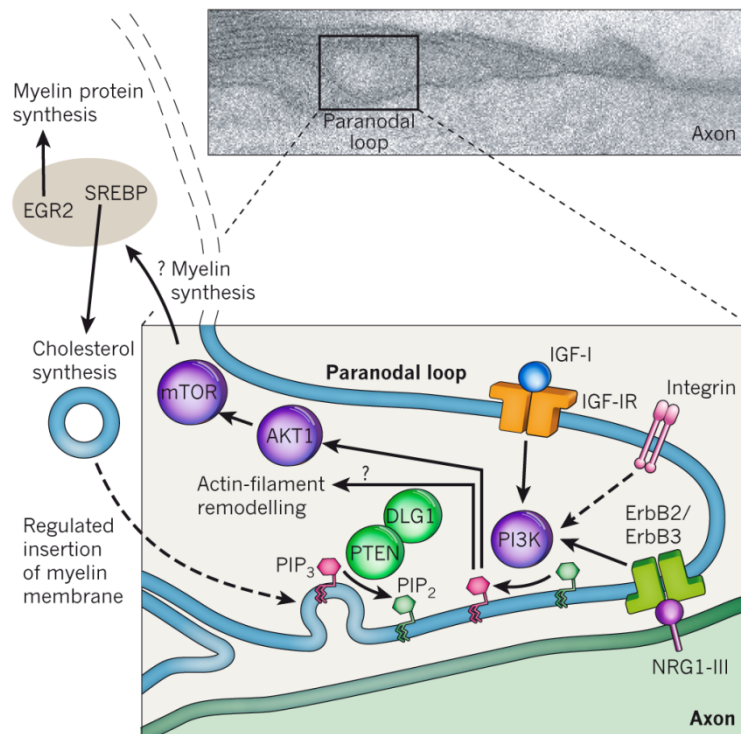


Abbildung 14: Signalkaskade von Neuregulin 1 Typ III in Schwann Zellen

Axonales Neuregulin 1 Typ III (NRG1) bindet an oligodendrogliale ErbB2/ ErbB3 Rezeptoren und startet die PI3K-abhängige Signalkaskade, wodurch die Synthese von Myelinproteinen gesteigert wird (Nave, 2010). Details siehe Text.

Die Interaktion von axonalem NRG1 TypIII mit dem glialen ErbB2/ ErbB3 Rezeptor findet an der axo-glialen Kontaktstelle statt, wodurch unterschiedlichste Second-messenger Kaskaden aktiviert werden, einschließlich des PI3K- und des MAPKinase-Signalwegs (Nave, 2010) (siehe Abbildung 14). Die Aktivierung der PI3Kinase führt zur Phosphorylierung von PIP₂ zu PIP₃, wodurch wiederum die Akt1 Kinase aktiviert wird, welche im Weiteren die Bildung von Myelin Proteinen fördert (Taveggia et al., 2011). Die Formierung von PIP₃ polarisiert die Schwann Zelle und fördert die Ausläufer-Bildung und Aktin-Dynamik, was wiederum zur Bildung der Myelinmembranen wichtig ist. Als Gegenspieler zu PIP₃ steht PTEN (*phosphatase and tensin homologue*), wodurch Hypermyelinisierung und pathologische Überproduktion von Myelinmembranen verhindert werden (Goebbels et al., 2010). NRG1 kann zusätzlich den intrazellulären Kalziumspiegel über die Phospholipase C_γ erhöhen, was letztendlich zur Aktivierung von Krox20 und P0 Genen führt (Kao et al., 2009). Des Weiteren führt NRG1 zu der Aktivierung einer Kinase, welche den Transkriptionsfaktor Yy1 phosphoryliert und damit zusätzlich Krox20 aktiviert (He et al., 2010).

Die Myelinisierung kann außerdem durch epigenetische Regulatoren, wie mikroRNAs oder Deacetylierungen von Transkriptionsfaktoren wie NFκB (*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*), beeinflusst werden (Pereira et al., 2012). Im adulten Ischiasnerv der Maus werden 87 mikroRNAs exprimiert (Viader et al., 2011). Die Regulation über mikroRNAs zeigt sich durch Herunterregulation des mikroRNA-Prozessierungsenzyms Dicer. Dadurch werden Inhibitoren der Myelinisierung stärker und Faktoren zur Förderung der Myelinisierung schwächer exprimiert (Yun et al., 2010) (siehe Abbildung 15). Nach Verletzungen an peripheren, myelinisierten Nervenzellen, in welchen Schwann Zellen dedifferenzieren, werden 48 miRNAs dynamisch reguliert (Viader et al., 2011).

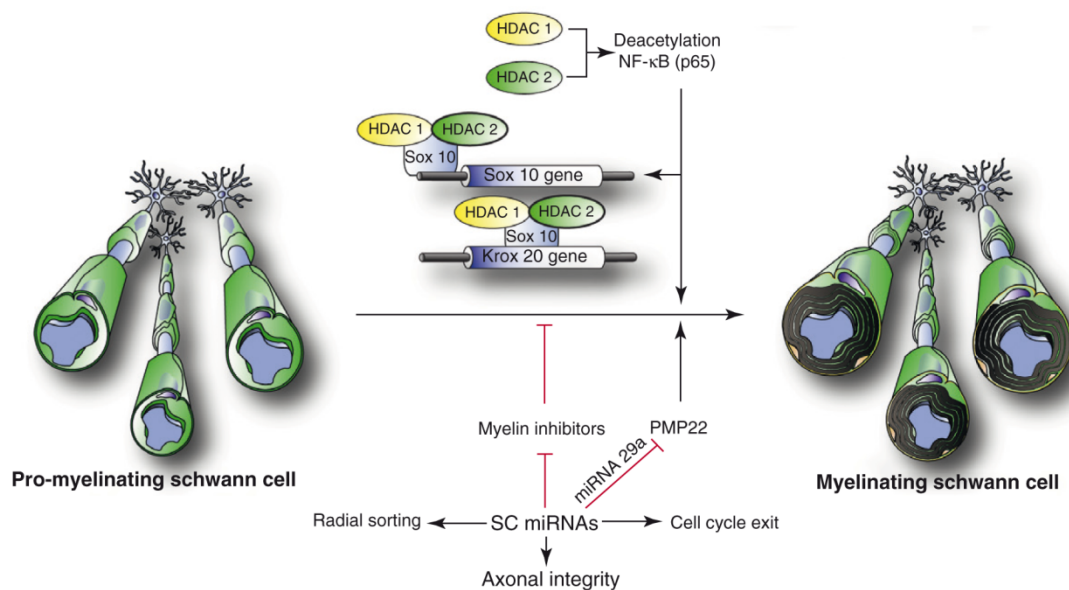


Abbildung 15: Regulation der Entwicklung von Schwann Zellen durch miRNAs und Histondeacetylasen

Die Entwicklung einer Pro-myelinisierenden Schwann Zelle zu einer myelinisierenden Schwann Zelle unterliegt der Regulation von Transkriptionsfaktoren durch Histondeacetylasen (HDAC) sowie der Regulation von Genen durch miRNAs (Pereira et al., 2012).

Darüber hinaus kann die Myelinisierung durch Deacetylierung des Transkriptionsfaktors NFκB (*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*) durch Histondeacetylasen wie HDAC1 und HDAC2 reguliert werden. Die Deacetylierung fördert die Aktivierung des Sox10 Gens und reguliert darüber die Expression von Krox20 (Chen et al., 2011) (Siehe Abbildung 15).

2.2 Kleine nicht-codierende RNAs im Nervensystem

Im Genom von Säugetieren werden nur etwa 1,2% der Gene in Proteine umgeschrieben, wobei ein Großteil der Gene transkribiert wird (Mehler and Mattick, 2006). Nicht-codierende RNAs (*non-coding RNAs*, ncRNA) können als regulatorische RNAs fungieren und in alle möglichen Prozesse innerhalb der Zelle eingreifen (Mattick, 2001). Es existieren unterschiedliche Formen von nicht-codierenden RNAs im PNS sowie im ZNS und die Entwicklung der Systeme hängt stark vom regulatorischen Netzwerk der ncRNAs ab (Mehler and Mattick, 2006). Es existieren lange nicht-codierende RNAs (*long non-coding RNA*, lncRNA) und kleine nicht-codierende RNAs (*small non-coding RNA*, sncRNA).

LncRNAs bezeichnen alle regulatorischen RNAs, die länger als 200 Nukleotide sind und sncRNAs alle mit einer Länge, die darunter liegt (Jeffrey M. Perkel, 2013). Im Weiteren Verlauf werden die sncRNAs genauer beschrieben. Die bisher am umfangreichsten untersuchten sncRNAs sind die mikroRNAs (miRNA). Es werden über 50% der menschlichen proteinkodierenden Gene über miRNAs reguliert (Farazi et al., 2008; Friedman et al., 2009). Während der ZNS-Entwicklung zeigen einige miRNAs spezifische Expressionsmuster, wodurch darauf zu schließen ist, dass miRNAs eine wichtige Funktion bei der Entwicklung des zentralen Nervensystems übernehmen (Krichevsky et al., 2004; Miska et al., 2004). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass miRNAs in Neuronen, in Astrozyten sowie in Oligodendrozyten exprimiert werden (Kim et al., 2004; Smirnova et al., 2005; Lau et al., 2008).

In den letzten Jahren konnte durch viele Studien gezeigt werden, dass Deregulationen von sncRNAs eine entscheidende Rolle in verschiedenen Erkrankungen spielen. Hierzu wurde die Datenbank *miR2Disease* erstellt, in welcher nach beteiligten miRNAs in spezifischen Erkrankungen gesucht werden kann (Jiang et al., 2009). Zum Beispiel sind in der neurodegenerativen Erkrankung Multiple Sklerose 16 unterschiedliche miRNAs dereguliert (vergleiche <http://www.mir2disease.org> (Stand Juli 2015)).

2.2.1 Unterschiedliche Formen von sncRNAs

Kleine nicht-codierende RNAs werden grundsätzlich in drei Hauptklassen eingeteilt; mikroRNAs (miRNA), *small interfering RNAs* (siRNA) und piwiRNA (piRNA). Die Einteilung in die unterschiedlichen Klassen erfolgt durch ihr jeweiliges Prozessierungsmuster sowie durch ihre jeweilige Funktion. In den letzten Jahren wurde allerdings deutlich, dass diese Klassen nicht immer klar voneinander abzugrenzen sind. Es existieren kleine nicht-codierende RNAs, die nicht dem Prozessierungsmuster von miRNAs folgen, allerdings mit den gleichen Cofaktoren assoziieren und die gleiche Funktion aufweisen. Durch genauere Analysen solcher sncRNAs entstand unter anderem die Klasse der srRNA (*small rDNA-derived RNA*) (Wei et al., 2013). Neben diesen Hauptklassen existieren noch weitere Unterklassen, welche hier allerdings nicht genauer behandelt werden sollen (Huang et al., 2013). Kleine nicht-codierende RNAs sind an vielen unterschiedlichen Prozessen innerhalb der Zelle, wie Entwicklung, Apoptose, Stammzellerneuerung, Differenzierung und Aufrechterhaltung der Zellintegrität über translationale Regulation von mRNAs oder deren Degeneration beteiligt (Huang et al., 2013).

2.2.2 Herkunft und Reifung von sncRNAs

MiRNAs werden endogen exprimiert, sind in der Regel 21-24 Nukleotide lang und regulieren Genexpression auf posttranskriptionellem Level über Basenpaarung der miRNA mit der Ziel-mRNA (Huang et al., 2013).

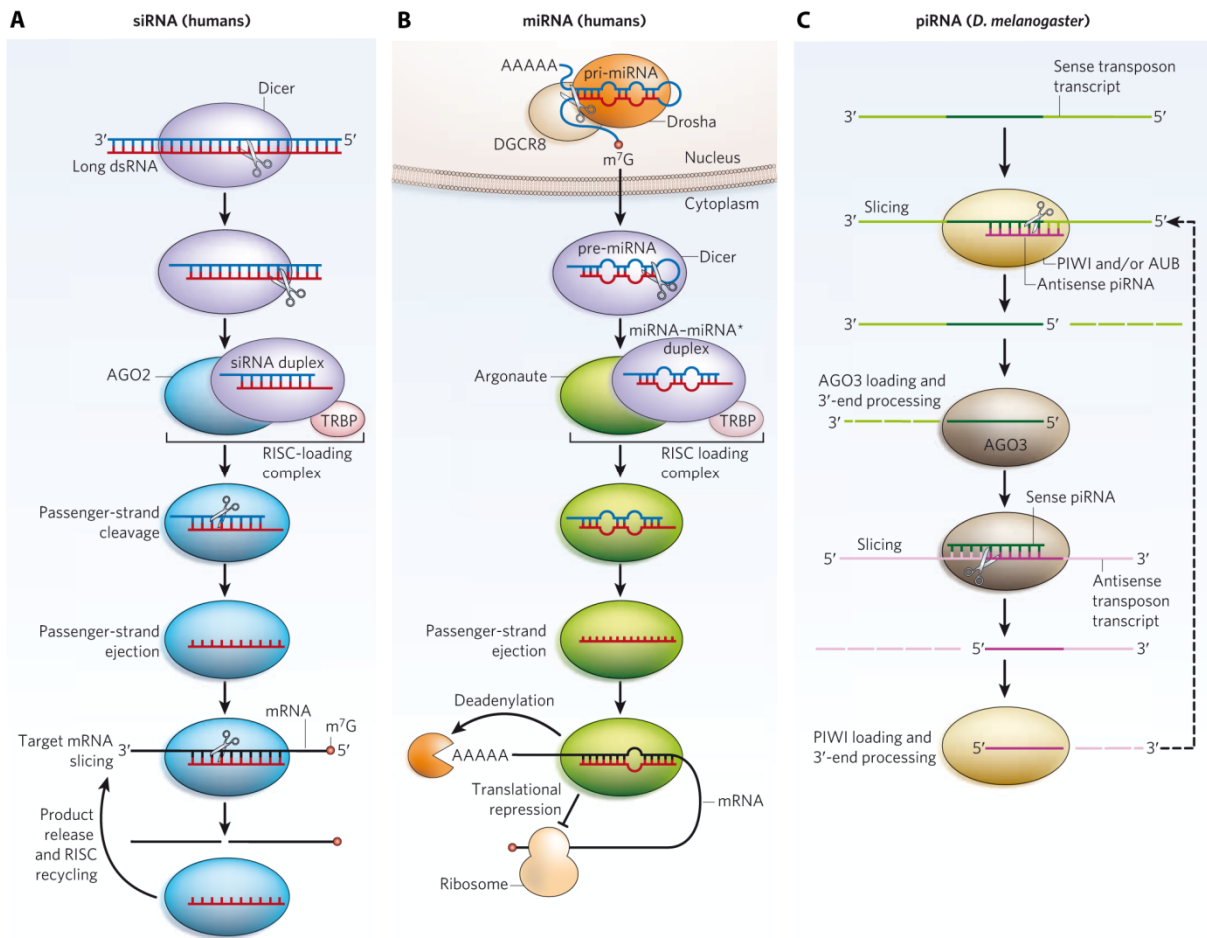


Abbildung 16: Reifung von siRNAs, miRNAs und piRNAs

A: Reifung von humanen siRNAs. Aus einer doppelsträngigen, langen RNA wird über den Enzymkomplex Dicer ein siRNA-Duplex gebildet, welcher innerhalb des RISC zur einzelsträngigen siRNA maturiert. Die siRNA bindet an Ziel-mRNAs und führt zur Degradation der mRNA (Jinek and Doudna, 2009).

B: Die Reifung von humanen miRNAs startet im Zellkern, wo aus einer langen Haarnadel-förmigen pri-miRNA durch den Enzymkomplex Drosha eine kürzere Haarnadel-förmige pre-miRNA entsteht. Diese wird ins Zytoplasma transportiert und über den Enzymkomplex Dicer weiter bis zur einzelsträngigen ~22nt langen miRNA verarbeitet, welche innerhalb des RISC für translationale Repression von Ziel-mRNAs verantwortlich ist (Jinek and Doudna, 2009).

C: PiRNAs reifen in der Keimbahn aus repetitiven Elementen zwischen Genen und können Ziel-RNAs spalten und posttranskriptionell degradieren (Jinek and Doudna, 2009).

Die Prozessierung von miRNAs, siRNAs und piRNAs ist in Abbildung 16 gezeigt. Die Maturierung von miRNAs beginnt im Nukleus durch die Bildung von haarnadelförmigen pri-miRNAs in einer RNA-Polymerase II-abhängigen Reaktion. Aus der 2-4kb langen pri-miRNA entsteht die 70-100nt lange pre-miRNA durch Prozessierung mithilfe des Drosha-Komplexes. Die pre-miRNA wird durch Exportin5 ins Zytoplasma transportiert wo die weitere Maturierung stattfindet. Ein Enzymkomplex, genannt Dicer, verarbeitet die haarnadelförmige pre-miRNA in einen doppelsträngigen miRNA/miRNA*-Duplex. Der Enzymkomplex Dicer ist auch an der Prozessierung von siRNAs beteiligt, wobei aus einer doppelsträngigen RNA ein siRNA-Duplex entsteht. Der Unterschied zwischen dem miRNA/miRNA*-Duplex und dem siRNA-Duplex besteht in der Genauigkeit der Basenpaarung. Während der miRNA/miRNA*-Duplex nur ungenau übereinstimmt, ist der siRNA-Duplex genau komplementär. Die Duplexe werden jeweils entwunden und aus dem miRNA/miRNA*-Duplex wird die miRNA* degradiert und die reife ~22nt lange miRNA in den sogenannten RISC (*RNA-induced silencing*

complex) eingebaut, in welchem sie dann zur translationalen Repression der mRNA oder zur mRNA-Degradierung führt. Der siRNA-Duplex wird auch entwunden und einer der ~22nt langen Stränge wird in einen RISC eingebaut, wo der siRNA-RISC-Komplex zum Abbau der mRNA führt (He and Hannon, 2004; Huang et al., 2013).

Eine weitere Klasse der sncRNAs sind die piRNAs. Sie verdanken ihren Namen der Interaktion mit PIWI-Proteinen, welche vorrangig in der Keimbahn exprimiert werden. Sie sind 24-30nt lang und essentiell an der Modulation der Spermiogenese beteiligt. PiRNAs entstehen aus repetitiven Elementen zwischen Genen und können Ziel-RNAs spalten und posttranskriptionell degradieren (Huang et al., 2013).

Eine relativ neu entdeckte Klasse der sncRNAs sind die srRNAs. Durch die Erkenntnis, dass die translationale Regulation durch miRNAs eine wichtige Rolle in allen Phasen der Zellentwicklung und in nahezu allen Organen spielt, stieg das Interesse an der Herkunft der jeweiligen miRNAs. Bei genauerer Untersuchung verschiedener bekannter miRNAs stellte sich allerdings in manchen Fällen heraus, dass einige der zuvor als miRNA bezeichneten sncRNAs nicht dem Prozessierungsmuster klassischer miRNAs folgen (zum Beispiel in Bauer et al., 2012). Es scheint damit verschiedene Prozessierungsmuster für kleine regulatorische RNAs zu geben und die Einteilung in klar abgegrenzte Klassen erscheint nicht trivial. Die Klasse der srRNAs beschreibt sncRNAs, welche während der Prozessierung der rRNA entstehen (Wei et al., 2013). Die rDNA besteht aus langen primären Transkripten, welche durch verschiedene Abstandsregionen (*spacer regions*) voneinander getrennt werden (siehe Abbildung 17).

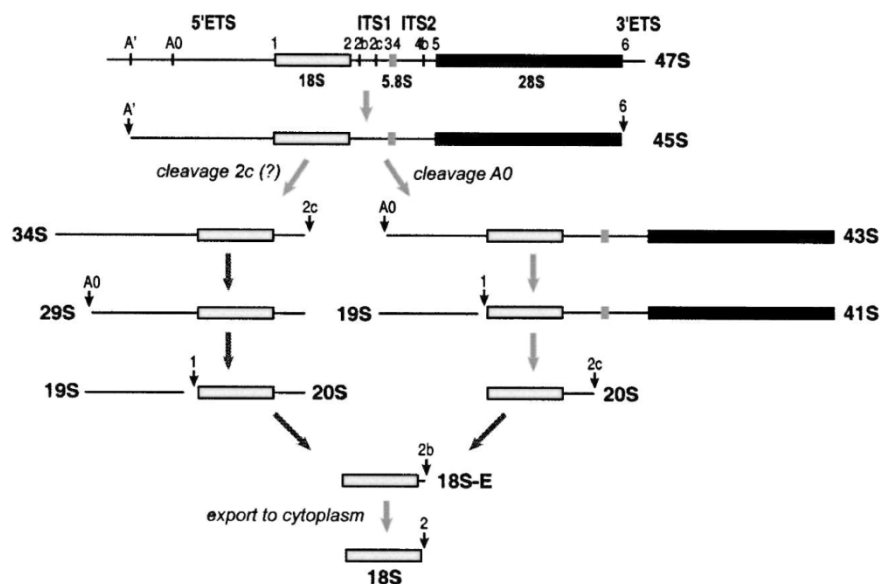


Abbildung 17: Reifung der 45kb rRNA

Die 45kb rRNA besteht aus drei Transkripten und verschiedenen ETS (*external transcribed spacer*) und ITS (*internal transcribed spacer*). In der 5'ETS Region liegen mehrere Sequenzen für kleine nicht-codierende RNAs. Aus der 45kb rRNA werden durch verschiedene Spaltungsschritte die 18S, 5,8S und die 28S rRNA gebildet. Während dieser Spaltungsschritte entstehen Überhänge, welche Sequenzen für die kleinen nicht-codierenden RNAs enthalten (Kent et al., 2009).

Die zwischen den Transkripten liegenden Regionen werden als IST (*internal transcribed spacer*) und die außerhalb werden als ETS (*external transcribed spacer*) bezeichnet. Innerhalb dieser nicht-kodierenden Regionen konnten einige sncRNAs bzw. deren Vorläufer durch Sequenzierungen identifiziert werden (Wei et al., 2013). Die Prozessierung der srRNAs ist Dicer-unabhängig und die srRNAs können mit Argonaut-Proteinen des RISC interagieren (Wei et al., 2013). Der genaue Mechanismus der Prozessierung von srRNAs bleibt allerdings bisher ungeklärt.

2.2.3 Translationale Regulation durch sncRNAs

Kleine nicht-codierende RNAs können über die Assoziation in Proteinkomplexen die Translation von spezifischen mRNAs inhibieren oder deren Degradation vermitteln. Die reife miRNA oder siRNA wird in den sogenannten RISC-Proteinkomplex geladen. Dieser besteht unter anderem aus Proteinen der Argonaut (Ago)-Familie sowie der GW182-Familie. Die sncRNA mit dem weniger stabil gepaarten 5' Ende bindet an das Ago-Protein, die andere wird degradiert (Meister, 2013). Diese Bindung wird vermittelt durch Hitzeschockproteine sowie über die Hydrolyse von ATP, wodurch das Ago-Protein in einer offenen Konformation gehalten wird (Johnston et al., 2010; Iki et al., 2010; Iwasaki et al., 2010). Besteht eine 100%ige Komplementarität zwischen der sncRNA und der Ziel-mRNA, wird die mRNA degradiert, sind die beiden RNAs nicht komplett komplementär, wird die mRNA translational gehemmt (Meister, 2013).

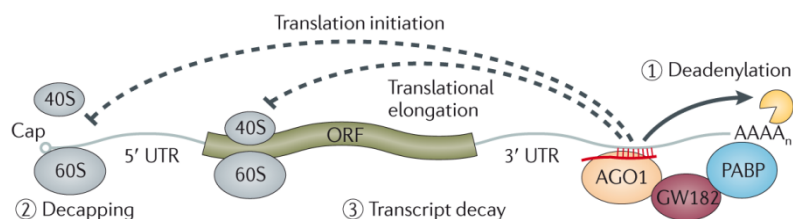


Abbildung 18: Translationale Regulation von mRNAs durch den miRISC

Die miRNA-abhängige translationale Regulation von mRNAs wird vermittelt durch den miRISC (*miRNA induced silencing complex*). Innerhalb des RISC bindet die kleine RNA an ein Ago Protein (in diesem Beispiel Ago1), welches wiederum mit GW182 interagiert. Die Translation wird durch Interaktion mit der 5'Cap oder mit Initiationsfaktoren gehemmt (Czech and Hannon, 2011).

Im miRISC (*microRNA-induced silencing complex*) ist unter anderem GW182-Protein assoziiert, welches für die Hemmung der Ribosomen verantwortlich ist und damit die translationale Repression vermittelt (Eulalio et al., 2008). Die Translation wird inhibiert, indem die Cap-abhängige Translation durch Interaktion mit dem Initiationsfaktor eIF4E (*eukaryotik translation initiation factor 4E*) gehemmt und die Rekrutierung der 40S Untereinheit und die 80S Komplex-Bildung gestört wird (Fabian et al., 2010) (siehe Abbildung 18).

2.2.3.1 Argonaut-Proteine

Die Familie der Argonaut-Proteine kann unterteilt werden in die AGO-Proteine und PIWI-Proteine. AGO-Proteine interagieren hauptsächlich mit kleinen regulatorischen RNAs. PIWI-Proteine werden von Keimzellen exprimiert, binden dort an piRNAs und sind beteiligt an der Hemmung von transposablen Elementen (Meister, 2013).

Im Folgenden werden allerdings die PIWI-Proteine vernachlässigt und die AGO-Proteine unter dem Begriff Argonaut-Proteine bzw. Agos genauer beschrieben. Die 97kDa großen Argonaut-Proteine sind Bestandteile des RISC, welcher für die miRNA-abhängige translationale Repression von mRNAs verantwortlich ist. Sie sind charakterisiert durch einen hoch-konservierten Aufbau. Sie bestehen aus einem Amino-Terminus (N), einer PAZ-Domäne (PIWI-ARGONAUT-ZWILLE), einer MID-Domäne (*middle*) und einer PIWI-Domäne (siehe Abbildung 19) (Meister, 2013; Czech and Hannon, 2011).



Abbildung 19: Struktureller Aufbau von Argonaut-Proteinen

Aufbau eines humanen Ago-Proteins am Beispiel von Ago2. Agos bestehen aus einem N-Terminus, einer PAZ-Domäne, einer MID-Domäne und einer PIWI-Domäne. Die Bindung von sncRNAs findet innerhalb der MID-Domäne statt (Czech and Hannon, 2011).

Die N-terminale Domäne ist an der Beladung des Argonaut-Proteins mit der kleinen RNA beteiligt und assistiert bei der Entwindung der sncRNA (Czech and Hannon, 2011). Die PAZ-Domäne verankert das 3'Ende der kleinen RNA in einer spezialisierten Bindungstasche (Jinek and Doudna, 2009). Die MID-Domäne stabilisiert das 5'Ende der kleinen RNA durch die Verankerung der C-terminalen Base mit einem konservierten Tyrosin in der MID-Domäne. Die PIWI-Domäne weist eine strukturelle Ähnlichkeit zur RNaseH auf, wodurch sie die Fähigkeit besitzt mRNAs abzubauen, die eine 100%ige Komplementarität zur miRNA aufweist. Diese katalytische Aktivität ist allerdings nur für das humane Argonaut-Protein Ago2 beschrieben. In Säugetieren werden vier verschiedene Proteine exprimiert, Ago1-4. Sie konnten innerhalb von sogenannten *cytoplasmic processing bodies* (P-bodies) sowie innerhalb des Zellkerns nachgewiesen werden, wo sie am mRNA-Abbau respektive an der Inhibition der Transkription beteiligt sind (Schraivogel and Meister, 2014; Johnston et al., 2010). Agos können allerdings auch die Translation reprimieren, ohne dass sie sich in P-bodies befinden (Iwasaki et al., 2009). Die Funktionen der vier unterschiedlichen Proteine in Säugetieren sind bislang noch nicht vollständig geklärt. Für Ago1 wird eine Funktion während des Alternativen Spleißens vermutet, Ago2 scheint essentiell an der frühen embryonalen Entwicklung beteiligt zu sein, Ago3 spielt eine Rolle bei der Stammzell-Proliferation und Ago4 scheint während der Spermatogenese integriert zu sein (Meister, 2013). Die Expression von Ago4 scheint nicht so verbreitet zu sein, wobei Ago1 und 3 in vielen Zelltypen nachgewiesen werden können (Meister, 2013). Es konnte innerhalb einer Massenspektrometrie-Studie auf HEK293T und HeLa Zellen gezeigt werden, dass Ago1 mit etwa 20-25%, Ago2 mit 60%, Ago3 mit 15% und Ago4 nur mit 1% an der Gesamt-Ago-Proteinmenge beteiligt sind (Petri et al., 2011). Alle mRNAs der vier Agos konnten in HEK293T und HeLa Zellen detektiert werden, wobei in HEK293T Zellen die mRNA von Ago2 und in HeLa Zellen Ago2 und Ago3 mRNA am stärksten exprimiert werden (Meister et al., 2004). In einer *in vitro* Studie von 2011 konnte die Interaktion eines synthetischen siRNAs-Duplexes mit allen vier Ago-Proteine gezeigt werden, allerdings wurde ein funktioneller RISC nur um Ago2 gebildet (Petri et al., 2011).

In *Drosophila melanogaster* konnte gezeigt werden, dass verschiedene miRNAs oder siRNAs in spezifische Ago-enthaltene Komplexe sortiert werden (Förstemann et al., 2009). Dieser Prozess wurde allerdings bisher für Agos von Säugetieren nicht nachgewiesen.

In den meisten beschriebenen Fällen wirkt der miRISC inhibierend auf die Translation der Ziel-mRNA, allerdings wird auch in einem Fall die translationale Aktivierung durch Assoziation mit dem miRISC beschrieben. Das *fragile X mental retardation-related protein 1* (FXR1) bindet spezifisch an Ago2 und aktiviert darüber die Translation von TNF α (*tumor necrosis factor α*) unter zellulären Stressbedingungen wobei die Interaktion mit Proteinen, welche Teil der translationalen Inhibition darstellen (wie GW182), aufgehoben ist (Vasudevan and Steitz, 2007).

2.2.3.1.1 Regulation von Argonaut-Proteinen

Argonaut-Proteine sind Schlüsselkomponenten des miRISC, in welchem sie in die translationale Regulation über miRNAs involviert sind. Da ein großer Teil der Gene auf posttranskriptioneller Ebene reguliert werden, die höchstwahrscheinlich verschiedene miRNAs binden, ist es naheliegend, dass dieser Prozess genauestens reguliert werden muss. Die Regulation des miRISC kann über die Assemblierung der verschiedenen Komponenten beeinflusst werden. Im Folgenden soll die Regulation der Argonaut-Proteine und deren Einfluss auf die miRNA-abhängige translationale Regulation beschrieben werden.

Argonaut-Proteine werden zur Regulation ihrer eigenen Homöostase durch Ubiquitinierung markiert. Durch Polyubiquitinierung werden Degradationsmaschinerien angeregt und die Autophagie in Gang gesetzt. Dadurch wird die Menge an Ago-Proteinen reguliert (Meister, 2013). Diese Form der Regulation interagiert allerdings nicht direkt mit der Bindung von sncRNAs und reguliert damit nur sekundär die miRNA-abhängige translationale Regulation.

In einer Studie aus 2011 wurde das humane Ago2-Protein auf mögliche Phosphorylierungsstellen untersucht (Rüdel et al., 2011). Es konnten sieben Aminosäuren innerhalb der Sequenz identifiziert werden, die phosphoryliert werden. Es wurde ein konserviertes Tyrosin an der Position 529 genauer untersucht, da sich dieses innerhalb der miRNA-bindenden MID-Domäne befindet. Durch Mutation dieses Tyrosins in ein Glutamin, welches die negative Ladung einer Phosphorylierung imitiert, wurde die Bindung zu einer miRNA verringert (Rüdel et al., 2011). Dieses Tyrosin scheint damit eine Rolle bei der Regulation der translationalen Inhibition von mRNAs zu spielen. Eine weitere, in dieser Publikation beschriebene Aminosäure ist ein Serin an der Position 387. Die Phosphorylierung an dieser Stelle scheint einen molekularen Schalter darzustellen zwischen dem Stadium der mRNA-Degradation oder der translationalen Repression der Ziel-mRNA. Die Phosphorylierung verändert das Stadium des miRISC in Richtung der translationalen Regulation, weg vom Stadium der mRNA-Degradation (Horman et al., 2013). Unter Stressbedingung scheint diese Phosphorylierung außerdem gesteigert zu sein, dies könnte darauf hindeuten, dass die mRNA unter Stressbedingungen durch translationale Repression geschützt wird, damit sie unter normalen Bedingungen wieder translatiert werden kann (Zeng et al., 2008). Ein weiteres Tyrosin an der Position 393 wird unter Hypoxie-Bedingungen phosphoryliert, wodurch die miRNA Reifung beeinflusst wird (Shen et al., 2013).

2.2.3.1.2 Argonaut-Proteine in Oligodendrozyten

Verschiedene Studien konnten zeigen, dass im Tiermodell zur chronisch demyelinisierenden Erkrankung Multiple Sklerose, der Experimentellen autoimmunen Encephalomyelitis (EAE), die Regulation von miRNAs verändert ist (Ma et al., 2014). Bis vor kurzem war allerdings noch unklar, ob

auch der miRISC von dieser Dysregulation betroffen ist. In 2015 konnten Lewkowicz und Kollegen zeigen, dass während des Verlaufs von EAE eines der Kernproteine des miRISC, Ago2, auf Protein- sowie auf mRNA-Ebene herunter reguliert wird (Lewkowicz et al., 2015). Somit scheint der gesamte miRNA-enhaltene miRISC in Oligodendrozyten im Mausmodell der Multiplen Sklerose gestört zu sein.

2.2.4 Kleine nicht-codierende RNA 715

Die kleine nicht-codierende RNA 715 (*small non-coding RNA*, sncRNA) ist eine 21nt lange regulatorische RNA (5'CUCCGUGCACACCCCGUG'3), welche bisher in Oligodendrozyten, Astrozyten, Neuronen und Mikroglia beschrieben wurde, wobei die Expression in Oligodendrozyten deutlich am stärksten ist (Bauer et al., 2012). Die sncRNA715 wurde zu Anfang als miRNA kategorisiert, scheint allerdings nicht dem Prozessierungsmuster klassischer miRNA zu folgen und wird damit eher allgemein in die Klasse der sncRNAs eingeordnet. Die Sequenz der sncRNA715 konnte innerhalb der 45kb rRNA lokalisiert werden und gehört damit zur Klasse der srRNAs (*small rRNA-derived RNA*) (Wei et al., 2013). Es wird vermutet, dass die reife sncRNA715 während der Prozessierung der rRNA über verschiedene Spaltungsschritte entsteht. Wie genau die Reifung aus dem Vorläufermolekül auf der rRNA zur reifen sncRNA 715 erfolgt bleibt allerdings bislang noch ungeklärt.

2.2.4.1 Translationale Regulation der *Mbp* mRNA durch sncRNA 715 in Oligodendrozyten

Die sncRNA715 spielt eine entscheidende Rolle in der translationalen Regulation von *Mbp* mRNA während des Transports zur axo-glialen Kontaktstelle innerhalb des RNA Granulas (Bauer et al., 2012). Die Regulation der Proteinsynthese durch kleine RNAs in Oligodendrozyten wurde bisher umfassend untersucht und es konnte gezeigt werden, dass alle Phasen der oligodendroglialen Entwicklung von dieser Form der Regulation beeinflusst werden (Zhao et al., 2011; Zheng et al., 2012, 2010; Lin et al., 2013; Dugas et al., 2010; Dugas and Notterpek, 2011). Die sncRNA715 bindet innerhalb der 3'UTR die *Mbp* mRNA und unterdrückt über diese spezifische Bindung die Translation. Die Überexpression einer synthetischen sncRNA715 in primären Oligodendrozyten führt zu einer verringerten MBP Synthese, wobei die Inhibierung der endogenen sncRNA715 in einer verstärkten MBP Synthese resultiert (Bauer et al., 2012). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass in humanen Multiple Sklerose Proben innerhalb der chronischen Läsionen im Gehirn, in denen kein Myelin Basisches Protein detektiert werden kann, allerdings relativ normale Mengen an *Mbp* mRNA exprimiert werden, die sncRNA715 im Vergleich zur normal erscheinenden weißen Substanz stark hoch reguliert ist (Bauer et al., 2012). Dies legt die Vermutung nahe, dass möglicherweise die MBP Translation innerhalb der Läsionen durch Inhibition der endogen exprimierten sncRNA715 beeinflusst werden könnte. Dies wird allerdings nicht so einfach umzusetzen sein, da die Expression der sncRNA715 sowie die MBP Protein Synthese spezifisch nur in diesen Läsionen beeinflusst werden müsste und nicht innerhalb der normal erscheinenden weißen Substanz, in welcher die MBP Synthese nicht verändert ist.

2.3 Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit sollte im ersten Teil die Rolle der Argonaut-Proteine bezüglich der MBP Synthese in Oligodendrozyten geklärt werden. Argonaut-Proteine spielen eine entscheidende Rolle während der translationalen Inhibition von mRNAs durch miRNAs (Meister, 2013). In Oligodendrozyten spielt die posttranskriptionelle Regulation durch miRNAs während der Reifung eine ausschlaggebende Rolle und die lokale Translation von *Mbp* wird durch die kleine nicht-codierende RNA 715 reguliert (Dugas et al., 2010; Bauer et al., 2012). Es gilt die Frage zu beantworten, welche Argonaut-Proteine in Oligodendrozyten exprimiert werden und ob möglicherweise die translationale Regulation durch sncRNA715 über Argonaut-Proteine vermittelt wird.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte die Expression der sncRNA715 im peripheren Nervensystem untersucht werden. Auch im PNS wird MBP als mRNA in die Peripherie transportiert und dort lokal translatiert (Trapp et al., 1987). Der genaue Ablauf dieses Transports und die Regulation der Translation bleiben bisher allerdings ungeklärt. Damit stellte sich die Frage, ob die translationale Inhibition der Schwann Zell-*Mbp* mRNA möglicherweise auch durch die sncRNA715 vermittelt wird.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien und Geräte

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

Tabelle 1: Verwendete Geräte

	Hersteller	Bezeichnung
Zentrifugen	Eppendorf	Centrifuge 5415R
	Heraeus	Labofuge 6000
		Megafuge 1.0R
Mikroskop	Leica	DMIRB
	Olympus	40x Objektiv (UPlanFLN; NA=0,75)
		60x Ölobjektiv (UPlanSApo; NA=7,35)
		IX81 Mikroskop
Fluoreszenz CCD-Kamera XM10		
PCR-Gerät	Eppendorf	Mastercycler Personal
RT-PCR-Gerät	Roche Applied Science	Light Cycler 1.5
Heizblock	Techne	DRI-Block DB2D
Agarosegel Imager	Biorad	Chemi Doc XRS+
Western Blot Imager		
SDS-Page/ Western Blot Kammer		Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell
Spectrophotometer	PeqLab	Nanodrop 2000
Mikrotiter-Plattenleser	TECAN	Infinite M1000
Thermomixer	Eppendorf	Thermomixer Comfort
Rotationsrad	LabNet	Revolver Rotator
Zellinkubator	Thermo Scientific	HeraCell 240
Hybridisierungsöfen und Crosslinker	UVP	HL-2000 Hybrilinker
Software	Microsoft	Excel
	Adobe	Photoshop CS4
		Illustrator CS4
	Pfaffl, Horgan, Vainstein, Avery	REST- gene regulation
BioRad	ImageLab 2.0	

Tabelle 2: Verwendete Reagenzien

Hersteller	Reagenz
AppliChem	Ampicillin Natriumsalz
Starlab	einmal Pipettenspitzen (2µl, 20µl, 200µl, 1000µl)
Promega	DNA-Purification: Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System

	<u>PureYield Plasmid Miniprep</u> : Mini/Midi/Maxi Kit <u>Transfektion</u> : Fugene HD <u>PCR</u> : Pfu-Polymerase, Pfu-Reaktionspuffer
<i>Life Technologies</i>	<u>Zellkultur</u> : DMEM (high glucose), HBSS, Trypsin, PenStrp <u>Transformation</u> : DH5alpha <u>SDS-Page</u> : NuPAGE LDS Sample Buffer (4x) <u>Northern Blot</u> : ULTRAPure™ TBE Puffer 10x; NOVEX™ TBE Ureal Gel; NOVEX™ Urea Ladepuffer 2x <u>Immunpräzipitation</u> : Dynabeads Protein G
<i>Roth</i>	<u>Agarosegele</u> : Ethidiumbromid, Agarose NEO Ultra-Qualität <u>SDS-Page Herstellung</u> : Roti Stock 20x <u>Western Blot</u> : Milchpulver; 10x Rotiphorese Laufpuffer <u>Immuncytochemie</u> : Roti Histofix (PFA 4%) <u>RNA-Arbeiten</u> : Rnase ZAP
<i>NEB</i>	<u>PCR</u> : dNTPs <u>Klonierung</u> : T4-DNA Ligase, Restriktionsenzyme <u>Western Blot</u> : Gel Loading Dye 6x Blue <u>DNA-Marker</u> : 1 kb DNA Ladder, 100 bp DNA Ladder <u>MiRNA Marker</u> : microRNA Marker
<i>Qiagen</i>	<u>RNA-Extraktion</u> : miRNasy Mini Kit <u>DNase-Verdau</u> : RNase free DNase Set <u>Realtime-PCR</u> : QuantiTect Primer Assay für Ago1-4 und Aktin; QuantiTect Sybr Green PCR; Fast advanced Mastermix <u>Reverse Transkription</u> : TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit
<i>Roche Applied Science</i>	<u>Reverse Transkription</u> : Transkriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit <u>Realtime-PCR</u> : Taqman Universal Master Mix; Universal Probes <u>Proteinbiochemie</u> : PhosStop Phosphatase Inhibitoren; Complete EDTA-free Protease Inhibitoren
<i>Merck Millipore</i>	<u>Western Blot</u> : Immobilion™ Western Chemiluminescent HRP Substrate
<i>Ambion</i>	<u>Northern Blot</u> : ULTRA Hyb Hybridisierungspuffer
<i>Sigma</i>	<u>Immunpräzipitation</u> : Anti-FLAG M2 Magnetic Beads; FLAG-Peptid; Dynabeads His-Tag Beads

3.2 Puffer und Medien

Tabelle 3: Verwendete Puffer und Medien

allgemeine Medien	
PBS	150 mM NaCl; 8 mM Na ₂ HPO ₄ ; 1,7 mM NaH ₂ PO ₄ ; pH 7,2
TBS	150 mM NaCl ; 50 mM Tris , pH 7,2
TBST	TBS + 0,1% (v/v) Tween 20
Molekularbiologie	
50 x TAE Buffer	242 g Tris (2M); 100 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 (50mM); 57,1 ml Essigsäure; auf 1000ml mit ddH ₂ O auffüllen
4% Agarosegel	3% Sieve Agarose; 1% Agarose NEEO Ultra; in 1xTAE

Proteinbiochemie	
Lysispuffer 1 (+Triton, +150mM NaCl)	50mM Tris; 150mM NaCl; 1mM EDTA; 1%(v/v) Triton-X-100; 1 PhosStop Phosphatase Inhibitoren; Complete EDTA-free Proteaseinhibitoren
Lysispuffer 2 (+Triton, -EDTA, +300mM NaCl, 150mM Imidazol)	50mM Tris; 300mM NaCl; 150mM Imidazol; 1%(v/v) Triton-X-100; PhosStop Phosphatase Inhibitoren; Complete EDTA-free Proteaseinhibitoren
Lysispuffer 3 (-Triton, -EDTA, +300mM NaCl, 150mM Imidazol)	50mM Tris; 300mM NaCl; 150mM Imidazol; PhosStop Phosphatase Inhibitoren; Complete EDTA-free Proteaseinhibitoren
Lysispuffer 4 (-Triton, -EDTA, +300mM NaCl, 500mM Imidazol)	50mM Tris; 300mM NaCl; 500mM Imidazol; PhosStop Phosphatase Inhibitoren; Complete EDTA-free Proteaseinhibitoren
Elutionspuffer (His IP)	50mM Natriumphosphat (pH 8,0); 300mM NaCl; 0,01%(v/v) Tween 20; 2M Imidazol; PhosStop Phosphatase Inhibitoren; Complete EDTA-free Proteaseinhibitoren
W&B Puffer	Phosphatpuffer pH 8,0; 0,001% Tween20
Western Blot Transfer buffer	24 mM Tris, 192 mM Glycine, 20% Ethanol
Blockierungs-Lösung	4% (w/v) Trockenmilchpulver in TBST
Zellkultur	
10 x Poly-L-Lysine (PLL)	0,1 % PLL in ddH ₂ O
Sato 2 %HS (Oli- <i>neu</i> Wachstumsmedium)	DMEM; 10 µg/l Transferrin; 100 µM Putrescine; 200 nM Progesteron; 500 nM TIT; 220 nM Na-Selenit; 520 mM L-Thyroxin; 25µg/ml Gentamycin; 2% (v/v) Horse Serum
<u>Super-Sato</u> : Sato/ B27 supplement 1% HS (primäre Ratten-Oligodendrocyten)	13,4 g/l DMEM; 2 g/l NaHCO ₃ ; 20 ml/l B27 Zusatz; 0,011 % Pyruvate; 500 nM TIT; 520 mM L-Thyroxine; 0,05 % Gentamycin; 1% (v/v) Horse Serum
BME ⁺	BME; 10%FCS; 2mM Glutamax; 100.000Units Penicillin/ Streptomycin
Papain-Lösung	30U/ml Papain; 0,24mg/ml L-Cystein; 40µg/ml DNase I Typ IV; 1xMEM; sterilfiltriert
Trypsin/ EDTA	0,01% Trypsin (Stock: 1 % in HBSS-); 0,02% EDTA (Stock: 0.2 % in HBSS-) in HBSS-
DMEM 10% FCS	DMEM (Invitrogen); 10% FCS; 20.000 Units Penicillin /Streptomycin
DMEM 10%HS	DMEM (Invitrogen); 10% HS
<u>MACS-Medium</u> (primäre Maus-Oligodendrozyten, Kultivierungsmedium)	MACS Neuro Medium; 2mM Glutamine; 1:50 NeuroBrew (Miltenyi); 100 Units Penicillin/Streptomycin (100U)
DMEM +P/S +GLX (primäre Schwann Zellen)	DMEM; 100U/ml Penicillin/ Streptomycin; 2mM Glutamax
DMEM +P/S +GLX +FCS (primäre Schwann Zellen)	DMEM; 100U/ml Penicillin/ Streptomycin; 2mM Glutamax; 10% FCS

DMEM +P/S +GLX +FCS +AraC (primäre Schwann Zellen)	DMEM; 100U/ml Penicillin/ Streptomycin; 2mM Glutamax; 10% FCS; 10µM AraC
Expansionsmedium (primäre Schwann Zellen)	DMEM; 4µM Forskolin, 10ng/ml recombinant human NRG1 beta1 EGF domain; 10% FCS
definiertes Medium (primäre Schwann Zellen)	1/2 DMEM; 1/2 HamF12; 0,03% BSA; 100µM Putrescine; 100µg/ml Transferrin; 11nM Progesteron; 400ng/ml T4; 10ng/ml T3; 38ng/ml Dexamethason; 16ng/ml Natriumselenit; 0,5% FCS
Kultivierungsmedium IMS32	DMEM; 4mM Glutamin; 10% FCS
Kultivierungsmedium HEK293T Zellen	DMEM; 10%FCS; 20.000Units Penicillin/ Streptomycin
Northern Blot	
0,5x TBE	50ml 10x ULTRAPure™ TBE; 950ml depcH ₂ O
1xTBE	100ml 10x ULTRAPure™ TBE; 900ml depcH ₂ O
Tween Puffer	100mM Tris/HCL; 150mM NaCl; 0,3% Tween 20; in depcH ₂ O
AP Puffer	100mM Tris/HCL; 100mM NaCl; 5mM MgCl ₂ ; in depcH ₂ O
Blockingpuffer	100mM Tris/HCL; 150mM NaCl; pH 7,5; 1% Blockingreagenz; in depcH ₂ O

3.3 Antikörper

3.3.1 Primäre Antikörper

Tabelle 4: Verwendete Primärantikörper

Antigen	Spezies	Verdünnung	Hersteller
βAktin	Kaninchen	1:1000 WB	Sigma
Argonaute 1	Kaninchen	1:1000 WB	Cell Signaling
Argonaute 2	Kaninchen	1:500 WB; 1:50 IZC	Abnova
Argonaute 2	Kaninchen	1:1000 WB	Cell Signaling
FLAG-Tag	Maus	1:1000 WB	Sigma
FLAG-Tag	Kaninchen	1:1000 WB	Sigma
FLAG-Tag, Magnetic Beads	Maus		Sigma
Fyn-Kinase (monoklonal)	Maus	1:250WB	BD
Fyn-Kinase (polyklonal)	Kaninchen	1:500 WB	Santa Cruz
GAPDH	Kaninchen	1:5000 WB	Bethyl
MBP	Ratte	1:500 WB; 1:50 IZC	Serotec
4G10 Platinum, Anti Phosphotyrosine	Maus	1:1000 WB	Merck Millipore
4G10 Platinum, Anti Phosphotyrosine, Agarose Conjugate	Maus		Merck Millipore
Src p418	Kaninchen	1:1000 WB	Invitrogen
αTubulin	Maus	1:5000 WB	Sigma

hnRNP A2	Maus	1:1000 WB	Sigma
hnRNP A2	Kaninchen	1:50 IZC	Sigma
HA Tag	Ratte	1:1000 WB	Roche Applied Science
Myc Tag	Maus	1:500 WB	J. Trotter, Mainz
CNPase	Maus	1:500 WB	Sigma
S100	Maus	1:200 IZC	Merck Millipore

WB = Western Blot, IZC = Immunzytochemie, NB = Northern Blot

3.3.2 Sekundäre Antikörper

Tabelle 5: Verwendete Sekundärantikörper

Spenderspezies	Zielspezies/ -Tag	Konjugation	Verdünnung WB	Hersteller
Ziege	mouse	HRP	1:10000 WB	Dianova
Ziege	rat	HRP	1:10000 WB	Dianova
Ziege	rabbit	HRP	1:10000 WB	Dianova
Ziege	mouse	Alexa 568	1:400 IZC	Invitrogen
Ziege	rabbit	Cy2	1:100 IZC	Dianova
Ziege	rat	Cy5	1:300 IZC	Dianova
Esel	rabbit	DyLight 488	1:100 IZC	Dianova
Esel	rat	DyLight 649	1:100 IZC	Dianova
Schaf	Digoxigenin	AP	1:5000 NB	Roche Applied Science
Ziege	Biotin	AP	1:5000 NB	Cell Signalling

WB = Western Blot, IZC = Immunzytochemie, NB = Northern Blot, HRP = horse radish peroxidase, AP = alkaline phosphatase

3.4 Plasmide, Primer, LNA-Sonden, 715-mimic

Tabelle 6: Verwendet Plasmide

Plasmid	Alias	Herkunft	Quelle
pIRESneo-FLAG/HA Ago1 (Plasmid #10820)	Ago1-FLAG/HA	AddGene	Meister et al., 2004
pIRESneo-FLAG/HA Ago2 (Plasmid #10821)	Ago2-FLAG/HA	AddGene	Meister et al., 2004
plreSneo-FLAG/HA Ago3 (Plasmid #10823)	Ago3-FLAG/HA	AddGene	Meister et al., 2004
pIRESneo-FLAG/HA Ago4 (Plasmid #10824)	Ago4-FLAG/HA	AddGene	Meister et al., 2004
pIRESneo-FLAG/HA Ago2 Y393F	Ago2 Y393F-FLAG/HA	AddGene (Mutation im Rahmen dieser Arbeit eingefügt)	

pIRESneo-FLAG/HA Ago2 Y529F	Ago2 Y529F-FLAG/HA	AddGene (Mutation im Rahmen dieser Arbeit eingefügt)	
pIRESneo-FLAG/HA Ago2 Y393F+Y529F	Ago2 Y393F Y529F-FLAG/HA	AddGene (Mutation im Rahmen dieser Arbeit eingefügt)	
Ago2-Myc/His	Ago2-MH	Im Rahmen dieser Arbeit kloniert	
Ago2-Myc/His Y393F+Y529F	Ago2 Y393F Y529F-MH	Im Rahmen dieser Arbeit kloniert	
pEGFP-C3	GFP	Clontech	
pcDNA3.1 FynBWT	FynWT		White et al., 2008
pcDNA3.1 FynB+	Fyn+		White et al., 2008
hnRNP A2-Myc/His	A2-Myc/His	Im Rahmen dieser Arbeit kloniert	
hnRNP A2-FLAG	A2-FLAG	Im Rahmen dieser Arbeit kloniert	
hnRNP A2b-FLAG	A2b-FLAG	Im Rahmen dieser Arbeit kloniert	
pMSVhyg	hygro	zur Verfügung gestellt von J.Trotter, Mainz	
MBP14-IRES-GFP (MBP14-3'UTR)	MBP14	zur Verfügung gestellt von M. Simons, Göttingen	

Tabelle 7: Verwendete PCR Primer für den Nachweis der Ago-Isoformen

Gen	Sequenz (5'→3')	Schmelztemperatur [°C]	Amplikonlänge [bp]
Ago1	5'AGCGGCAGGTGCCTAC3'	69	427
	5'GGATCTGGCCACTGACC3'	65	
Ago2	5'ATATGCCTTCAAACCTCCACC3'	48	427
	5'CCAGGGCCTGGATCGTC3'	71	
Ago3	5'ACAAGCCTGTCAGCACTAAC3'	50	580
	5'CAGACTTCTAGTGGCAGGTATG3'	50	
Ago4	5'GGAGCTCCTCTACAGCCAGG3'	65	544
	5'CAAGCCGGGCATAATATGC3'	53	

Tabelle 8: Verwendete PCR Primer für die Herstellung von Ago2-Myc/His Konstrukten

Gen	Primer Name	Sequenz (5'→3')	Schmelztemperatur [°C]	Amplikonlänge [bp]
Ago2	Ago2 HindIII forward	GTTATCAAGCTTATGTACTCGGGAG	51	2604
	Ago2 XbaI reverse	GCTACTTCTAGAAGCAAAGTACATG	49	2604

Tabelle 9: Verwendete SYBR-Green basierte qPCR Assays

Zielgen	Assay Name	Hersteller
Ago1	Mm_Eif2c1_1_SG	Qiagen
Ago2	Mm_Eif2c2_2_SG	Qiagen
Ago3	Mm_Eif2c3_1_SG	Qiagen
Ago4	Mm_Eif2c4_1_SG	Qiagen
β Aktin	Mm_Actb_1_SG	Qiagen

Tabelle 10: Verwendete Primer für die qPCR auf mRNAs

Primer Name	Spezies	Sequenz	UPL Sonde	Amplikonlänge [bp]
MBP	Maus	5' AACATTGTGACACCTCGAACAA3'	58	88
		5' TGTCTCTTCTCCCCAGCTA3'		
G6PDH	Maus	5' GAAAGCAGAGTGAGCCCTTC3'	78	81
		5' CATAGGAATTACGGGCAAAGA3'		

Tabelle 11: Verwendete Primer Assays für die qPCR auf sncRNAs

Ziel sncRNA	Assay Name	Assay-ID	Hersteller
sncRNA715	mmu-miR-715	001649	Applied Biosystems
snoRNA135	snoRNA135	001230	Applied Biosystems

Tabelle 12: Verwendete Primer für die Zielgerichtete Mutation von Ago2-FLAG/HA-Plasmiden

Primer Name	Sequenz
Ago2 Y393F +BamHI_sense	5'GTGCAAGTTTCAACACCGGATCCATTCGTCGGTGAATTT3'
Ago2 Y393F +BamHI_antisense	5'CACGTTCAAAGTTGTGCCTAGGTAAGCAGGCACTTAAA3'
Ago2 Y529F +MluI_sense	5'CCGGCAAGACGCCCGTGTTCCGCCGAGGTCAAACGCGTGGGAGAC3'
Ago2 Y529F +MluI_antisense	5'GGCCGTTCTGCGGGCACAAGCGGCTCCAGTTTGCGCACCTCTG3'

Tabelle 13: Verwendete LNA-Sonden und 715-mimic

Name	Sequenz	Hersteller
LNA snRNA715	5'DIG-CACGCGGGGGTGTGCACGGAG-DIG3'	Exiqon
LNA snRNA U6	5'CACGAATTTGCGTGTTCATCCTT-DIG3'	Exiqon
715-mimic	5'-UCCGUGCACACCCCGCGUG3'	Qiagen

3.5 Zellkulturen

3.5.1 Kultivierung von HEK293T Zellen

HEK293T Zellen wurden freundlicherweise von Prof. Dr. C. Pietrzik (Universitätsmedizin Mainz) zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden in DMEM+10%FCS+Penicillin/Streptomycin kultiviert. Sie wurden in unbeschichteten Zellkulturgefäßen kultiviert und zum Passagieren in frischem Medium abgespült und in definierter Konzentration in ein neues Kulturgefäß überführt.

3.5.2 Kultivierung von Oli-*neu* Zellen

Oli-*neu* Zellen entstammen oligodendroglialen Vorläuferzellen, welche durch Infektion mit dem replikationsdefekten Retrovirus *neu* immortalisiert wurden. Das Onkogen *neu* wurde durch Inkubation der OPCs mit dem retrovirusbeinhaltenden Überstand der Zelllinie *GPE-neu* eingebracht (Jung et al., 1995). Damit entstand eine oligodendrogliale Vorläuferzelllinie, die differenzierungsdefizient im Vorläuferstadium proliferiert.

Oli-*neu* Zellen wurden in Sato-Medium +2%HS bei 37°C und 5-7,5% CO₂ kultiviert (Trotter and Schachner, 1989). Die Zellen wurden in Poly-L-Lysin-beschichtete Kulturschalen/ -Flaschen kultiviert und während des Passagierens mit Trypsin/EDTA abgelöst, in kaltem DMEM+10%HS aufgenommen und abzentrifugiert. Das Pellet wurde in definiertem Volumen Sato-Medium aufgenommen und anschließend gezählt und ausplattiert.

3.5.3 Kultivierung von IMS32 Zellen

IMS32 Zellen sind eine spontan immortalisierte murine Schwann Zelllinie (Watabe et al., 1995). Sie wurden freundlicherweise nach Rücksprache mit Dr. Kazuhiko Watabe (Institut of Medial Science, Tokyo) von Dr. Xavier Fontana (MRC-LMCB, London) zur Verfügung gestellt. Die Kultivierung der IMS32 Zellen erfolgte in DMEM+ 4mM L-Glutamin+ 10%FCS bei 37°C und 5%CO₂. Zum Passagieren wurden die Zellen mit 0,25%Trypsin/EDTA vom unbeschichteten Kulturgefäß abgelöst, in kaltem DMEM10%FCS aufgenommen, abzentrifugiert und in Kultivierungsmedium ausplattiert.

3.5.4 Herstellung und Kultivierung von primären Oligodendrozyten

Es wurden zwei unterschiedliche Methode zur Herstellung von dissoziierten primären Oligodendrozyten verwendet. Oligodendrozyten aus der Ratte wurden mithilfe der „*Oligo-Shake*“-Methode hergestellt (Trotter et al., 1989) und die Herstellung von primären Maus-Oligodendrozyten wurde mithilfe der GentleMACS-Methode (Miltenyi Biotec) und NG2-gekoppelten Mikro-Beads durchgeführt.

Es wurden die Meningen von 6 neugeborenen Whistar Ratten-Gehirnen gründlich entfernt und das Mittelhirn sowie beide Hemisphären wurden herauspräpariert. Die Gehirne wurden in einer Papain-Lösung für eineinhalb Stunden bei 37°C dissoziiert, in 10ml DMEM+10%FCS+P/S aufgenommen und abzentrifugiert. Das Pellet wurde in DMEM+10%FCS+P/S und nacheinander 4mal mit einer 19Gauge Nadel und 4mal mit einer 23Gauge Nadel trituriert. Die entstandene Zellsuspension wurde in drei PLL-beschichtete T75 Zellkulturschalen ausplattiert und bei 37°C und 5%CO₂ inkubiert. Die Kultur wurde alle zwei Tage mit BME⁺ gewaschen und nach etwa 10 bis 12 Tagen bildete sich ein dichter Astrozytenrasen auf welchem sich Mikroglia-Zellen und Oligodendrozyten-Vorläuferzellen absetzten. Die Mikroglia wurden vorsichtig abgeklopft und abgesaugt. Die fester auf dem Zellrasen adhärennten OPCs wurden durch Abschütteln in BME⁺ von dem Astrozytenrasen gelöst und abgenommen. Nach Zentrifugation wurden die OPCs in Super-Sato Medium aufgenommen und für 30Sekunden in eine 3,5cm Schale plattiert. Dieser Schritt bewirkt das Absetzen von verbliebenen Mikroglia. Der Überstand wurde abgenommen, gezählt und in PLL-beschichtete Kulturgefäße plattiert.

Bei der GentleMACS-Methode nach Miltenyi Biotech wurden die Zellen mit an NG2-Antikörper Mikro-Beads aufgereinigt, wobei eine Kultur von Oligodendrozyten-Vorläuferzellen entsteht. Zu Beginn wurden C57BL/6 Maus-Gehirne von 9 Tage alten Jungtieren mit dem *Neural-Tissue-Dissociation-Kit* mit Papain (Miltenyi Biotech) nach Herstelleranweisung in eine Einzelzellsuspension verarbeitet. Diese Zellsuspension wurde mit an NG2-Antikörper gekoppelte magnetische Mikrobeads (Anti-AN2 MicroBeads, Miltenyi Biotech) inkubiert und anschließend über einen Magneten (QuadroMACS Separator, Miltenyi Biotech) nach Benutzeranweisung aufgereinigt, in MACS-Medium eluiert und in PLL-beschichtete Kulturgefäße ausplattiert.

3.5.5 Herstellung und Kultivierung von primären Schwann Zellen

Das Protokoll zur Präparation primärer Schwann Zellen wurde freundlicherweise von Dr. Susanne Quintes (MPI Experimentelle Medizin, Göttingen) zur Verfügung gestellt. Primäre Schwann Zellen wurden aus drei Tage alten Whistar Ratten gewonnen. Es wurden jeweils die Ischiasnerven herauspräpariert und in einer Mixtur aus Kollagenase und Trypsin für zwei Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die Suspension wurde in 3ml DMEM +1ml FCS aufgenommen und abzentrifugiert. Das Pellet wurde in DMEM+P/S+GLX+FCS aufgenommen und ausplattiert. Nach 24 Stunden wurde das Medium gegen DMEM+P/S+GLX+FCS+AraC ausgetauscht um kontaminierende Fibroblasten zu entfernen. Drei Tage nach der Präparation wurde das Medium abgenommen und die Zellen wurden in Expansionsmedium kultiviert. Es wurde alle 2-3 Tage ein voller Medienwechsel durchgeführt, bis die primären Schwann Zelle eine circa 80-100%ige Konfluenz erreichten. An diesem Punkt wurden die Zellen entweder passagiert oder zur Differenzierung mit definiertem Medium behandelt. Zum Passagieren der Zellen wurden diese in 0,25%Trypsin/EDTA inkubiert, in DMEM+10%FCS aufgenommen und in Expansionsmedium ausplattiert. Primäre Schwann Zellen differenzieren im Gegensatz zu primären Oligodendrozyten nicht spontan in Monokulturen. Deshalb müssen sie zur Differenzierung speziell behandelt werden. Die Zellen wurden nach Erreichen einer nahezu 100%igen Konfluenz in definiertem Medium kultiviert (nach Jessen et al., 1994), wobei sie das Stadium der proliferierenden Vorläuferzelle verlassen. Die Differenzierung in myelinisierende Schwann Zellen wurde durch zwei unterschiedliche Behandlungen hervor gerufen. Zum einen wird dem definierten Medium 10ng/ml NRG1 TypIII und 1mM dbcAMP und zum anderen 10ng/ml NRG1 TypIII und 10µM Forskolin zugegeben (Arthur-Farraj et al., 2011). Die Differenzierung ist morphologisch an der

verzweigteren Zellstruktur zu erkennen. Außerdem wurde durch immunzytochemische Analysen oder Western Blots auf die Synthese von MBP die Differenzierung in myelinisierende Schwann Zellen gezeigt.

3.6 Herstellung von Gesamtlysaten aus optischen Nerven

Es wurden jeweils 10 1 Tag alte oder 6 10 Tage alte C57BL/6 Mäuse mit Isofluran betäubt und anschließend mittels Dekapitation getötet. Der optische Nerv wurde herauspräpariert, in ein Falcon mit Lysispuffer überführt und mithilfe eines Tissue Ruptors (Qiagen) zerkleinert. Nach 45minütiger Inkubation bei 4°C und unter ständiger Rotation wurden die Zellkerne bei 4°C für 5min und 2000 x g abzentrifugiert.

3.7 Transfektionen

Zur Einbringung von exogenen DNAs bzw. zur Überexpression von kleinen RNAs in Zelllinien bzw. primäre Zellen wurden verschiedene Transfektionen durchgeführt, die im Folgenden genauer beschrieben werden sollen.

3.7.1 Transiente Transfektion von Oli-*neu* und HEK293T Zellen

Zur transienten Transfektion von verschiedenen Expressions-Plasmiden in Oli-*neu* bzw. HEK293T Zellen wurde das Transfektionsreagenz Fugene HD (Promega) verwendet. Fugene HD ist ein nicht-liposomales Transfektionsreagenz, welches für die Transfektion der meisten Zelllinien verwendet werden kann. Die Transfektionen zur Vorbereitung der Immunpräzipitationsexperimenten (siehe 3.10.2) wurden $5 \cdot 10^5$ bis $7,5 \cdot 10^5$ Zellen pro 10cm Zellkulturschale ausplattiert und 6 Stunden später transfiziert. Der Transfektionsansatz wird je Transfektion in 500µl DMEM gebildet. Hierzu werden 10µg des Plasmids in DMEM mit 15µl Fugene HD gemischt, gevortext, abzentrifugiert und nach 15 minütiger Inkubation bei RT in die Kulturschale getropft. Werden mehrere Plasmide cotransfiziert, wird weniger des jeweiligen Plasmids verwendet, sodass eine Gesamt-DNA-Menge von 10µg erhalten bleibt.

3.7.2 Herstellung einer stabil exprimierenden hnRNP A2b-FLAG Oli-*neu* Zelllinie

Es wurden $7,5 \cdot 10^5$ Oli-*neu* Zellen in 10cm Kulturschalen mit 2,5µg hnRNP A2b-FLAG und 2,5µg PMSVhygro in 500µl DMEM und 10µl Fugene HD transfiziert (Prozedur siehe 3.7.1). Vor der Transfektion wurden die Plasmide über eine Restriktion linearisiert, wodurch der Einbau in das Genom vereinfacht werden soll (Stuchbury and Münch, 2010). PMSVhygro ist ein Hygromycinresistenz-Plasmid. Zellen, welche dieses Plasmid aufnehmen, sind anschließend resistent gegen das Antibiotikum Hygromycin. Die doppelt transfizierten Zellen wurden nach 48 Stunden mit Trypsin/EDTA von der Kulturschale abgelöst und in unterschiedlichen Konzentrationen ($5 \cdot 10^4$, $1,5 \cdot 10^5$, $3 \cdot 10^5$) in 10cm Schalen ausplattiert. Parallel dazu wurden untransfizierten Oli-*neu* Zellen in gleichen Konzentrationen ausplattiert. Die Zellen wurden mit 300µg/ml Hygromycin B (Sigma) alle zwei Tage behandelt. Nach vier Behandlungen waren alle Zellen in den untransfizierten Schalen durch das Hygromycin abgestorben und in den transfizierten Zellen blieben einzelne Zellkolonien

übrig. Diese Kolonien wurden von der Schale gelöst und je Kolonie in ein 96well überführt. Nach 9 Tagen wurden die Zellen im 96well gelöst und in ein 24well überführt und dann nach 10 Tagen aus dem 24well in ein 12well überführt. Aus dem 12well wurden nach drei Tagen die Zellen in ein 6well überführt und daraus nach 4 Tagen in eine 10cm Schale. Aus der 10cm Schale konnten die hnRNP A2b FLAG stabilen Zellen dann expandiert werden. Die Expression der FLAG-getagten hnRNP A2b Plasmide wurde über Immunzytochemische Färbungen nachgewiesen.

3.7.3 Transiente Transfektion von kleinen RNAs

Zur Überexpression der sncRNA715 in primäre Schwann Zellen oder Oli-*neu* Zellen wurden die Zellen mit der synthetischen Sequenz der reifen sncRNA715 (715-mimic) transfiziert. Außerdem wurde als Kontrolle parallel eine Kontroll-siRNA (AllStar negative control, Qiagen) transfiziert. Die Transfektion wird mit Lipofectamin RNAiMAX (Life technologies) durchgeführt. Es werden je 1µl RNAiMAX in 50µl DMEM gelöst, 5min bei RT inkubiert, mit 80pmol der kleinen RNA in 50µl DMEM gemischt, noch einmal 15min inkubiert und anschließend auf die Zellen gegeben.

3.8 RNA Analyse

3.8.1 RNA-Extraktion aus kultivierten Zellen

Die zu untersuchenden RNAs wurden aus Oli-*neu*-Zellen, primären Oligodendrozyten, IMS32 Zellen sowie primären Schwann Zellen extrahiert. Zur Extraktion der Gesamt-mRNA wurde das RNeasy-Mini-Kit und zur Extraktion von kleinen RNAs inklusive mRNAs wurde das miRNeasy-Kit (beide Qiagen) nach Herstellangaben verwendet. Während der Extraktion wurde zusätzlich ein DNase-Verdau (RNase free DNase Set, Qiagen) durchgeführt um mögliche Verunreinigungen durch genomische DNA zu vermeiden. Es wurde in 30-50µl depcH₂O eluiert.

3.8.2 cDNA-Synthese

Die extrahierte mRNA wurde mithilfe des Transkriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche Applied Science) in cDNA umgeschrieben. Hierzu wurden Random Hexameric Primer verwendet. Der Ansatz wurde nach Herstellerangaben erstellt.

Zur spezifischen Reversen Transkription von kleinen RNAs wurde das TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit mit spezifischen *Stem-loop*-RT-Primern für sncRNA715 und snoRNA135 (Applied Biosystems) nach Herstellerangaben verwendet.



Abbildung 20: Schema der Reversen Transkription von kleinen RNAs

Kleine RNAs werden mithilfe des TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit reverse transkribiert. Hierzu werden spezifische Stemloop Primer für entweder sncRNA715 oder snoRNA135 verwendet (Biosystems, 2011).

Durch die Verwendung von Looped RT Primer entsteht ein längeres PCR-Fragment als die Größe der reifen sncRNA (siehe Abbildung 20). Durch die Verwendung dieses Loop-Primers, kann außerdem ausgeschlossen werden, dass das Vorläufermolekül der sncRNA detektiert wird.

3.8.3 Quantitative Realtime-PCR

3.8.3.1 Analyse der Ago-Isoformen mittels SYBR-Green Assays

Zur Analyse der mRNAs der vier Ago-Isoformen wurde das QuantiTect SYBR Green PCR Kit (Qiagen) mit spezifischen Primer-Assays nach Herstellerangaben verwendet (siehe Tabelle 9), wobei β Aktin als Referenzgen analysiert wurde. Die Relativen Expressionsverhältnisse der einzelnen Isoformen zueinander bzw. während der Differenzierung von Oligodendrozyten wurden mittels der REST-Software und der $\Delta\Delta$ Ct-Methode ausgewertet (siehe 3.8.3.4).

3.8.3.2 Analyse von *Mbp* und *G6PDH* mRNA mittels TaqMan basierter qPCR

Die Analyse der *Mbp* und *G6pdh* mRNA Expression in *Oli-neu* Zellen, IMS32 Zellen sowie differenzierten und undifferenzierten Schwann Zellen wurde mithilfe des TaqMan Universal Master Mix (Roche Applied Science) und spezifischen Primern sowie einer UPL (*Universal Probe Library*)-Sonde (siehe Tabelle 10) durchgeführt. Anschließend wurde das PCR-Produkt über ein 4%iges Agarosegel visualisiert.

3.8.3.3 Analyse der sncRNA715 Expression mittels TaqMan basierter qPCR

Die quantitative Realtime PCR von spezifischen sncRNAs wurde mithilfe des TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kits (Applied Biosystems) durchgeführt.

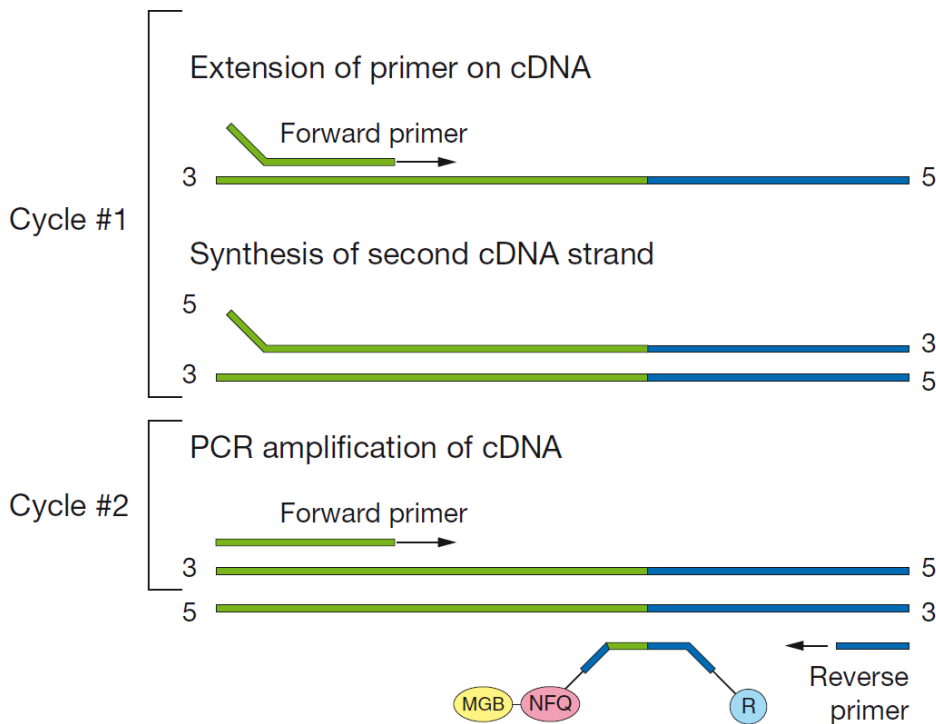


Abbildung 21: Realtime-PCR von sncRNAs

Die qPCR der kleinen RNAs wird mit spezifischen Primern durchgeführt, wobei der forward Primer innerhalb der Stemloop Sequenz und der reverse Primer innerhalb der Sequenz der kleinen RNA bindet. Die dazugehörige Sonde bindet am Übergang zwischen der Stemloop und RNA-Sequenz. Die Sonde ist an einen reporter dye (FAM™ dye, R), einen nicht-fluoreszierenden Quencher (NFQ) und einen *Minor groove binder* (MGB) assoziiert (Biosystems, 2011).

Wie in Abschnitt 3.8.2 beschrieben, entstehen während der Reversen Transkription der kleinen RNAs Abschnitte, welche einen Loop-Überhang besitzen (siehe Abbildung 21, in grün die Sequenz der sncRNA und in blau die Sequenz des Überhangs). Während der Reaktion bindet der *forward*-Primer innerhalb der Sequenz der sncRNA und der *reverse*-Primer innerhalb der Sequenz des Überhangs. Außerdem bindet eine Sonde zwischen den Bindestellen der Primer. An die Sonde ist zum einen ein fluoreszierender Reporter-Farbstoff und zum anderen ein Quencher (*Non-fluorescent Quencher*, NFQ) assoziiert. Außerdem ist ein sogenannter *minor groove binder* (MGB) verbunden, welcher die Schmelztemperatur erhöht ohne die Sonde zu verlängert, wodurch die Sondenlänge gering gehalten werden kann. Ist die Sonde intakt, wird die Fluoreszenz durch den Quencher unterdrückt.

Während der Polymerisation der Stränge, wird die Sonde hydrolysiert und der Quencher entfernt sich von dem fluoreszierenden Reporter, woraufhin die Fluoreszenz detektiert werden kann.

Die Relative Quantifizierung wurde mithilfe der REST-Software und der $\Delta\Delta C_t$ -Methode ausgewertet (siehe 3.8.3.4)

3.8.3.4 Relative Quantifizierung nach der $\Delta\Delta C_t$ -Methode

Mithilfe der relativen Quantifizierung können Expressionsunterschiede zwischen verschiedenen Genen, bezogen auf ein Referenzgen dargestellt werden. Zur Analyse werden die Crossingpoints (Ct), welche als Ergebnis der Realtime-PCR entstehen, verwendet.

Der Crossingpoint wird als PCR-Zyklus definiert, in welchem sich das Fluoreszenz-Signal erstmals deutlich von dem Hintergrundsignal unterscheidet. Nimmt man eine perfekte PCR an, in welcher sich in jedem Zyklus die DNA-Menge verdoppelt, so entspricht ein Ct-Wert, der um eine Einheit geringer ist, einer doppelten DNA-Menge. Die Unterschiede in der Genexpression können mithilfe der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode und der REST-Software ausgewertet werden (Pfaffl et al., 2002). Folgende Formel liegt der Auswertung zugrunde:

$$\begin{aligned}\Delta\text{Ct} &= \text{Ct}_{\text{Zielgen}} - \text{Ct}_{\text{Referenzgen}} \\ \Delta\Delta\text{Ct} &= \Delta\text{Ct}_{\text{Behandlung}} - \Delta\text{Ct}_{\text{Kontrolle}} \\ \text{Ratio} &= 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}\end{aligned}$$

Zur Berechnung wird im ersten Schritt der Ct-Wert des Referenzgens vom Ct-Wert des Zielgens abgezogen. Dabei entsteht der ΔCt . Der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wert entsteht, indem von dem ΔCt der Behandlung der ΔCt der Kontrolle abgezogen wird. Die Ration ($2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$) beschreibt den relativen Expressionsunterschied des Zielgens in der behandelten Probe im Vergleich zur Kontrolle jeweils normalisiert auf das Referenzgen. In den folgenden Experimenten wurde als Referenzgen zum einen β Aktin und zum anderen snoRNA135 verwendet.

Die relative Expression kann zur besseren Visualisierung in einem Graphen als Logarithmus zur Basis 2 (\log_2) dargestellt werden. Als reguliert gilt ein Zielgen, wenn der \log_2 -Wert unter -0,5 oder über 0,5 liegt.

3.8.3.5 Absolute Quantifizierung der sncRNA715

Mithilfe der absoluten Quantifizierung können absolute Expressionsunterschiede von Genen analysiert werden. Es sollten Unterschiede der gebundenen sncRNA715 innerhalb der FLAG-IP von FLAG/HA-Ago2 Proteinen untersucht werden (siehe 3.10.2.1 und 3.10.2.1.1). Hierzu musste eine Standardkurve der sncRNA715 hergestellt werden. Es wurden verschiedene Verdünnungen der synthetischen sncRNA715 (715-mimic) hergestellt (von 10 bis $3 \cdot 10^{13}$ Molekülen) und aus diesen wurde eine Standardkurve der Crossingpoints hergestellt, sodass der gemessene Ct-Wert der sncRNA715 aus der FLAG-IP einer spezifischen Konzentration zugeordnet werden konnte. Diese wurden jeweils für die unterschiedlichen Bedingungen (GFP, FynWT, Fyn+) berechnet und anschließend wurden die Werte von FynWT und Fyn+ auf GFP bezogen, wobei GFP auf 1 gesetzt wurde. Als K-IP wird die Inkubation von Lysispuffer auf den beads mit anschließender Inkubation der 715-mimic bezeichnet, wodurch die unspezifische Bindung der synthetischen sncRNA715 an die beads ausgeschlossen werden soll.

3.8.4 Northern Blot

Die RNA aus IMS32 Zellen sowie aus primären Schwann Zellen wurde mittels Northern Blot auf die Expression der sncRNA715 untersucht. Die RNA wurde mit 2x TBE-Urea Probenpuffer (Life technologies) versetzt, 5min bei 70°C inkubiert, auf Eis abgekühlt und auf ein 15% TBE-Urea Gel (Life technologies) geladen. Als Marker wurde der Biotin-gelabelte Ready-to-load mikroRNA Marker (NEB) verwendet. Dieser wurde 1min auf 95°C inkubiert und auf Eis abgekühlt. Als positiv-Kontrolle für die sncRNA715 wurden 15fmol der synthetischen 715-mimic auf das Gel geladen. Das TBE-Urea Gel

wurde bei 180Volt für 1 Stunde in 1xTBE (aus 10xTBE, Life technologies) laufen gelassen. Anschließend wurde das Gel 5min in 1xTBE gewaschen und das Blotting-Sandwich wurde zusammen gebaut. Hierbei wird die RNA auf eine positiv-geladene Nylonmembran übertragen. Der Blot wurde bei 15Volt 35min durchgeführt und anschließend wurde die Membran mit einem Hybrilinker gecrosslinkt (Autocrosslink, 1200kJ-0kJ) um die RNA auf der Membran zu fixieren. Die Membran wurde bei 37°C in einem Hybridisierungssofen für 30min in Hybridisierungspuffer (Ambion) präinkubiert. Zur Detektion der sncRNA715 wurde eine doppelt-DIG-gelabelte LNA-Sonde verwendet und zu Detektion der snRNA U6 eine 3' DIG-gelabelte LNA-Sonde. Die LNAs wurden bei 95°C 1min inkubiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Es wurden 2nM Sonde eingesetzt. Zur Detektion des Markers wurde eine Biotin-gelabelte Sonde zusätzlich zugefügt. Die Hybridisierung erfolgte bei 37°C über Nacht. Am nächsten Tag wurde die Membran zweimal mit 2XSSC bei 37°C gewaschen und anschließend 1 Stunde in Blockingpuffer bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Membran mit anti-DIG-AP (1:5000, Roche Applied Science) und anti-Biotin-AP (1:5000, Cell Signaling) in Blockingpuffer für 2 Stunden bei RT inkubiert. Die Membran wurde 3 mal 10min in Tween-Puffer und einmal 3min in AP-Puffer gewaschen. Letztendlich wurde das Signal mithilfe der CDP-Star Lösung (Roche Applied Science) und dem ChemiDoc (Biorad) detektiert.

3.9 DNA-Analysen

3.9.1 Nachweis der Ago-Isoformen in oligodendroglialen Zellen mittels Endpunkt-PCR

Es wurde aus *Oli-neu* Zellen respektive OPCs Gesamt-RNA extrahiert und in cDNA umgeschrieben (siehe 3.8.1 und 3.8.2.). Diese wurden anschließend mit Isoform-spezifischen Primern auf die Expression der vier Argonaut-Isoformen getestet. Die verwendeten Primer und entstehenden Amplikonlängen sind in Tabelle 7 aufgeführt. Die PCR-Reaktion wurde mithilfe der Pfu-DNA-Polymerase (Promega) in einem Thermocycler (Eppendorf) durchgeführt.

3.9.2 Auswertung der PCR-Reaktionen durch Agarosegelelektrophorese

Die Analyse der Expression der Ago-Isoformen in oligodendroglialen Zellen wurde mithilfe der Agarosegelelektrophorese ausgewertet. Die entstandenen PCR-Produkte sowie ein 100bp Größen-Standard (Promega) wurden auf ein 1%iges, Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel geladen und bei 100Volt eine Stunde laufen gelassen. Die Auswertung erfolgte mit dem ChemiDoc XRS+ (Biorad).

Die entstandenen Fragmente der qPCR-Reaktionen auf *Mbp* und *G6pdh* mRNA bzw. sncRNA715 und snoRNA135 wurden mithilfe eines 4%igen, Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel ausgewertet. Als Größenstandard wurde ein 10bp Marker (Promega) verwendet.

3.9.3 Zielgerichtete Mutagenese

Zur Herstellen von Phosphorylierungs-inaktiven Mutanten für zwei Tyrosine innerhalb der Ago2-Sequenz wurde die Methode der zielgerichteten Mutagenese verwendet. Es wurde dafür das *QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis* Kit (Stratagene) nach Benutzeranweisung verwendet. Es wurden spezifische Primer erstellt (Sequenzen der Primer siehe Tabelle 12), welche

jeweils zwei Punktmutationen in das FLAG/HA-Ago2 Konstrukt innerhalb der kodierenden Sequenz für Ago2 einbringen. Für die erste Phosphorylierungsmutante wurden die Primer Ago2 Y393F BamHI_sense und Ago2 Y393F BamHI_antisense verwendet, welche zum einen einen Basenaustausch hervorrufen, welcher dazu führt, dass in der Aminosäuresequenz an der Stelle 393 statt eines Tyrosins ein Phenylalanin synthetisiert wird und zum anderen eine stille Mutation an einer anderen Stelle bewirkt, wodurch eine zusätzliche Restriktionsschnittstelle für das Enzym BamHI entsteht. Die zweite Phosphorylierungsmutante wurde mit den Primern Ago2 Y529F MluI_sense und Ago2 Y529F MluI_antisense hergestellt (siehe Tabelle 12). Dadurch wird das Tyrosin an der Position 529 durch ein Phenylalanin ersetzt und eine neue Restriktionsschnittstelle für das Restriktionsenzym MluI eingefügt. Die Doppel-Phosphorylierungsmutante von FLAG/HA-Ago2 (FLAG/HA-Ago2Y393F/Y529F) entstand, indem die Mutagenese auf die FLAG/HA-Ago2Y529F-Mutante mit den Primern für die Mutation an der Position 393 wiederholt wurde. Die Amplifikationsreaktion erfolgte auf das Wildtyp FLAG/HA-Ago2 Plasmid. Nach der Amplifikation wurde der methylierte Ausgangsvektor mit DpnI verdaut und die mutierte DNA wurde in superkompetente XL10-Gold Bakterien transformiert, auf Agarplatten mit 75µg/ml Ampicillin ausgestrichen und bei 37°C über Nacht inkubiert.

3.9.4 Herstellung der Myc/His-getagten Ago2-Konstrukte

Es wurden zur Herstellung von Myc/His-getagten Ago2-Konstrukten die codierenden Sequenzen von Wildtyp Ago2 und der Doppel-Phosphorylierungsmutante Ago2Y393F/Y529F per PCR aus den FLAG/HA-Ago2 bzw. FLAG/HA-Ago2Y393F/Y529F Konstrukten amplifiziert. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 8 aufgelistet. Es wurden die Restriktionsschnittstellen für HindIII und XbaI durch die PCR-Reaktion an die Inserts angefügt. Als Ausgangsvektor wurde das hnRNP A2-Myc/His Plasmid mit HindIII und XbaI restringiert und die verdauten Inserts wurden über eine Ligation mit T4-DNA Ligase (Promega) in den Vektor ligiert. Anschließend wurde das ligierte Plasmid in DH5α E.coli Bakterien transformiert, auf Agarplatten mit 75µg/ml Ampicillin ausgestrichen und bei 37°C über Nacht inkubiert.

3.9.5 Plasmidpräparation (Mini-/ Maxi-Präparation)

Es wurden transformierte Bakterien über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die entstandenen Bakterienkolonien gepickt und in 4ml LB-Medium mit Ampicillin aufgenommen. Diese wurden wiederum über Nacht bei 37°C in einem Schüttler inkubiert. Die Plasmidpräparation wurde mit dem PureYield™ Plasmid Miniprep Kit (Promega) durchgeführt und zur Analyse der Plasmide wurde ein analytischer Restriktionsverdau durchgeführt. Aus einer positiven Mini-Kultur wurde dann wieder über Nacht eine Maxi-Kultur in 150ml LB-Medium mit Ampicillin angesetzt. Aus dieser wurde am nächsten Tag ein Glycerinstock mit 10% Glycerin hergestellt und bei -80°C aufbewahrt. Die Plasmidpräparation erfolgte mit dem PureLink HiPure Plasmid Filter Maxiprep Kit und es wurde anschließend ein analytischer Restriktionsverdau durchgeführt und die Plasmide wurden bei der Firma Genterprise bzw. StarSeq sequenziert.

3.10 Proteinbiochemie

3.10.1 Herstellung von Zelllysaten

Die Zellen wurden aus den Kulturschalen je nach dem nachfolgenden Experiment in Lysispuffer 1 (+Triton, +150mM NaCl) oder in Lysispuffer 2 (+Triton, -EDTA, +300mM NaCl, 150mM Imidazol) abgeschabt und aufgenommen. Das Volumen ergibt sich aus der jeweiligen Kulturschalengröße und der Dichte der Zellen. Das Gesamt-Zelllysate wurde in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und 45 Minuten bei 4°C unter ständiger Rotation inkubiert. Anschließend wurden bei 2000 x g für 5 Minuten und 4°C die Zellkerne sowie Zelltrümmer abzentrifugiert und das postnukleäre Lysat in ein neues Reaktionsgefäß überführt und für nachfolgende Experimente eingesetzt.

3.10.2 Aufreinigung von Proteinkomplexen mithilfe von Immunpräzipitationen

Um Interaktionen von unterschiedlichen Proteinen nachweisen zu können, kann die Methode der Immunpräzipitation (IP) heran gezogen werden. Hierbei werden endogene oder getagte Proteine zum einen über die Bindung an Antikörper gekoppelte Kügelchen (Beads) oder zum anderen durch Chelatkomplex-Bildung mit ummantelten Beads aus einem Zelllysate aufgereinigt. Die im Folgenden verwendeten Beads stellen magnetische Beads dar, welche durch diese Eigenschaft leicht an einem Magneten zu isolieren sind. Es wurden im Rahmen der Arbeit unterschiedliche Immunpräzipitationen durchgeführt, welche im Folgenden genauer beschrieben werden.

3.10.2.1 Immunpräzipitation von FLAG-getagten Proteinen

Oli-*neu* bzw. HEK293T Zellen wurden mit FLAG-getagtem Ago2-Plasmid bzw. mutierten FLAG/HA-Ago2 Plasmiden transfiziert. Außerdem wurden in manchen Experimenten unterschiedliche Fyn-Konstrukte (Fyn-, FynWT, Fyn+) cotransfiziert und die Fyn-abhängige Phosphorylierung untersucht. Außerdem sollte in der hnRNP A2b-FLAG stabilen Zelllinie die Interaktion zwischen Ago2 und A2 untersucht werden.

Hierzu wurden die FLAG-getagten Proteine spezifisch über an FLAG-Antikörper gekoppelte magnetische Beads (Anti-FLAG M2 Magnetic Beads, Sigma) aufgereinigt. Es wurden 50µl FLAG-beads pro Ansatz 2x mit 700µl 1xPBS gewaschen. Anschließend wurden 700µl-1000µl Zelllysate zu den gewaschenen Beads gegeben und zwei Stunden unter ständiger Rotation bei 4°C inkubiert. Der erste Überstand wurde als „Ungebunden“ abgenommen und aufbewahrt und der Bead-Komplex mit gebundenem Protein drei Mal mit 700µl Lysispuffer 1 gewaschen. Die Elution wurde mithilfe des FLAG-Peptids durchgeführt. Hierzu wurden 30µl einer 450µg/ml FLAG-Peptid Lösung in PBS+Inhibitoren zu den Beads gegeben und in einem Eppendorf-Thermoschüttler 90 Minuten bei RT und 1000rpm inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen mit 50mM Dithiothreitol (DTT) und LDS-Ladepuffer versetzt, 10 Minuten bei 70°C inkubiert und anschließend über SDS-PAGE und Western Blots analysiert.

3.10.2.1.1 Extraktion der gebundenen RNAs aus FLAG-IPs

Die FLAG-IP wurde wie in 3.10.2.1 beschrieben durchgeführt. Der Überstand nach Elution mit FLAG-Peptid wurde 1:1 aufgeteilt und eine Hälfte wurde zur Proteinanalyse über SDS-Page und Western

Blot und die andere zur RNA-Analyse mittels qPCR weiter verwendet. Hierzu wurde der eine Teil des Eluates in 700µl Qiazol aufgenommen und mittels RNA-Extraktion, reverser Transkription und qPCR bzw. RT-PCR weiter verarbeitet (siehe 3.8).

3.10.2.2 Immunpräzipitation von Myc/His-getagten Proteinen

Ago2-Plasmide und Phosphomutanten von Ago2, welche ein Myc/His-Tag exprimieren, wurden in HEK293T Zellen zusätzlich zu FynWT Plasmiden überexprimiert. Es sollte die Fyn-abhängige Phosphorylierung der Ago2-Proteine untersucht werden. Hierzu wurden spezifisch die His-getagten Proteine aufgereinigt und analysiert. Ein His-Tag enthält sechs Histidine hintereinander. Dieser Polyhistidin-Tag bindet mit hoher Affinität an zweiwertige Nickel- oder Kobalt-Ionen und bildet einen Chelatkomplex. Zur Aufreinigung der His-getagten Proteine wurden Dynabeads His-Tag Isolation and Pulldown magnetische Beads (Life Technologies) verwendet. Diese Beads sind mit Kobalt beschichtet wodurch sie His-getagte Proteine binden. Pro Ansatz wurden 50µl Beads zwei Mal mit Waschpuffer 1 (-Triton, -EDTA, +300mM NaCl, 150mM Imidazol) gewaschen. Den Beads wurde 500µl Lysat und 500µl Waschpuffer 1 zugegeben und 30 Minuten bei RT unter ständiger Rotation inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Beads dreimal 10min bei RT unter Rotation mit 700µl Waschpuffer 2 (-Triton, -EDTA, +300mM NaCl, 500mM Imidazol) gewaschen. Der letzte Waschschritt wurde mit Waschpuffer 2 für 30 Minuten bei RT und 1000rpm im Eppendorf Thermoschüttler durchgeführt. Der Überstand wurde abgenommen mit 50mM Dithiotreitol (DTT) und LDS-Ladepuffer versetzt, 10 Minuten bei 70°C inkubiert und aufbewahrt. Den Beads wurde 50µl 2xLDS zugegeben und sie wurden 10 Minuten bei 70°C inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen mit 50mM Dithiotreitol (DTT), 10 Minuten bei 70°C inkubiert und anschließend über SDS-PAGE und Western Blot analysiert.

3.10.2.3 Immunpräzipitation von endogenem hnRNP A2

Oli-*neu* Zellen aus einer 80%ig konfluenten 10cm Kulturschale wurden mit 750µl Lysispuffer 1 lysiert (siehe 3.10.1). Für die Immunpräzipitation von endogenem hnRNP A2 wurden Dynabeads Protein G (Life technologies) verwendet. Es wurden 50µl Beads pro Ansatz zweimal mit 500µl W&B Puffer gewaschen, anschließend wurden 22,5µg hnRNP A2 Antikörper (EF67, W. Rigby, Hannover) in 200µl W&B Puffer zu den Beads gegeben und 2 Stunden unter ständiger Rotation bei 4°C inkubiert. Parallel wurden als negativ Kontrolle (Bead Kontrolle) 50µl Dynabeads mit 200µl W&B Puffer ohne Antikörper inkubiert. Der Antikörper-Bead-Komplex wurde zweimal mit 1xPBS gewaschen. Es wurden 700µl des Zelllysates zu diesem Komplex gegeben und über Nacht bei 4°C rotierend inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Komplex fünf Mal mit 1x PBS gewaschen und danach in 1xLDS bei 70°C für 10 Minuten eluiert. Der Überstand enthält das Eluat, welchem 50mM DTT zugegeben wurden. Dieses wurde noch einmal kurz auf 70°C erhitzt und mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert.

3.10.3 SDS-PAGE und Western Blot

Zur Analyse von Proteinen innerhalb eines Zelllysates bzw. zur Auswertung der Immunpräzipitationen wurde die Methode der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) verwendet. Die Polyacrylamid-Gele wurden zum einen mithilfe des Mini-PROTEAN Tetra Cell-Systems

(Biorad) hergestellt oder zum anderen wurden fertige NuPAGE-Gele (Life Technologies) verwendet. Die Proteine wurden zusammen mit einem Größenstandard (Precision Plus Protein™ Dual Color, Biorad) auf das geladen und bei 175Volt 60 bis 75 Minuten aufgetrennt.

Die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden mittels Wet-Blot-Methode auf eine PVDF-Membran (Roth) transferiert. Auch hierbei wurde das Mini-PROTEAN Tetra Cell-Systems (Biorad) verwendet. Der Blot wurde nach Herstellerangaben zusammen gestellt und bei 120Volt für 90 Minuten laufen gelassen. Anschließend wurde die Membran bei RT in Blockierungs-Lösung (4% Milch in TBST) für 30 Minuten blockiert um unspezifische Interaktionen der nachfolgenden Antikörper auf der Membran zu verhindern. Nach der Blockierung wurde der Primärantikörper, welches das Ziel-Protein detektiert, in Blockierungslösung in definierter Konzentration 1 Stunde bei RT bis über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Membran wurde anschließend dreimal mit TBST für jeweils 10 Minuten gewaschen und der an HRP (*horse radish peroxidase*)-gekoppelte Sekundärantikörper wurde 1:10.000 in Blockierungs-Lösung für 30 Minuten bei RT zugegeben. Danach wurde die Membran zweimal in TBST und einmal in TBS gewaschen. Letztendlich kann das gewünschte Protein mithilfe der ECL-Lösung (Immobilion™ Western Chemiluminescent HRP Substrate, Merck Millipore) im ChemiDoc Imager (Biorad) detektiert werden. Die densitometrische Auswertung erfolgte mit dem Programm ImageLab (Biorad) und Microsoft Excel.

3.10.4 Immunzytochemie

Zur Lokalisation von Proteinen innerhalb der Zellen wurden immunzytochemische Färbungen auf fixierte Zellen durchgeführt. Oli-*neu*, primäre Oligodendrozyten (pOL) und primäre Schwann Zellen (pSC) wurden auf mit 5N HCl entfetteten Glasdeckgläsern in definierter Dichte kultiviert und mit 4% Paraformaldehyd für 15 Minuten bei RT fixiert. Anschließend wurden die Zellen mit 0,1% Triton X100 in PBS permeabilisiert und für 15 Minuten bei RT in DMEM+10%HS (Oli-*neu*, pOL) bzw. DMEM+10%FCS (pSC) blockiert. Die Primärantikörper-Inkubation erfolgte in angegebener Konzentration (siehe 3.3.1) entweder eine Stunde bei RT oder bei 4°C über Nacht. Die Deckgläser wurden anschließend dreimal fünf Minuten bei RT mit 1xPBS gewaschen und mit Sekundärantikörper (siehe 3.3.2) für 30 Minuten bei RT inkubiert. Es wurde zweimal mit 1xPBS gewaschen und fünf Minuten bei RT mit DAPI (1:1000) in DMEM+10%HS bzw. DMEM+10%FCS gefärbt. Zuletzt wurde zweimal mit 1xPBS gewaschen und in Mowiol eingedeckt.

Die immunzytochemische Färbungen wurden entweder mit einem 40x Objektiv (UPlanFLN; NA= 0,75) oder einem 60x Ölobjektiv (UPlanSApo; NA= 1,35) eines IX81 Mikroskops angeschlossen an eine Fluoreszenz CCD-Kamera XM10 oder einem TCS SP5 Konfokal Mikroskop (Leica) mit einem HCX PL APO CS 63x/1.4 Öl-UV-Objektiv angeschlossen an einen fast resonance scanner aufgenommen. Die Bilder wurden mit der Cell^{AF} Software (Olympus) respektive der LAS AF Software Version 2.6.3 (Leica Microsystems) und Adobe Photoshop CS4 sowie ImageJ bearbeitet.

3.10.4.1 Quantifizierung von Colokalisation in Cofärbungen

Das Ausmaß von colokalisierenden Proteinen innerhalb einer Cofärbung kann mithilfe des Mander's Korrelations-Koeffizienten (*Mander's correlation coefficient*, MCC), Pearson's Korrelations-Koeffizienten (*Pearson's correlation coefficient*, PCC) und dem Coste's Test mithilfe der Software

ImageJ mit dem JACoP Plugin quantifiziert werden (Manders et al., 1993; Bolte and Cordelieres, 2006; Abramoff et al., 2004). Es wurden Bereiche innerhalb der Zellperipherie (in der Regel Ausschnitt der Myelinmembranen) ausgewählt und ausgeschnitten. Die Berechnung der Mander's Koeffizienten ergibt zwei Werte, M1 und M2, wobei M1 den Anteil des roten Kanals (Ago2) in Regionen des grünen Kanals (hnRNP A2 bzw. Fyn) und M2 den Anteil des grünen Kanals in den Regionen des roten Kanals berechnet. Es wurde der M2-Koeffizient zur Auswertung verwendet um die Colokalisation von hnRNP A2 bzw. Fyn mit Ago2 relativ zu Gesamt-Ago2 zu zeigen. Es wurden jeweils 6 voneinander unabhängige Experimente durchgeführt und daraus der Mittelwert der M2-Koeffizienten berechnet. Der MCC sowie der PCC reichen von 0 bis 1, wobei 0 keiner Colokalisation und 1 einer 100%igen Colokalisation entsprechen. Der Coste's Test ergibt drei Werte, den $r(\text{original})$, welcher dem PCC entsprechen sollte, der $r(\text{randomized})$, dieser sollte bei einer realen Colokalisation etwa bei null liegen und der P-Wert (*P-value*), wobei ein Wert größer als 95% die Signifianz der Colokalisation beweist.

4 Ergebnisse

4.1 Expression und Regulation von Argonaut-Proteinen in Oligodendrozyten

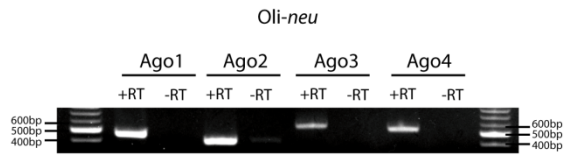
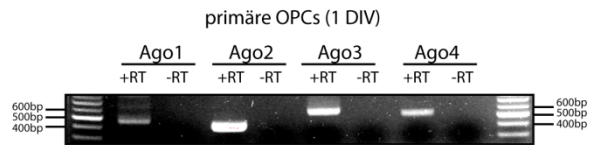
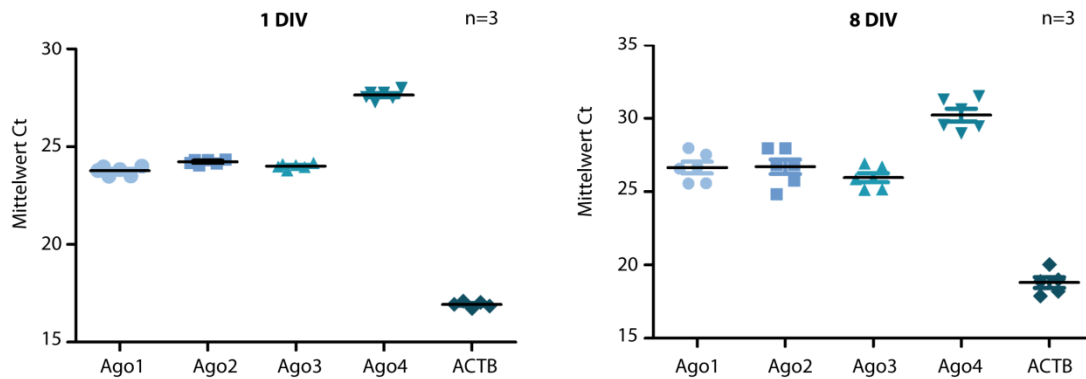
4.1.1 Argonaut Expression in Oligodendrozyten

Argonaut-Proteine bilden zusammen mit kleinen nicht-kodierenden RNAs den *miRNA-induced silencing complex* (miRISC), welcher an der translationalen Regulation von mRNAs beteiligt ist (Meister, 2013). Es ist bekannt, dass die Entwicklung von Oligodendrozyten von der Expression und Funktion verschiedenster sncRNAs abhängt (Dugas and Notterpek, 2011). Allerdings bleibt bisher ungeklärt, ob diese translationale Regulation in Oligodendrozyten über die Assoziation der sncRNA715 mit dem miRISC stattfindet. Es konnte in früheren Studien die Expression von Ago2 in Oligodendrozyten nachgewiesen werden. Außerdem scheint die Bildung des miRISC im Tiermodell zur Multiplen Sklerose gestört zu sein (Lewkowicz et al., 2015). Die Expression der anderen Argonaut-Proteine wurde in Oligodendrozyten bisher nicht untersucht.

In den folgenden Abschnitten werden die Ergebnisse zu Expressions-Analysen der vier in Vertebraten bekannten Ago-Proteine sowie die Regulation des Argonaut-Proteins Ago2 und die mögliche Beteiligung während der Regulation der Synthese des Myelin Basischen Proteins in oligodendroglialen Zellen beschrieben.

4.1.1.1 Expression der mRNAs von *Ago1, 2, 3* und *4* in *Oli-neu* und OPCs

Es wurde die gesamte mRNA aus *Oli-neu* Zellen bzw. primären Oligodendrozyten (1DIV und 8DIV) extrahiert und in cDNA umgeschrieben. Anschließend wurden Endpunkt-PCRs bzw. qPCRs durchgeführt, um die mRNA-Expression zu untersuchen. In der Endpunkt-PCR wurden Primer-Paare verwendet, welche absolut spezifisch nur eine der vier Argonaut-mRNAs amplifizieren (die PCR auf *Oli-neu* cDNA wurde von Irina Eppstein durchgeführt). Als Kontroll-Reaktion wurde jeweils ein Ansatz erstellt, welcher keine Reverse Transkriptase enthält (-RT). Durch diese Kontrolle kann die Detektion genomischer DNA ausgeschlossen werden (Abbildung 22A und B). Für die qPCR-Reaktionen wurden spezifische SYBR-Green basierte Primer-Assays für die vier Argonaut-mRNAs und β Aktin (ACTB), als endogene Kontrolle, verwendet (Qiagen).

A Endpunkt PCR Oli-*neu* Zellen**B** Endpunkt PCR primäre Oligodendrozyten-Vorläuferzellen**C** qPCR primäre Oligodendrozyten**Abbildung 22: Expression der Argonaut-mRNAs in Oligodendrozyten**

A+B: Endpunkt-PCR auf Gesamtzell-RNA aus Oli-*neu* Zellen (A) und OPCs (B, 1DIV) mit spezifischen Primern für die Amplifikation der vier Argonaut-mRNAs. Die amplifizierten DNA-Fragment besitzen folgende Größen: Ago1 427bp, Ago2 427bp, Ago3 580bp und Ago4 544bp. -RT entspricht der Kontrollreaktion ohne Reverse Transkriptase, um die Amplifikation von kontaminierender genomischer DNA zu erkennen.

C: Quantitative Realtime-PCR auf primäre Oligodendrozyten nach 1DIV (links) und 8DIV (rechts). Es wurden jeweils spezifische SYBR-Green basierte qPCR-Assays für die einzelnen Ago-mRNAs verwendet. β Aktin (ACTB) wurde als Positivkontrolle und Referenzgen verwendet. Anzahl der Experimente n=3.

Abbildung 22 zeigt das Ergebnis zur Expressionsanalyse der vier Argonaut-mRNAs in oligodendroglialen Zellen. Es konnte durch Endpunkt-PCR qualitativ gezeigt werden, dass oligodendrogliale Zellen die mRNAs der vier unterschiedlichen Argonaut-Proteine exprimieren (Abbildung 22A und B). Allerdings konnten keine quantitativen Unterschiede mithilfe dieser Methode untersucht werden. Hierzu wurden quantitative Realtime-PCR Reaktionen mit spezifischen SYBR-Green basierten qPCR-Assays für die vier Argonaut-mRNAs durchgeführt. Als Resultat der qPCR werden die mittleren Crossingpoints (Ct) der jeweiligen Proben aus drei unabhängigen Experimenten angezeigt, welche äquivalent sind zur Menge der enthaltenen cDNA. Je höher der Ct-Wert, desto geringer ist die Menge an cDNA respektive mRNA innerhalb der Probe. In Abbildung 22C sind die absoluten Crossingpoints (Ct) der qPCR gezeigt. Es ist zu erkennen, dass die mRNAs von Ago1, 2 und 3 relativ gleichmäßig in OPCs (1DIV, Ct für Ago1, 2 und 3 zwischen 23 und 24) sowie in reiferen Oligodendrozyten (8DIV, Ct für Ago1, 2 und 3 zwischen 26 und 28) exprimiert werden. Dem entgegen steht die Expression der mRNA von Ago4 in beiden Differenzierungsstadien, da diese in deutlich geringeren Mengen nachzuweisen ist (1DIV: Ct für Ago4 zwischen 27 und 28; 8DIV: Ct für Ago4 zwischen 29,5 und 31). Die Untersuchung der β Aktin-mRNA gilt als Positivkontrolle. Es ist zu erkennen, dass in beiden Stadien der Ct-Wert zwischen 17 und 20 liegt. Eine Veränderung der

Expressionslevel von β Aktin werden nicht erwartet, da in allen zellulären Stadien Komponenten des Zytoskeletts exprimiert werden und die Expression des Weiteren in der Regel stärker ist, als die anderer mRNAs. Diese Analyse kann allerdings nur einen Hinweis auf die Mengen der jeweiligen mRNAs liefern, da die genaue Effizienz der jeweiligen PCR Reaktionen nicht getestet wurde. Es ist möglich, dass die PCR-Effizienzen der Reaktionen für *Ago1*, *2*, *3* und *4* nicht gleich sind, das heißt dass die Ursprungs-cDNA nicht gleichmäßig amplifiziert wurde und damit scheinbar Expressionsunterschiede detektiert werden, welche allerdings auf die unterschiedliche Effizienz der PCRs zurück zu führen sein könnte. Diese Möglichkeit wird allerdings als weniger wahrscheinlich eingestuft, da die Primer-Assays kommerziell bezogen wurden und demnach vermutlich auf ihre Effizienz getestet wurden. Die absoluten Analysen wurden anschließend genauer ausgewertet, um relative Expressionsunterschiede der Argonaut-mRNAs in den unterschiedlichen Differenzierungsstadien zu untersuchen.

Mithilfe der $\Delta\Delta$ Ct-Methode und REST-Software können relative Expressionsunterschiede zwischen verschiedenen Genen in den beiden Differenzierungsstadien analysiert werden (Pfaffl et al., 2002). In der folgenden Analyse wurde untersucht, ob die vier *Ago*-mRNAs in Oligodendrozyten während der Reifung differentiell exprimiert werden. Hierzu wurden die Ct-Werte der Agos auf die Ct-Werte des Referenzgens β Aktin normalisiert und anschließend wurden diese normalisierten Werte von 8DIV Oligodendrozyten auf die Werte der 1DIV OPCs bezogen. Es wurden \log_2 Werte aus drei unabhängigen Experimenten aufgetragen, wobei ein \log_2 -Wert größer als 0,5 bzw. kleiner als -0,5 als reguliert bezeichnet wird.

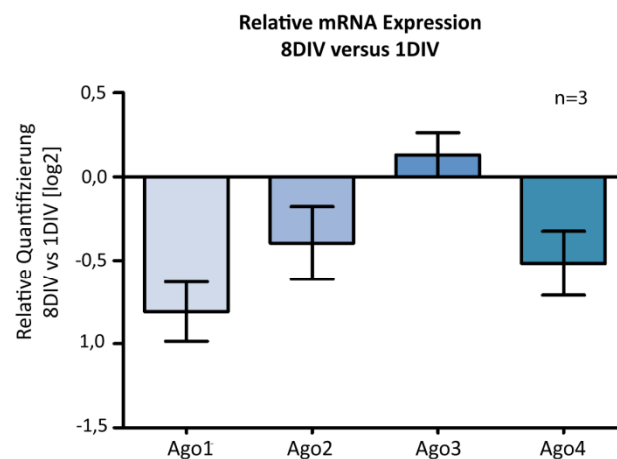


Abbildung 23: Relative mRNA Expression der vier Agos in primären Oligodendrozyten 8DIV versus 1DIV

Relative Quantifikation der mRNA Mengen von *Ago1* bis *4* in differenzierenden Oligodendrozyten. Es wurden die Crossingpoints (Ct) der *Ago*-mRNAs auf die Ct-Werte des Referenzgens β Aktin normalisiert und mithilfe der REST-Software wurden die mRNA-Mengen nach 8DIV auf die mRNA-Mengen nach 1DIV bezogen. Anzahl der Experimente, n=3. Es wird der \log_2 -Wert \pm SEM gezeigt.

Die Relative Quantifizierung der mRNAs von *Ago1*, 2, 3 und 4 in reifen Oligodendrozyten (8DIV) gegenüber Vorläuferzellen (1DIV) zeigt, dass *Ago1*-mRNA etwa 1,8fach und *Ago4*-mRNA etwa 1,5fach während der Entwicklung herunter reguliert werden (\log_2_{Ago1} : $-0,81 \pm 0,22$; \log_2_{Ago4} : $-0,52 \pm 0,24$). *Ago2*- und *Ago3*-mRNA zeigen keine Regulation während der Maturierung (\log_2_{Ago2} : $-0,39 \pm 0,26$; \log_2_{Ago3} : $-0,13 \pm 0,16$).

In den in Abbildung 22 und Abbildung 23 wurden jeweils drei unabhängige Experimente ausgewertet ($n=3$). Dies diente dazu, eine Tendenz der jeweiligen Analysen erkennen zu können. Aus diesem Grund wurde kein statistischer Test verwendet und es können keine Signifikanzen angegeben werden. Allerdings können die jeweiligen Effekte zum Verständnis der Expressionsmuster von *Argonaut*-mRNAs in Oligodendrozyten beitragen.

4.1.1.2 Argonaut-Proteine Ago1 und Ago2 werden in Oli-*neu* Zellen und primären Oligodendrozyten synthetisiert

Es konnte gezeigt werden, dass Oligodendrozyten die mRNAs der vier Argonaut-Proteine in frühen und späten Entwicklungsstadien exprimieren (siehe Abbildung 22). Anschließend wurde untersucht, ob auch die Proteine synthetisiert werden und wie diese lokalisiert und möglicherweise reguliert werden. Es wurden Untersuchungen der endogenen Proteinsynthese der beiden Argonaut-Proteine Ago1 und Ago2 durchgeführt. Es konnten nur diese beiden Agos auf Proteinebene untersucht werden, da nur für Ago1 und Ago2 Antikörper erhältlich waren. Des Weiteren wurden Analysen zur posttranslationalen Regulation von Argonaut-Proteinen an Ago2 durchgeführt.

Es wurden Gesamtzelllysate aus Oli-*neu* respektive primären Oligodendrozyten unterschiedlicher Differenzierungsstadien (2, 5, 8, 14 DIV) hergestellt und auf die Expression der Ago-Proteine Ago1 und Ago2 getestet.

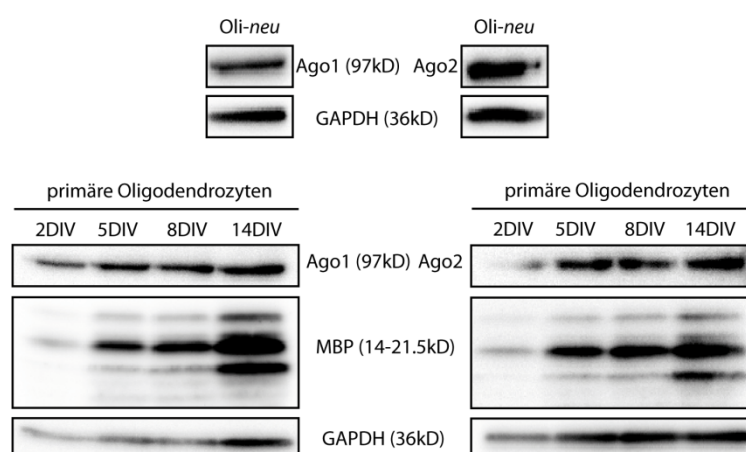


Abbildung 24: Expression der Ago-Proteine Ago1 und Ago2 in Oli-*neu* Zellen und differenzierenden primären Oligodendrozyten

Gesamtzelllysate von Oli-*neu* Zellen bzw. primären Oligodendrozyten unterschiedlicher Differenzierungsstadien (2, 5, 8, 14 DIV) werden auf die Expression der Ago-Proteine Ago1 und Ago2 getestet. In Oli-*neu* Zellen und in Oligodendrozyten aller Entwicklungsstadien werden die beiden Ago-Proteine gebildet. Außerdem wurde durch Applikation eines Antikörpers gegen

Myelin Basisches Protein (MBP) die Differenzierung der primären Oligodendrozyten *in vitro* verfolgt. Oli-*neu* Zellen bilden keine MBP Proteine. Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH) wurde als Ladekontrolle verwendet.

Die in Abbildung 24 gezeigten Western Blots demonstrieren die Expression der Argonaut-Proteine Ago1 und Ago2 in oligodendrogialen Zellen. In Oli-*neu* Zellen können beide Proteine mit einer deutlichen Bande bei ~100kD detektiert werden. Außerdem können beide Proteine in allen untersuchten Differenzierungsstadien, von Oligodendrozyten-Vorläuferzellen bis hin zu Myelin bildenden reifen Oligodendrozyten, nachgewiesen werden. Die ansteigenden Proteinlevel von MBP zeigen die spontane Differenzierung von Oligodendrozyten *in vitro*. Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH) dient als Ladekontrolle. Das Signal der beiden Ago-Proteine Ago1 und Ago2 scheint während der Differenzierung anzusteigen, allerdings steigt auch das Signal für die Ladekontrolle GAPDH von 2DIV bis 14DIV an. Dies könnte an der Qualität der Oligodendrozyten-Kulturen liegen, da diese in der Regel durch wenige Astrozyten verunreinigt sind. Die Proliferationsfähigkeit der Astrozyten führt dazu, dass der Anteil dieser Zellen im Laufe der Kultivierung ansteigt, womit die Gesamtmenge an GAPDH innerhalb der Kultur ansteigt. Da auch Ago-Proteine nicht ausschließlich in Oligodendrozyten, sondern in allen anderen Zellen exprimiert werden, steigt die Menge der Agos scheinbar an, dies kann allerdings nicht auf die Expression in Oligodendrozyten zurück geführt werden. Um dies genauer analysieren zu können, müssten zu 100% reine Oligodendrozyten-Kulturen hergestellt werden und diese auf die Expression von Argonaut-Proteinen untersucht werden. Außerdem könnten immunzytochemische Cofärbungen durchgeführt werden, in welchen auf die verschiedenen Zellmarker (Oligodendrozyten, Astrozyten, Mikroglia, Neurone) und Ago2 getestet werden könnte. Hierbei könnte ein Eindruck über die Expression der Ago-Proteine in den unterschiedlichen Zelltypen gewonnen werden, allerdings ist eine Quantifizierung der Expression in immunzytochemischen Experimenten schwierig. Es könnte die Ago-Expression in den unterschiedlichen Zelltypen über die Analyse der verschiedenen Intensitäten der Ago-Färbung im Vergleich zum jeweiligen Zellmarker untersucht werden.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Argonaut-Proteine Ago1 und Ago2 in Oli-*neu* Zellen sowie in allen Stadien der Oligodendrozyten-Maturierung nachgewiesen werden können. Somit scheint die translationale Regulation durch Ago-enthaltene RISC-Komplexe in allen Differenzierungsstadien von Oligodendrozyten eine Rolle zu spielen.

4.1.1.3 Ago1 und Ago2 können im murinen Nervus opticus nachgewiesen werden

Um die in Oli-*neu* Zellen und primären Oligodendrozyten gewonnenen Ergebnisse zu verifizieren, wurde die Expression von Ago1 und Ago2 im optischen Nerven *ex vivo* untersucht. Es wurden die Nerven von P1 und P10 Mäusen extrahiert und lysiert. Anschließend wurden Western Blots gegen Ago1 oder Ago2 und MBP sowie GAPDH als Ladekontrolle durchgeführt.

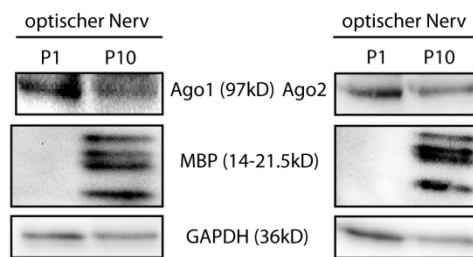


Abbildung 25: Expression von Ago1 und Ago2 im Nervus opticus *ex vivo*

Gesamtgewebelysate des Nervus opticus aus einem Tag und zehn Tage alten Mäusen (postnataler Tag, P) wurden auf die Expression von Ago1 oder Ago2 sowie auf MBP und GAPDH getestet. MBP zeigt die Myelinisierung im 10 Tage alten Nerven im Gegensatz zum einen Tag alten Nerven. GAPDH dient als Ladekontrolle.

Der optische Nerv besteht aus einer Ansammlung von Axonen, welche während der Entwicklung stark von Oligodendrozyten myelinisiert werden. Dementsprechend kann er als Modellsystem der Myelinisierung nahezu *in vivo* verwendet werden. Die Untersuchungen an optischen Nerven aus einem Tag alten Mäusen sowie aus zehn Tage alten Mäusen zeigen, dass die Myelinisierung durch Nachweis des MBP Proteins während der Entwicklung der Tiere gesteigert wird (siehe Abbildung 25). Im P1 Nerv kann kein MBP detektiert werden, wohingegen im P10 Nerv ein deutliches MBP-Signal zu erkennen ist. Die Analysen zur Expression der beiden Argonaut-Proteine Ago1 und Ago2 zeigen, dass beide Proteine in beiden untersuchten Entwicklungsstadien exprimiert werden.

Damit konnte die Expression der beiden Argonaut-Proteine Ago1 und Ago2 *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen werden. Anschließend wurde die zelluläre Lokalisation von Ago2 untersucht, um einen Eindruck darüber zu gewinnen, in welchen zellulären Prozessen diese möglicherweise eine Rolle spielen könnten.

4.1.1.4 Ago2 ist in granulären Strukturen in oligodendroglialen Ausläufern lokalisiert

Durch die in Abschnitt 4.1.1 beschriebenen Experimente konnte die Expression der mRNAs *Ago1*, *2*, *3*, und *4* sowie die Proteinsynthese von Ago1 und Ago2 nachgewiesen werden. Um einen Eindruck über die genaue Funktion und die Relevanz von Ago2 in Oligodendrozyten zu gewinnen, wurde die Lokalisation innerhalb der Zellen mittels Immunzytochemie untersucht (vergleiche 3.10.4). Es wurden primäre Oligodendrozyten nach einem Tag, sowie nach drei Tagen *in vitro* (1DIV, 3DIV) fixiert und gegen Ago2 bzw. MBP gefärbt.

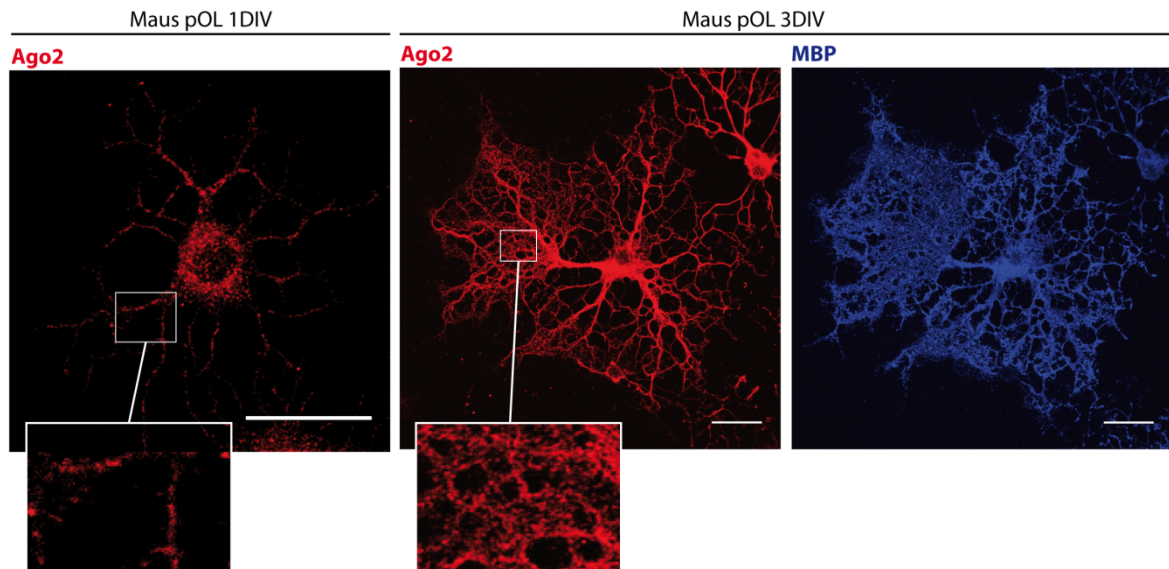


Abbildung 26: Zelluläre Lokalisation von Ago2 in primären Oligodendrozyten nach 1DIV und 3DIV

Zur Analyse der zellulären Lokalisation von Ago2 in Oligodendrozyten wurden primäre Oligodendrozyten (pOL) nach 1 bzw. 3 Tagen *in vitro* (DIV) fixiert und gegen Ago2 bzw. MBP gefärbt. Die jeweils vergrößerten Bereiche zeigen die granuläre Verteilung von Ago2 innerhalb der oligodendroglialen Ausläufer. Der Maßstabsbalken entspricht 20µm.

Durch die Analyse der zellulären Lokalisation von Proteinen kann ein Eindruck über deren Funktion gewonnen werden. Abbildung 26 zeigt die räumliche Verteilung von Ago2 innerhalb von Oligodendrozyten-Vorläuferzellen (1DIV) und reiferen, MBP-positiven Oligodendrozyten (3DIV). Die vergrößerten Bereiche (jeweils im unteren Bildabschnitt) zeigen in beiden Differenzierungsstadien eine granuläre Verteilung von Ago2 innerhalb des Oligodendrozyten-Ausläufers. Oligodendrozyten enthalten RNA-Granula, welche die mRNA des Myelin Basischen Proteins transportieren (White et al., 2008). Möglicherweise könnten innerhalb dieser Granula Ago2-Proteine assoziieren, wo sie an der translationalen Inhibition der mRNA beteiligt sein könnten. Um dies genauer zu untersuchen, wurden oligodendrogliale Zellen auf die mögliche Interaktion von hnRNP A2 und Ago2 sowohl immunzytochemisch als auch proteinbiochemisch untersucht.

4.1.2 Colokalisation von hnRNP A2 und Ago2

Zur Analyse der vermuteten Interaktion von Ago2 mit hnRNP A2 wurden zum einen immunzytochemische Färbungen mit Antikörpern gegen Ago2 und hnRNP A2/B1 sowie MBP durchgeführt und zum anderen wurden Immunpräzipitationen analysiert um die mögliche Interaktion der beiden Proteine miteinander zu untersuchen.

4.1.2.1 Ago2 und hnRNP A2 colokalisieren in granulären Strukturen in Oli-*neu* Zellen

Es wurden Oli-*neu* Zellen gegen Ago2 und hnRNP A2/B1 gefärbt und mittels Konfokalmikroskopie analysiert.

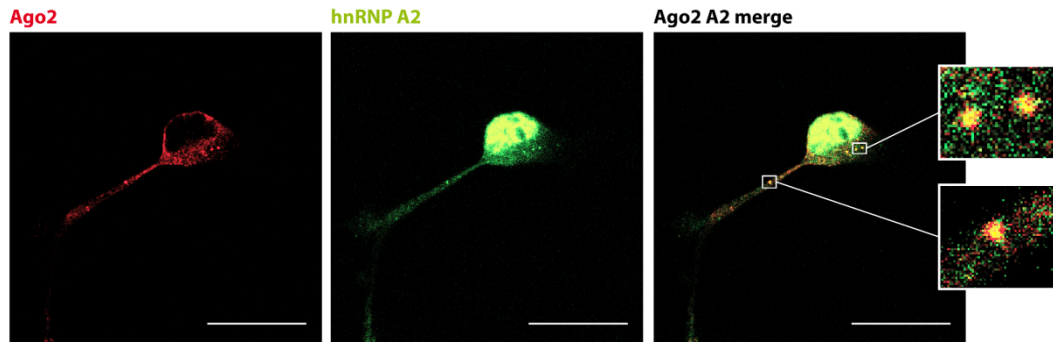


Abbildung 27: Zelluläre Colokalisation von Ago2 und hnRNP A2 in Oli-*neu* Zellen

Oli-*neu* Zellen wurden gegen Ago2 und hnRNP A2/B1 gefärbt und mittels Konfokalmikroskopie ausgewertet. Abgebildet ist eine konfokale Ebene. Maßstabsbalken 20µm.

Abbildung 27 zeigt eine konfokale Ebene der immunzytochemischen Analyse von Ago2 und hnRNP A2 in Oli-*neu* Zellen. Die Färbung gegen Ago2 erscheint sehr schwach, ist allerdings auf das Zellsoma und die Zellausläufer beschränkt, wobei die Verteilung in granulären Strukturen erkennbar ist. Die Analyse von hnRNP A2 zeigt eine starke zelluläre Lokalisation wie bereits früher beschrieben (White et al., 2008) und eine schwächere Immunreaktion in den oligodendroglialen Ausläufern, die in granulären Strukturen erscheint. Die Überlagerung der beiden Antikörperfärbungen zeigt, dass Ago2 und hnRNP A2 in Granula innerhalb des Zellsomas und der zellulären Ausläufer colokalisieren.

Es konnte somit gezeigt werden, dass Ago2 und hnRNP A2 in Oli-*neu* Zellen colokalisieren. Anschließend sollte untersucht werden, ob diese Colokalisation auch in primären Oligodendrozyten detektiert werden kann.

4.1.2.2 Ago2 und hnRNP A2 colokalisieren in primären Oligodendrozyten in den Rändern der Myelinmembranen

Es wurden primäre Oligodendrozyten aus C57BL/6 Mäusen kultiviert (siehe 3.5.4) und nach fünf Tagen *in vitro* (5DIV) fixiert. Anschließend wurden die Zellen gegen MBP, Ago2 und hnRNP A2/B1 gefärbt. Es wurden mithilfe eines TCS SP5 Konfokal-Mikroskops (Leica) einzelne, zwischen 200 und 300nm dicke Ebenen innerhalb der Zelle aufgenommen.

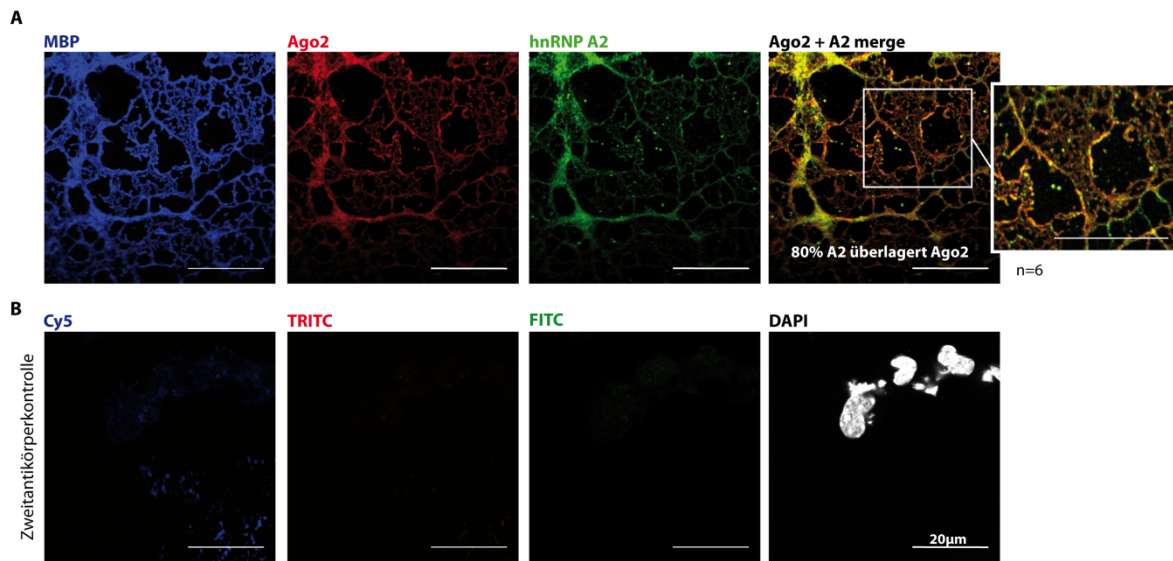


Abbildung 28: Zelluläre Colokalisation von Ago2 und hnRNP A2 in primären Oligodendrozyten 5DIV

A: Immunzytochemischer Nachweis der Colokalisation von Ago2 (rot) und hnRNP A2 (grün) in primären Oligodendrozyten nach 5 Tagen *in vitro*. In MBP (blau) positiven Zellen colokalisieren Ago2 und hnRNP A2 in den Rändern der Myelinmembranen. Es wurden 6 voneinander unabhängige Experimente ($n=6$) durchgeführt und jeweils spezielle Regionen (siehe vergrößerter Ausschnitt) mittels Mander's Koeffizient analysiert. Es wurde die zu Gesamt-Ago2 relative Überlagerung von hnRNP A2 mit Ago2 quantifiziert. Der Mittelwert aus 6 Experimenten ergibt für M2 eine 80%ige Colokalisation (Details siehe Text).

B: Zweitantikörperkontrolle (Inkubation des Zweitantikörpers ohne Erstantikörper-Inkubation) der Färbung aus A. Der Maßstabsbalken entspricht 20µm.

Die Antikörperfärbung von Ago2 und hnRNP A2/B1 zeigt eine partielle Colokalisation der beiden Proteine in den Rändern der Myelinmembranen von etwa 80% (80,18% \pm 8,3%, $n=6$) (siehe Abbildung 28A und Abbildung 43A) (Beispiele der quantifizierten Bereiche siehe Abbildung 43C im Anhang). Durch die Durchführung einer Zweitantikörperkontrolle, in welcher kein Primärantikörper appliziert wurde, kann ausgeschlossen werden, dass unspezifische Signale detektiert werden (Abbildung 28B).

Die Colokalisation wurde mithilfe der Software ImageJ und des Plugins JACoP unter Verwendung des Mander's Korrelations-Koeffizienten (MCC) durchgeführt (Manders et al., 1993; Bolte and Cordelieres, 2006). Die Analyse zeigt zwei unterschiedliche Werte, M1 beschreibt den Anteil des roten Kanals (Ago2) in Regionen des grünen Kanals (hnRNP A2) und M2 die Fraktionen des grünen Signals in Regionen des roten Kanals. In der gezeigten Analyse wurde der Koeffizient M2 verwendet, um die Colokalisation von Ago2 und hnRNP A2 in Bezug auf Gesamt-Ago2 zu zeigen (M1 in Abbildung 43B im Anhang dargestellt). Ein Wert von 0 entspricht keiner Colokalisation und ein Wert von 1 entspricht einer vollständigen, 100%igen Colokalisation der beiden Proteine. Es wurde zur Untermalung der Quantifizierung mittels MCC außerdem der Pearson's Korrelations-Koeffizient (PCC) berechnet sowie ein Coste's Test durchgeführt. Der PCC bestätigt die Colokalisation ($r=0,79$) und der Coste's Test zeigt einen P-Wert von 100%, womit die Colokalisation als signifikant bewiesen ist (siehe Abbildung 43B im Anhang).

Die Colokalisation von Ago2 und hnRNP A2/B1 innerhalb von oligodendroglialen Ausläufern zeigt, dass beide Proteine interagieren. Es kann damit vermutet werden, dass Ago2 möglicherweise Teil des hnRNP A2-abhängigen Transportwegs der *Mbp* mRNA ist.

4.1.2.3 Ago2 und hnRNP A2 interagieren in Oli-*neu* Zellen

Nach der Beobachtung, dass hnRNP A2/B1 und Ago2 in Oligodendrozyten in den Rändern der Myelinmembranen colokalisieren, sollte untersucht werden, ob die beiden Proteine auch biochemisch interagieren. Außerdem kann mithilfe von unterschiedlichen Expressionsplasmiden für die hnRNP A2/B1 Isoformen A2 und A2b untersucht werden, ob die Interaktion mit Ago2 Isoform-spezifisch stattfindet. Da Ago2 im Zellkern sowie im Zytoplasma lokalisiert ist (Gagnon et al., 2014), ist es möglich, dass die Interaktion von Ago2 und hnRNP A2/B1 in beiden Zellkompartimenten stattfindet, wobei in der immunzytochemischen Analyse keine Colokalisation der beiden Proteine im Zellkern detektiert werden konnte (vergleiche Abbildung 28).

Es wurden unterschiedliche Immunpräzipitationsexperimente durchgeführt um die Interaktion von Ago2 und hnRNP A2 bzw. A2b zu analysieren. Es wurde jeweils das eine Protein aufgereinigt und auf Copräzipitation des anderen Proteins mittels Western Blot getestet (siehe 3.10.2).

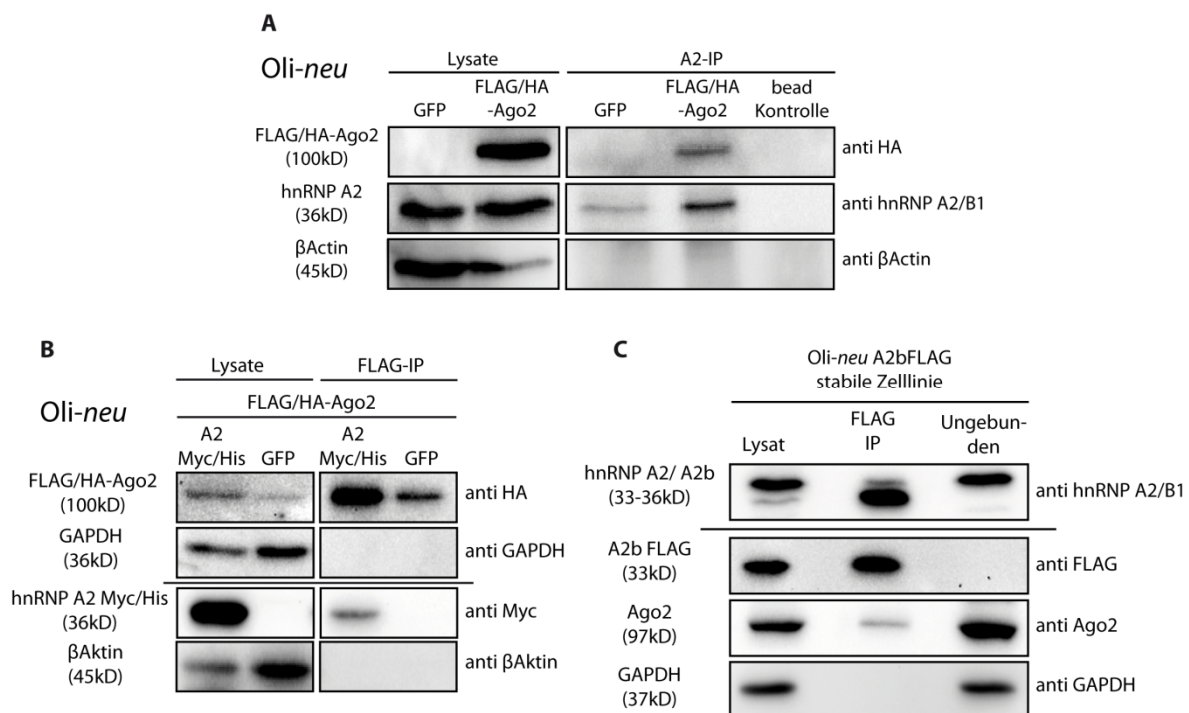


Abbildung 29: Copräzipitation von Ago2 und hnRNP A2 in Oli-*neu* Zellen

A: Immunpräzipitation von endogenen hnRNP A2/B1 Proteinen aus FLAG/HA-Ago2 überexprimierenden Oli-*neu* Zellen.

B: Immunpräzipitation von FLAG/HA-Ago2 Proteinen aus mit FLAG/HA-Ago2 und hnRNP A2 Myc/His transfizierten Oli-*neu* Zellen. Die horizontale Linie trennt zwei parallel durchgeführte Western Blots der gleichen Proben.

C: Immunpräzipitation von hnRNP A2b-FLAG aus A2b-FLAG stabil exprimierenden Oli-*neu* Zellen. Es wurden zwei Western Blots mit den gleichen Proben parallel durchgeführt (getrennt durch eine horizontale Linie).

Es wurden jeweils 2,5% des Gesamtzelllysates als Input aufgetragen (Lysat).

Abbildung 29 zeigt drei unterschiedliche Immunpräzipitationen (IP) zum Nachweis der Interaktion von Ago2 und den hnRNP A2 Isoformen in *Oli-neu* Zellen. Als Lysat ist jeweils das eingesetzte Gesamtzelllysate bezeichnet und mit IP die jeweils durchgeführte Immunpräzipitation. In A wurde in *Oli-neu* Zellen FLAG/HA-Ago2 überexprimiert und anschließend wurden endogene hnRNP A2/B1 Proteine immunpräzipitiert. In der IP wurde ein Antikörper verwendet, welcher alle hnRNP A2/B1 Isoformen bindet. Der Western Blot gegen HA zeigt, dass überexprimiertes FLAG/HA-Ago2 Protein mit hnRNP A2/B1 copräzipitiert. Zur Untersuchung welche der A2-Isoformen mit Ago2 interagieren, wurden verschiedene Expressionsplasmide überexprimiert. In *Oli-neu* Zellen wurde FLAG/HA-Ago2 und hnRNP A2-Myc/His bzw. GFP überexprimiert und anschließend wurde eine FLAG-Immunpräzipitation, wie in 3.10.2.1 beschrieben, durchgeführt und mittels Western Blot analysiert (B). Es wurden zwei SDS-PAGE-Gele parallel mit den gleichen Proben angefertigt (getrennt durch eine horizontale Linie). Die Western Blot Membranen wurden zum einen mit Antikörpern gegen den HA-Tag und GAPDH und zum anderen mit Antikörpern gegen den Myc-Tag und β Aktin inkubiert. Es ist zu erkennen, dass in der IP der FLAG-getagten Ago2-Proteine hnRNP A2-Myc/His copräzipitiert. Die GFP-Kontrolle, in welcher keine FLAG-getagten Proteine exprimiert und damit aufgereinigt werden, zeigt, dass diese Interaktion spezifisch nachgewiesen werden konnte. In (C) ist die FLAG-IP auf hnRNP A2b-FLAG stabil exprimierende *Oli-neu* Zellen dargestellt. Es wurden stabil exprimierende Zellen hergestellt um die zelluläre Verteilung des überexprimierten hnRNP A2b Proteins möglichst physiologisch zu halten. Nach der Bindung der FLAG-getagten Proteine an die Beads wurden die ungebundenen Proteine ebenfalls aufbewahrt und analysiert (Ungebunden). Es wurden parallel zwei Blots angefertigt, welche gegen hnRNP A2/B1 bzw. gegen FLAG, Ago2 und GAPDH geblottet wurden. Die in *Oli-neu* stabil exprimierten hnRNP A2b-FLAG Proteine wurden aufgereinigt und es konnte gezeigt werden, dass endogenes Ago2 copräzipitiert. Die A2-Isoform ist in *Oli-neu* stärker exprimiert als die Isoform A2b (obere Bande in der Spalte der Lysate entspricht A2, untere schwache Bande entspricht A2b). Die A2b-Isoform ist deutlich stärker in der Spalte der FLAG-IP zu erkennen, wodurch gezeigt ist, dass ganz spezifisch nur die eine Isoform über den assoziierten Tag immunpräzipitiert wurde. Allerdings wird hier auch das etwas größere Proteine A2 detektiert, welches nicht an FLAG getagt ist, wodurch es während der IP nicht gebunden wird. Es ist bekannt, dass die Isoform hnRNP A2 die Fähigkeit besitzt homotypisch zu polymerisieren (Carson et al., 2006). Diese Protein-Protein Interaktion wird durch die Glyzin-reiche Domäne vermittelt, welche zwischen den vier Proteinisofomen konserviert ist (Hatfield et al., 2002). Damit ist es möglich, dass die Isoform A2 mit der FLAG-getagte Isoform A2b dimerisiert und diese damit während der FLAG-IP mit aufgereinigt und durch den hnRNP A2/B1 Antikörper erkannt wird. In der Fraktion der ungebundenen Proteine ist die Bande der A2-Isoform deutlich zu erkennen, allerdings scheint die Bande für A2b nicht mehr detektiert zu werden, was für eine sehr hohe Effizienz der Präzipitation von hnRNP A2b-FLAG spricht.

Die Kontroll-Blots in allen drei Experimenten gegen β Aktin bzw. GAPDH zeigen, dass spezifisch nur die gewollten Proteine und daran assoziierte Proteine aufgereinigt werden konnten, da GAPDH und β Aktin nicht in der IP-Fraktion detektiert werden können.

Mithilfe der durchgeführten Immunpräzipitationsexperimente konnte nachgewiesen werden, dass hnRNP A2 und Ago2 in *Oli-neu* Zellen biochemisch interagieren. Außerdem wurde untersucht, welche der A2-Isoformen mit Ago2 assoziieren. Dabei konnte ein Hinweis darauf gefunden werden, dass hnRNP A2 und A2b dimerisieren (siehe Abbildung 29C). Durch dieses Ergebnis kann keine genaue Aussage darüber getroffen werden, mit welcher der A2-Isoformen Ago2 interagiert, da es möglich ist,

dass in der IP von A2b-FLAG Proteinen die Copräzipitation von Ago2 über hnRNP A2 vermittelt wird und nicht über hnRNP A2b stattfindet. Außerdem bleibt bisher unbekannt, ob die Interaktion von Ago2 mit hnRNP A2 direkt oder möglicherweise über weitere assoziierte Protein oder assoziierte RNAs stattfindet.

Mithilfe der bis hierhin durchgeführten Experimente konnte festgestellt werden, dass Oligodendrozyten Argonaut-Proteine exprimieren und dass Ago2 mit hnRNP A2 und möglicherweise A2b interagiert. hnRNP A2 ist eine Schlüsselkomponente des *Mbp* mRNA Transportweges, wobei es den Transport der translationally reprimierten mRNA Richtung axo-gliale Kontaktstelle vermittelt (Müller et al., 2013). Für die translationale Inhibition der *Mbp* mRNA ist die kleine nicht-codierende RNA 715 (sncRNA715) verantwortlich, welche innerhalb der 3'UTR der mRNA bindet und die Synthese von MBP reguliert. Außerdem konnte gezeigt werden, dass sncRNA715 mit hnRNP A2 in *Oli-neu* Zellen interagiert (Bauer et al., 2012). Wie genau die sncRNA715-abhängige Repression der Translation vermittelt wird, bleibt allerdings bislang ungeklärt. Argonaut-Proteine können über die Assoziation im RISC-Komplex die Translation von mRNAs über kleine nicht-codierende RNAs herbeiführen (Meister, 2013). Es soll nun im Folgenden untersucht werden, ob Ago2, welches mit hnRNP A2 interagiert, zusätzlich mit *Mbp* mRNA und sncRNA715 assoziiert und möglicherweise Teil des *Mbp* mRNA Transportweges ist. Hierbei könnte es für die sncRNA715-vermittelte translationale Inhibition zuständig sein.

4.1.3 SncRNA715 und *Mbp* mRNA binden an Ago2

Zur Untersuchung, ob sncRNA715 und *Mbp* mRNA mit Ago2 assoziieren, wurden *Oli-neu* Zellen mit GFP- oder FLAG/HA-Ago2- und MBP14-codierenden Plasmiden sowie 80pmol 715-mimic transfiziert. *Oli-neu* Zellen exprimieren endogen nur sehr geringe Mengen an *Mbp* mRNA und sncRNA715, aus diesem Grund wurde die MBP Isoform MBP14 als Plasmid sowie die synthetische sncRNA715 (715-mimic) zusätzlich überexprimiert. Es wurde eine Immunpräzipitation der FLAG/HA-Ago2 Proteine (FLAG-IP) durchgeführt und anschließend wurde die an die eluierten Proteine assoziierte RNA extrahiert, revers transkribiert (siehe 3.8.1 und 3.8.2) und mittels RT-PCR mit spezifischen Primerassays sowie Primerpaaren für sncRNA715 und *Mbp* mRNA analysiert (siehe 3.8.3.2 und 3.8.3.3). Als Positivkontrollen wurde für die PCR auf sncRNA715 die synthetische 715-mimic revers transkribiert und die cDNA in der RT-PCR verwendet und für die PCR auf *Mbp* mRNA wurde cDNA aus RNA von Ratten-Oligodendrozyten nach 14DIV verwendet. Es wurden außerdem zwei Negativkontrollen hergestellt, zum einen wurde eine FLAG-IP auf GFP-transfizierte Zellen durchgeführt, welche keine FLAG-getagten Proteine exprimieren, damit kein Signal im Western Blot detektiert wird und auch keine assoziierte RNA erkennbar sein sollte. Zum anderen wurde eine Bead-Kontrolle hergestellt, in welcher die magnetischen FLAG-beads ohne Zellysat inkubiert wurden. Mit diesem Ansatz sollte die Spezifität der RT-PCR gewährleistet werden und es sollte ausgeschlossen werden, dass eventuelle Verunreinigungen wie Übertragungen von kleinsten RNA-Mengen amplifiziert werden und damit ein Signal in der RT-PCR verursachen.

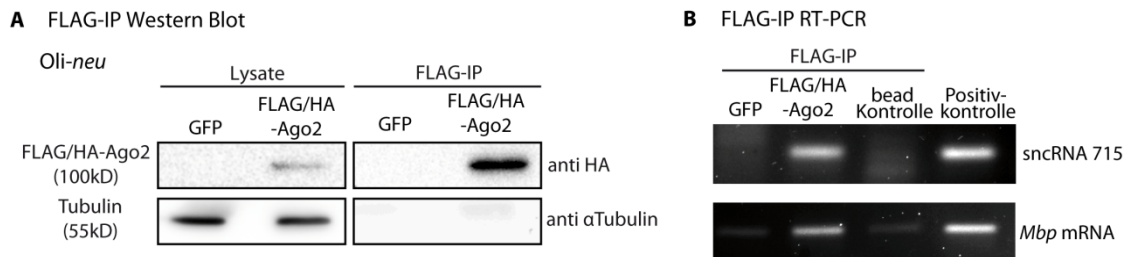


Abbildung 30: SncRNA715 und *Mbp* mRNA assoziieren an FLAG/HA-Ago2 Proteine

A: FLAG-Immünpräzipitation aus GFP oder FLAG/HA-Ago2 und MBP14 sowie 715-mimic überexprimierenden Oli-*neu* Zellen. Es wurden spezifisch nur FLAG-getagte Ago2-Proteine aufgereinigt. Lysat einspricht jeweils 2,5% des Gesamtzelllysates.

B: Agarosegel der RT-PCR der RNA des Eluates der in A dargestellten FLAG-IP. Die Positivkontrolle für sncRNA715 entspricht der cDNA aus synthetischer 715-mimic und als Positivkontrolle für *Mbp* mRNA wurde cDNA aus Ratten-Oligodendrozyten nach 14DIV verwendet.

Abbildung 30A zeigt den Western Blot zur FLAG-IP auf GFP oder FLAG/HA-Ago2 transfizierte Oli-*neu* Zellen. Es wurden spezifisch nur FLAG/HA-Ago2 Proteine aufgereinigt, was daran zu erkennen ist, dass keine Bande in der Spalte der GFP-Transfektion sowie keine Banden für α Tubulin in der FLAG-IP zu detektieren sind. Abbildung 30B zeigt das Agarosegel der RT-PCR für sncRNA715 (oben) und *Mbp* mRNA (unten) auf cDNA aus der in A gezeigten FLAG-IP. Es ist für beide RNAs eine deutliche Bande im Agarosegel zu erkennen. Verglichen mit der jeweiligen Positivkontrolle, migriert die Bande auf gleicher Höhe, was die Spezifität der Amplifikation unterstreicht. Es sind leichte Banden in den Negativkontrollen (GFP und Bead-Kontrolle) zu erkennen, welche auf mögliche Verunreinigung durch Übertragung von kleinen RNA-Mengen zurück zu führen sein könnten, allerdings ist die Intensität der Banden sehr schwach und für das Gel der sncRNA715 scheint die Höhe nicht mit der in der Positivkontrolle übereinzustimmen. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass Ago2 mit *Mbp* mRNA und sncRNA715 in Oli-*neu* Zellen assoziiert. Damit liegt die Vermutung nahe, dass in Oligodendrozyten Argonaut-Proteine innerhalb des hnRNP A2-abhängigen *Mbp* mRNA Transportgranula agieren und möglicherweise über die sncRNA715 die Translation der *Mbp* mRNA reprimieren.

Falls Ago2-Proteine zusätzliche Komponenten des RNA-Granulas sind und innerhalb des Granulas über sncRNA715 die Translation regulieren, stellt sich die Frage, wie diese möglicherweise reguliert werden. In einer Studie aus 2011 wurde die Sequenz von Ago2 mittels Massenspektrometrie auf mögliche Phosphorylierungsstellen untersucht. Hierbei konnten verschiedene Aminosäuren identifiziert werden, welche phosphoryliert werden. Während der Studie stellte sich heraus, dass der Phosphorylierungsstatus eines konservierten Tyrosins an der Position Y529 innerhalb der MID-Domäne die Bindung zu kleinen RNAs beeinflusst (Rüdel et al., 2011). Ein entscheidender Schlüsselregulator der translationalen Aktivierung von *Mbp* ist die Tyrosin-Kinase Fyn. Durch Fyn werden Granula-Komponenten wie hnRNP A2 und F phosphoryliert, wodurch die mRNA frei und die Translation ermöglicht wird (Müller et al., 2013). Möglicherweise könnten auch Agos Zielproteine der Src-Kinase Fyn sein, wobei eventuell die translationale Repression der *Mbp* mRNA mittels an Ago2-gebundene sncRNA715 über die Phosphorylierung von Ago2 reguliert werden könnte. Um diese Hypothese genauer zu untersuchen, wurde im Folgenden die mögliche Interaktion von Ago2 mit Fyn in Oligodendrozyten untersucht.

4.1.4 Argonaut-Proteine interagieren mit der Src-Kinase Fyn

Es wurden primäre Oligodendrozyten nach drei Tagen *in vitro* fixiert und gegen die Antigene Ago2, Fyn-Kinase und MBP gefärbt. Die Immunoreaktivität für MBP wird als Marker für differenzierte Oligodendrozyten verwendet.

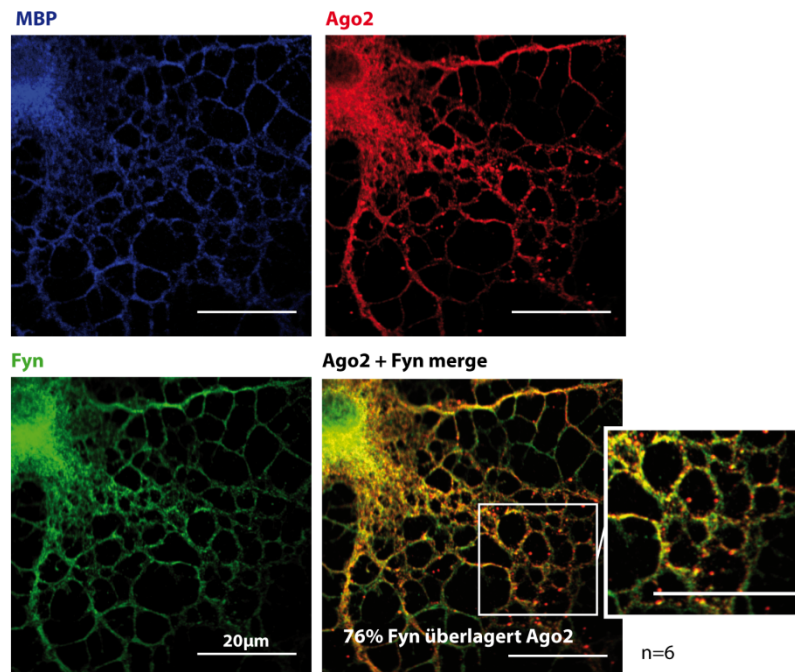


Abbildung 31: Colokalisation von Ago2 und Fyn kinase

Primäre Maus-Oligodendrozyten nach 3 Tagen *in vitro* wurden gegen MBP, Fyn und Ago2 gefärbt. Fyn + Ago2 merge zeigt die Überlagerung der Ago2 und Fyn Färbungen. Es ist eine Colokalisation in den Ausläufern und den Rändern der Myelinmembranen zu erkennen. Es wurden 6 voneinander unabhängige Experimente ($n=6$) durchgeführt und jeweils spezielle Regionen (siehe vergrößerter Ausschnitt) mittels Mander's Korrelations-Koeffizient analysiert. Es wurde die zu Gesamt-Ago2 relative Überlagerung von Fyn mit Ago2 quantifiziert. Der Mittelwert aus 6 Experimenten ergibt eine 76%ige Colokalisation (Details siehe Text). Der Maßstabsbalken entspricht $20\mu\text{m}$.

Abbildung 31 zeigt die Colokalisation von Ago2 und Fyn innerhalb von Myelin-bildenden Oligodendrozyten. Ago2 sowie Fyn werden in der gesamten Zelle exprimiert, wobei eine Colokalisation von 76% ($76,45\% \pm 4,8\%$) (vergleiche Abbildung 44A) nur innerhalb der dickeren Ausläufer sowie in den Rändern der Myelinmembranen festgestellt werden kann (Beispiel der quantifizierten Bereiche siehe Abbildung 44C im Anhang). Die Colokalisation wurde mithilfe des Mander's Korrelations-Koeffizienten (MCC) quantifiziert (Manders et al., 1993; Bolte and Cordelieres, 2006). Hierzu wurde die Fraktion von Fyn positiven Bereichen auf die Gesamt-Ago2 positive Fraktion bezogen, wobei ein Wert von 0 keine Colokalisation bedeutet und ein Wert von 1 eine 100%ige Überlagerung. Auch hier wurde zur Bestätigung der Quantifizierung mittels MCC zusätzlich der Pearson's Korrelations-Koeffizient (PCC) berechnet sowie ein Coste's Test durchgeführt. Der PCC bestätigt die Colokalisation ($r=0,80$) und der Coste's Test zeigt einen P-Wert von 100%, womit die Colokalisation als signifikant bewiesen ist (siehe Abbildung 44B im Anhang).

Fyn ist eine membranständige Kinase und in Oligodendrozyten innerhalb von Lipid rafts, welche in den peripheren Ausläufern gebildet werden, aktiv (Krämer-Albers et al., 2011). Die aktive Fyn-Kinase

setzt wiederum die Synthese von MBP in Gang, wodurch Myelinmembranen gebildet werden (White and Krämer-Albers, 2014). Die Myelinmembran kann dann immer weiter expandieren, wobei die *Mbp* mRNA-enthaltenen RNA-Granula nicht in die Membran eindringen, sondern in den dickeren Ausläufern bzw. in den Rändern der Myelinmembranen aufgelöst werden. An diesen Stellen wird neues MBP Protein gebildet, welches anschließend in die bereits gebildete Membran diffundieren kann (Aggarwal et al., 2011b). Die Erkenntnis, dass genau an diesen Stellen innerhalb des Oligodendrozyten Ago2 und Fyn colokalisieren, gibt einen Hinweis darauf, dass Ago2 möglicherweise mit Fyn interagiert und am Prozess der *Mbp* mRNA Regulation beteiligt sein könnte.

4.1.5 Argonaut-Proteine werden von Fyn phosphoryliert

In Abbildung 31 ist die zelluläre Colokalisation der Src-Kinase Fyn mit Ago2 gezeigt. Allerdings kann durch diese immunzytochemischen Analysen nicht genau nachgewiesen werden, dass beide Proteine miteinander interagieren und es kann auch nicht untersucht werden, ob möglicherweise Ago2 ein Zielprotein von Fyn darstellt. Um dies zu untersuchen, wurden Immunpräzipitationsexperimente in HEK293T sowie in *Oli-neu* Zellen durchgeführt.

4.1.5.1 Phosphorylierung von Ago-Proteinen in HEK293T Zellen

Um zu untersuchen, ob die unterschiedlichen Argonaut-Proteine mit der Src-Kinase Fyn interagieren, wurden HEK293T Zellen mit FLAG/HA-getagten Ago1, 2, 3 bzw. 4 Expressionskonstrukten und GFP, Fyn-, FynWT oder Fyn+ cotransfiziert. Zwei Tage nach der Transfektion wurde eine FLAG-IP durchgeführt um alle FLAG-getagten Proteine aufzureinigen. Die IPs sowie die Gesamtlysate (Lysate) wurden mittels Western Blot analysiert.

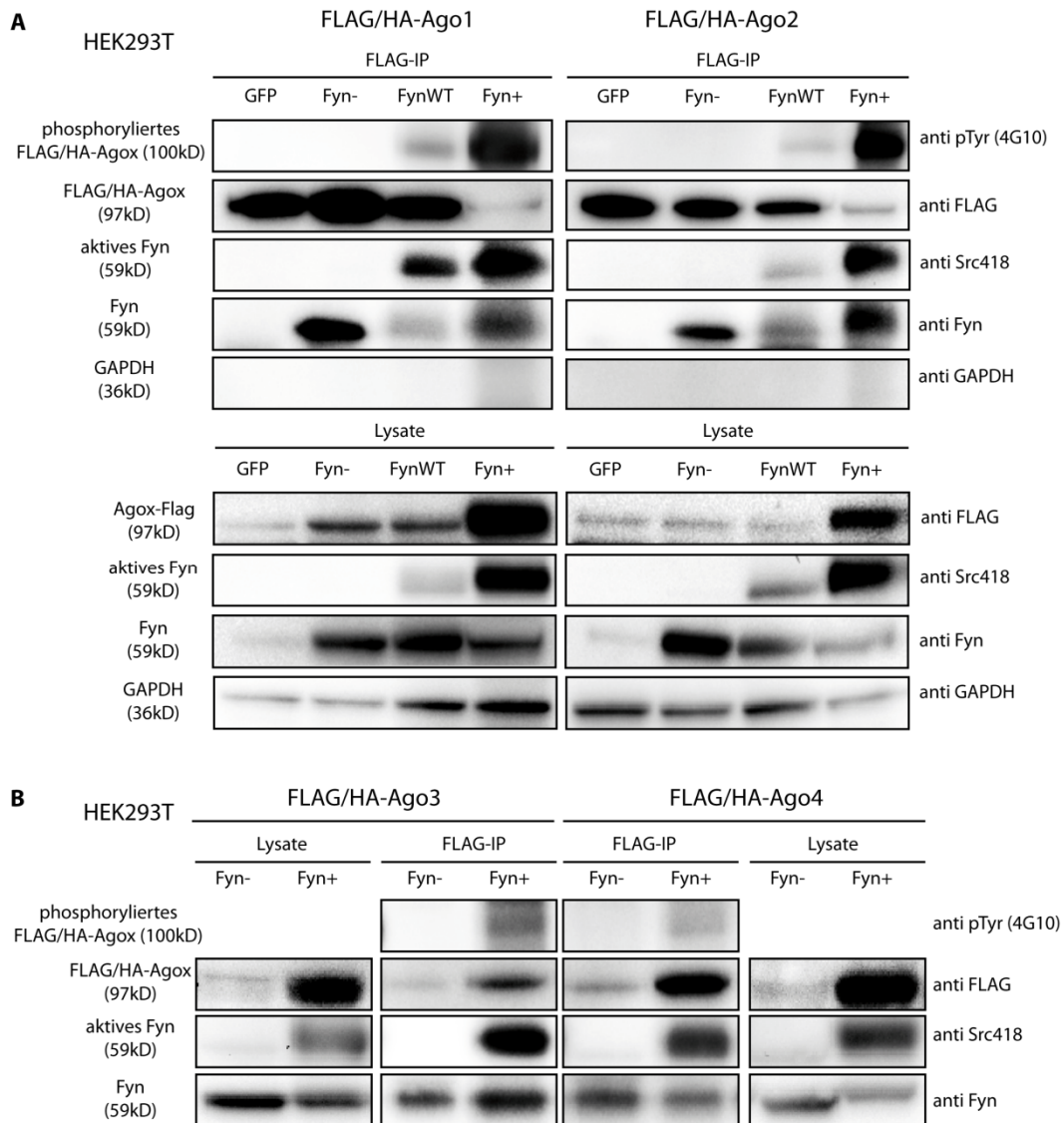


Abbildung 32: FLAG/HA-Ago1-4 werden in HEK293T Zellen von Fyn phosphoryliert

A: HEK293T Zellen wurden mit FLAG/HA-Ago1 oder FLAG/HA-Ago2 und GFP, Fyn-, FynWT oder Fyn+ cotransfiziert.

B: HEK293T Zellen wurden mit FLAG/HA-Ago3 oder FLAG/HA-Ago4 und Fyn- oder Fyn+ cotransfiziert.

A+B: Es wurde eine FLAG-IP durchgeführt und auf phosphoryliertes Ago (pTyr), Gesamt-FLAG, aktives Fyn (Src418), Gesamt-Fyn und GAPDH getestet. Lysate zeigen 2,5% der in der IP eingesetzten Proteinlysate. Alle vier Argonaut-Proteine werden in Abhängigkeit von Fyn phosphoryliert.

Abbildung 32 zeigt die Ergebnisse der Western Blot Analysen der FLAG-IPs. Zur Untersuchung der Phosphorylierung der Proteine wurde ein Antikörper verwendet, welcher spezifisch phosphorylierte Tyrosine erkennt (clone 4G10, Merck-Millipore). Durch die Verwendung dieses Antikörpers auf die Eluate der FLAG-IP können spezifisch Tyrosin-phosphorylierte Ago-Proteine nachgewiesen werden. In der jeweils ersten Zeile ist zu erkennen, dass nur in den FLAG-IPs aus mit FynWT bzw. Fyn+ transfizierten Zellen Tyrosin-phosphorylierte Ago-Proteine nachgewiesen werden konnten. Diese Fyn-abhängige Tyrosin-Phosphorylierung kann für alle vier Argonaut-Proteine gezeigt werden (Abbildung 32A und B). Außerdem ist die Stärke der Phosphorylierung der Ago-Proteine abhängig von der Aktivität der Fyn-Kinase, welche in der jeweils dritten Reihe mit einem Antikörper, der aktive Src-Kinasen (Src418) erkennt, gezeigt ist. Der Src418-Antikörper bindet alle aktiven Src-Kinasen über die

jeweiligen Tyrosine, welche durch Autophosphorylierung phosphoryliert werden und damit eine maximale Aktivität der Kinase Domäne induziert (Src: Y418, Fyn: Y420). Da in den hier gezeigten Experimenten Fyn stark überexprimiert wurde, kann davon ausgegangen werden, dass das Signal der aktiven Fyn-Kinase entspricht und keine anderen Src-Kinasen detektiert werden. Des Weiteren kann festgestellt werden, dass Ago2 und Fyn biochemisch direkt miteinander interagieren, da in der FLAG-IP, welche spezifisch FLAG/HA-getagte Ago-Proteine aufreingt, Fyn copräzipitiert. Die Verwendung eines Antikörpers gegen Gesamt-Fyn (aktivitätsunabhängig) zeigt, dass die Interaktion nicht von der Aktivität der Fyn-Kinase abhängt, da auch überexprimiertes, inaktives Fyn (Fyn-) in der FLAG-IP mit Ago-Proteinen copräzipitiert.

Es ist auffällig, dass in Abbildung 32A, obwohl mehr FLAG/HA-Ago Protein im Gesamtzelllysat exprimiert werden (zu erkennen im unteren Abschnitt (Lysate) in der zweiten Zeile mit anti FLAG Antikörper inkubiert), weniger FLAG/HA-getagtes Ago2-Protein in der FLAG-IP mit aufgereinigt wurde (oberer Abschnitt (FLAG-IP), zweite Zeile mit anti FLAG-Antikörper inkubiert). In Abbildung 32B allerdings wurde dieser Effekt nicht beobachtet. Hier wurde eine deutlich höhere Menge an FLAG/HA-Ago Proteinen im Gesamtzelllysat (Lysate, anti FLAG-Blot) nachgewiesen und gleichzeitig wurden mehr FLAG/HA-getagte Proteine aufgereinigt (FLAG-IP, anti FLAG-Blot) (beides zweite Zeile). Eine Erklärung hierfür kann nicht eindeutig gefunden werden. Es konnte während der Durchführung der Studie beobachtet werden, dass mit konstitutiv aktiver Fyn-Kinase transfizierte Zellen häufig morphologische Veränderungen zeigten. In manchen Fällen verloren die Zellen an Vitalität und Adhärenz, womit die Gesamtzellzahl meist geringer erschien. Dies wurde allerdings nicht nähergehend untersucht. Es liegt allerdings nahe, dass eine Überexpression einer stets aktiven Kinase viele unterschiedliche zelluläre Prozesse beeinflusst, welche unter physiologischen Bedingungen ausbalanciert wären und nun möglicherweise verschoben sein könnten. Fyn wird spezifisch in Antwort auf die Aktivierung verschiedener Signalkaskaden aktiviert, wodurch die Differenzierung von Oligodendrozyten initiiert wird (Krämer-Albers et al., 2011). Die übermäßige Aktivierung dieser Prozesse kann zu unterschiedlichsten Reaktionen führen, die für die Vitalität der Zellen negative Auswirkungen haben könnten. Die morphologischen Veränderungen wurden nach Überexpression der Wildtyp-Fyn-Kinase nicht beobachtet. Der Grund hierfür ist möglicherweise, dass diese Kinase in der unmutierten Form vorliegt, also nicht aktiv ist und erst endogen innerhalb der Zelle aktiviert werden muss. Diese Aktivierung wiederum unterliegt unterschiedlichen Regulationsmechanismen, welche endogen gestartet und reguliert werden müssen (Details siehe 2.1.1.4.1.1).

Als Spezifitätskontrolle innerhalb der IP diene Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH), da dieses Protein nicht mit FLAG/HA-Ago2 interagieren sollte und damit nicht mit in der IP aufgereinigt wird. Es ist zu erkennen, dass kein GAPDH in der FLAG-IP detektiert werden kann und damit die IP spezifisch FLAG-getagte bzw. damit assoziierte Proteine aufreingt.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass alle vier Argonaut-Proteine mit der Src-Kinase Fyn interagieren und von dieser phosphoryliert werden.

4.1.5.2 Phosphorylierung von Ago2 in Oli-*neu* Zellen

Bisher konnte die biochemische Interaktion der Argonaut-Proteine mit der Src-Kinase Fyn in Überexpressionsexperimenten aus HEK293T Zellen gezeigt werden. Im Folgenden soll geklärt

werden, ob die Interaktion von Ago2 mit Fyn und die Fyn-abhängige Phosphorylierung auch in oligodendroglialen Zellen nachzuweisen ist. Hierzu wurden *Oli-neu* Zellen mit FLAG/HA-getagtem Ago2 und GFP bzw. FynWT cotransfiziert und Ago2 über FLAG-IP aufgereinigt. Anschließend wurde die IP mittels Western Blot unter anderem auf Tyrosin-phosphorylierte Proteine analysiert.

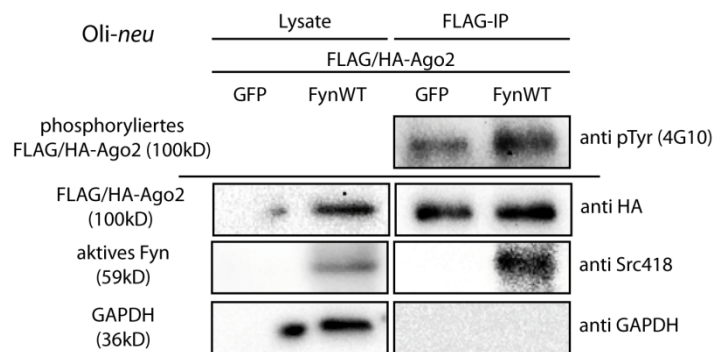


Abbildung 33: FLAG/HA-Ago2 wird in *Oli-neu* Zellen von Fyn phosphoryliert

Oli-neu Zellen wurden mit FLAG/HA-Ago2 und GFP oder FynWT transfiziert. FLAG/HA-Ago2 wurde über eine FLAG-IP aufgereinigt und per Western Blot analysiert. Es wurden Antikörper gegen phosphorylierte Tyrosine (pTyr, 4G10), HA-Tag, aktives Fyn (Src418) und GAPDH als Spezifitätskontrolle verwendet. Die horizontale Linie trennt zwei Blots mit den gleichen Proben. Die Lysate entsprechen 2,5% des Gesamtzelllysates.

In Abbildung 33 ist das Ergebnis der Western Blot Analyse der FLAG-IP auf FLAG/HA-Ago2 und GFP bzw. FynWT überexprimierende *Oli-neu* Zellen gezeigt. Mit einem Antikörper, welcher Tyrosin-phosphorylierte Proteine erkennt (pTyr, 4G10), kann in der ersten Zeile gezeigt werden, dass nach Überexpression von FynWT im Gegensatz zu GFP deutlich mehr FLAG/HA-Ago2 Proteine Tyrosin-phosphoryliert werden. In der Spalte der aus GFP-transfizierten Zellen ist eine schwächere Bande zu erkennen, welche durch die Tyrosin-Phosphorylierung der FLAG/HA-Ago2 Proteine durch endogene Fyn-Kinase verursacht wird. Dies ist in *Oli-neu* Zellen und nicht in HEK293T Zellen nachzuweisen (vergleiche Abbildung 32), da *Oli-neu* Zellen stärker endogen Fyn exprimieren. Die Analyse auf aktive Fyn-Kinase mithilfe des Src418 Antikörpers zeigt, dass auch in oligodendroglialen Vorläuferzellen Ago2 und Fyn interagieren, da innerhalb der FLAG/HA-Ago2-IP aktives Fyn mit gebunden wird. GAPDH dient auch in diesem Experiment als Spezifitätskontrolle und der Blot auf die FLAG-IPs zeigt, dass keine unspezifischen Proteine in der IP aufgereinigt werden.

Im nachfolgenden Experiment sollte geklärt werden, ob die Phosphorylierung von Ago2 durch Fyn auch an endogenen Ago2-Proteinen in *Oli-neu* Zellen stattfindet. Hierzu wurden *Oli-neu* Zellen mit GFP oder FynWT transfiziert und es wurde eine IP aller Tyrosin-phosphorylierten Proteine durchgeführt. Anschließend wurde mittels Western Blot auf endogenes Ago2 getestet.

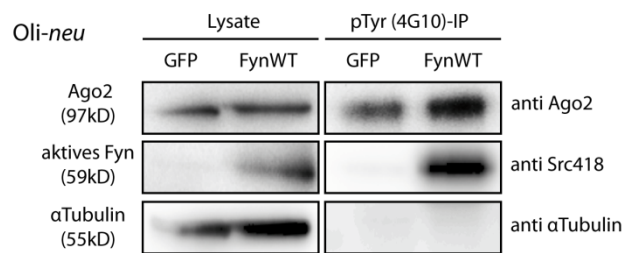


Abbildung 34: Endogenes Ago2 wird in Oli-neu Zellen von Fyn phosphoryliert

In Oli-neu Zellen wurde GFP oder FynWT überexprimiert und es wurde eine IP von Tyrosin-phosphorylierten Proteinen durchgeführt. Es wurden Western Blots gegen Ago2, aktives Fyn (Src418) und α Tubulin durchgeführt. Lysate zeigen 2,5% der in der IP eingesetzten Proteinlysate.

Die Immunpräzipitation von Tyrosin-phosphorylierten Proteinen aus Oli-neu Zellen ist in Abbildung 34 gezeigt. In der ersten Zeile wurde auf endogenes Ago2 untersucht und es ist eine deutlich stärkere Bande in der IP aus FynWT überexprimierenden Zellen für endogenes Ago2 zu erkennen. Das bedeutet, dass in Zellen, welche höhere Mengen aktiver Fyn-Kinase exprimieren (verdeutlicht in der zweiten Zeile, in welcher gegen aktives Fyn geblottet wurde), mehr Ago2-Proteine Tyrosin-phosphoryliert werden. Die linken beiden Spalten zeigen die eingesetzten Gesamtzelllysate und es ist zu erkennen, dass gleiche Proteinmengen von Ago2 in beiden Ansätzen (GFP und FynWT) exprimiert werden. Es erscheint zusätzlich in der 4G10-IP ein Signal für die überexprimierte Fyn-Kinase, da diese phosphorylierte Tyrosine enthält. Es wurde in diesem Experiment allerdings nur auf die aktive Form der Fyn-Kinase mithilfe des Src418 Antikörpers getestet. α Tubulin wurde als Spezifitätskontrolle verwendet, welches nicht in der IP detektierbar ist. Damit ist gewährleistet, dass die 4G10-IP spezifisch Tyrosin-phosphorylierte Proteine aufreinigt.

Bisher konnte gezeigt werden, dass Argonaut-Proteine in Oligodendrozyten exprimiert werden, mit hnRNP A2, *Mbp* mRNA und sncRNA715 interagieren und von Fyn phosphoryliert werden. Nach der Studie von Rüdell et al. in 2011, in welcher Phosphorylierungsstellen innerhalb der Ago2-Sequenz identifiziert wurden (Rüdell et al., 2011), könnte es interessant sein, zu untersuchen, ob die Fyn-abhängige Phosphorylierung einen Einfluss auf die Bindung von Ago2 zur sncRNA715 hat und damit möglicherweise die Translation von *Mbp* reguliert. Der Phosphorylierungsstatus eines Tyrosins an der Position Y529 soll die Bindung zu kleinen RNAs innerhalb des miRISC regulieren (Rüdell et al., 2011). Im Folgenden sollte geklärt werden, ob möglicherweise dieses regulatorische Tyrosin ein Substrat der Fyn-Kinase ist oder ob ein anderes innerhalb der Studie beschriebenes Tyrosin an der Position Y393 oder eventuell auch beide von Fyn phosphoryliert werden.

4.1.6 Phosphomutanten von FLAG/HA-Ago2 an der Position Y393F und Y529F werden weiterhin phosphoryliert

Zur Identifizierung der Phosphorylierungsstelle innerhalb der Ago2-Sequenz wurden Phosphorylierungsmutanten hergestellt. Es wurden die beiden Tyrosine (Y) an der Position Y393 und Y529 sowie beide zusammen jeweils in ein Phenylalanin (F) mutiert (siehe 3.9.3), welches nicht mehr von der Kinase phosphoryliert werden kann. Diese Mutanten wurden anschließend zusammen mit

FynWT in HEK293T Zellen transfiziert, parallel mit einer Transfektion der Wildtyp-FLAG/HA-Ago2 Plasmiden und GFP bzw. FynWT und über eine FLAG-IP aufgereinigt. Das Eluat dieser IP wurde anschließend mittels Western Blot auf phosphorylierte Ago2-Proteine untersucht.

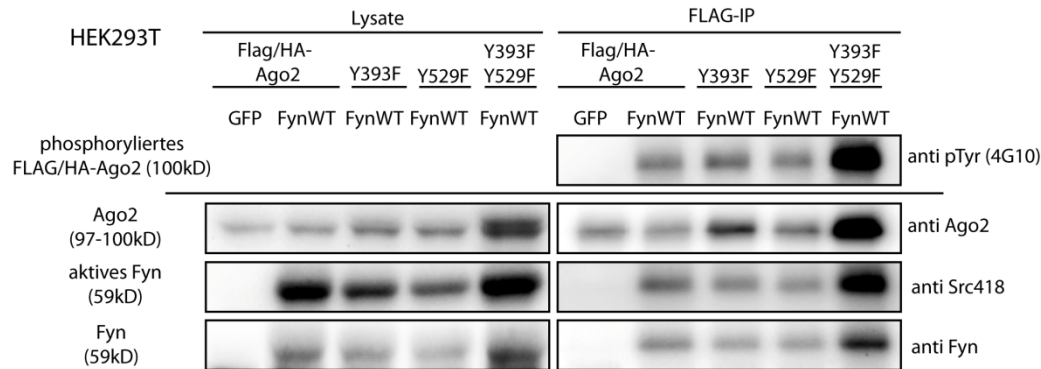


Abbildung 35: FLAG/HA-Ago2-Phosphorylierungsmutanten werden von Fyn phosphoryliert

Es wurden Phosphorylierungsmutanten der FLAG/HA-Ago2 Plasmide hergestellt, in denen entweder das Tyrosin an der Position Y393 oder Y529 oder beide gleichzeitig gegen ein Phenylalanin ausgetauscht wurden, sodass die Phosphorylierung an diesen Aminosäuren nicht mehr möglich ist. HEK293T Zellen wurden mit dem Wildtyp-Plasmid oder den Phosphorylierungsmutanten sowie mit GFP oder FynWT transfiziert. Nach Durchführung einer FLAG-IP wurden die assoziierten Proteine mittels Western Blot analysiert. Es wurden Antikörper gegen phosphorylierte Tyrosine (pTyr), Ago2, aktives Fyn (Src418) und Gesamt-Fyn verwendet. Die horizontale Linie trennt zwei Blots mit gleichen Proben. Lysate zeigen 2,5% der in der IP eingesetzten Proteinlysate.

Abbildung 35 zeigt das Ergebnis zur Untersuchung der Ziltyrosine der Fyn Kinase in der Ago2-Sequenz. In der ersten Zeile ist zu erkennen, dass unabhängig der Mutation der Aminosäuren Y393 oder Y529 bzw. beider zusammen in ein Phenylalanin (F), die FLAG/HA-Ago2-Proteine weiterhin Tyrosin-phosphoryliert werden. Es kann ein Signal bei Verwendung des 4G10-Antikörpers, welcher phosphorylierte Tyrosine erkennt, in allen FLAG/HA-Ago2-IPs, welche aus FynWT überexprimierenden Zellen hergestellt wurden, detektiert werden. Außerdem kann kein Unterschied in der Stärke der Phosphorylierung in den verschiedenen Mutanten im Vergleich zum Wildtyp FLAG/HA-Ago2 oder auch untereinander festgestellt werden. Die jeweiligen Signale in der ersten Zeile für phosphoryliertes FLAG/HA-Ago2 sind äquivalent zu der Stärke der darunter liegenden Signal für Gesamt-FLAG/HA-Ago2 (detektiert durch einen Antikörper gegen Ago2), sowie zur Aktivität der Fyn-Kinase (Src418). Die Detektion der gesamten Fyn-Kinase innerhalb der Zellen durch einen aktivitätsunabhängigen Antikörper belegt die Überexpression der Kinase in den mit FynWT transfizierten Zellen.

Die Mutation der beiden Aminosäuren Y393 und Y529 in Phenylalanine zeigte keine Reduktion der Phosphorylierung der FLAG/HA-Ago2 Proteine, womit vermutet werden kann, dass diese beiden Tyrosine nicht oder zumindest nicht ausschließlich von der Fyn-Kinase phosphoryliert werden. Allerdings enthält die Sequenz des FLAG- und HA- Tags zusätzlich verschiedene Tyrosine. Um ausschließen zu können, dass in den Phosphorylierungsmutanten nicht die Phosphorylierung des Tags, sondern die Phosphorylierung von Tyrosinen innerhalb der Ago2-Sequenz detektiert wird, wurden Expressionskonstrukte des Wildtyp-Ago2, sowie der Ago2Y393F/Y529F-Doppelmutante mit einem Myc/His-Tag hergestellt. Dieser Myc/His-Tag befindet sich zum einen im Gegensatz zum

FLAG/HA-Tag N-terminal und zum anderen enthält die Sequenz dieses Tags keine Tyrosine. Mit diesen Plasmiden wurden die zuvor beschriebenen Experimente wiederholt.

4.1.7 Phosphorylierung der Ago2-Expressionskonstrukte ist unabhängig von dem assoziierten Tag

Es wurden HEK293T Zellen mit Ago2-Myc/His bzw. Ago2 Y393F/Y529F-Myc/His und GFP oder FynWT bzw. Fyn+ cotransfiziert. Anschließend wurde eine His-Isolation durchgeführt (siehe 3.10.2.2), in welcher die Myc/His-getagten Proteine an mit Kobalt-beschichtete magnetische Beads gebunden und darüber aufgereinigt werden. Die Eluate und Gesamtzelllysate wurden mittels Western Blot Analyse untersucht.

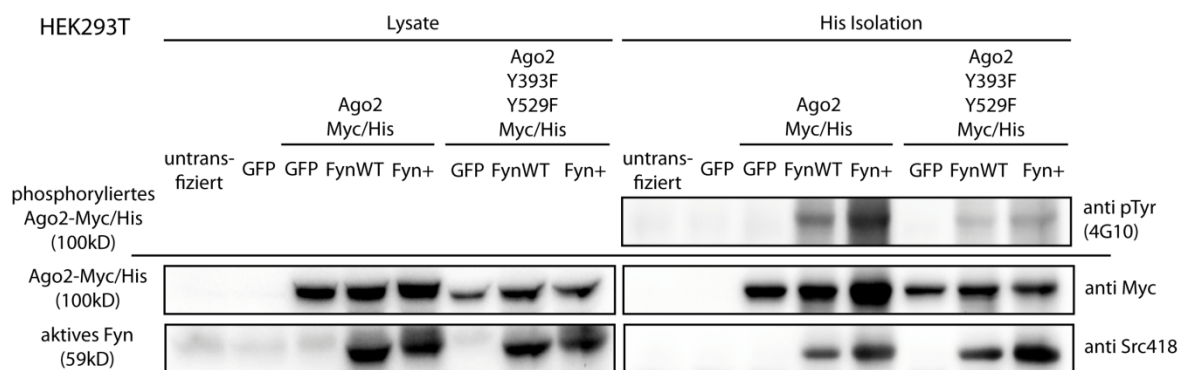


Abbildung 36: Ago2-Myc/His und die Phosphorylierungsmutante Ago2 Y393F/Y529F-Myc/His werden in Antwort auf Fyn-Aktivität phosphoryliert

Es wurden Expressionsvektoren hergestellt, welche Ago2 sowie die Phosphorylierungsmutante Ago2-Y393F/Y529F assoziiert an einen Myc/His-getaggt überexprimieren. Diese wurden zusammen mit GFP, FynWT oder Fyn+ in HEK293T Zellen transfiziert und anschließend über eine Kobalt-basierte His-Isolation aufgereinigt. Der Western Blot wurde mit Antikörpern gegen Tyrosin-phosphorylierte Proteine, Myc-Tag und aktives Fyn (Src418) durchgeführt. Lysate entsprechen 2,5% der in der IP eingesetzten Proteinlysate. Die horizontale Linie trennt zwei Blots mit gleichen Proben.

Abbildung 36 zeigt das Ergebnis der His-Isolation aus Ago2- bzw. Ago2-Y393F/Y529F-Myc/His überexprimierenden HEK293T Zellen zur Analyse der Tyrosin-Phosphorylierung innerhalb der Ago2 Sequenz. Links sind die Gesamtzelllysate zur Untersuchung der Transfektionseffizienz und rechts sind die Eluate der His-Isolation gezeigt. In der ersten Zeile der His-Isolation ist mithilfe eines Antikörpers, welcher Tyrosin-phosphorylierte Proteine erkennt, gezeigt, dass Ago2-Myc/His sowie Ago2-Y393F/Y529F-Myc/His Proteine in Abhängigkeit der Fyn-Aktivität Tyrosin-phosphoryliert werden. Die Fyn-Aktivität wird durch das Signal des Src418 Antikörpers verdeutlicht. Es erscheint, dass die Doppelmutante weniger phosphoryliert wird, als Wildtyp-Ago2-Myc/His. Allerdings bestätigt sich diese Vermutung nicht, wenn man die Gesamtmenge an Ago2-Myc/His bzw. Ago2-Y393F/Y529F-Myc/His Proteinen betrachtet, was in der zweiten Zeile, in welcher gegen den Myc-Tag geblottet wurde, zu erkennen ist. Es wird deutlich, dass in den IPs aus Ago2-Y393F/Y529F-Myc/His überexprimierenden Zellen weniger His-getagte Proteine aufgereinigt werden, als aus den Ago2-Myc/His überexprimierenden Zellen. Ein Grund hierfür ist die bereits geringere Transfektionseffizienz der Ago2-Y393F/Y529F-Myc/His Plasmide, welche in den Spalten der Lysate (links) zu erkennen ist.

Dementsprechend wird die Doppelmutante Ago2-Y393F/Y529F-Myc/His nicht weniger von Fyn phosphoryliert als Wildtyp Ago2-Myc/His.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass Ago2 von der Tyrosin-Kinase Fyn phosphoryliert wird. Die genaue Phosphorylierungsstelle innerhalb der Ago2-Sequenz konnte nicht identifiziert werden. Die beiden Tyrosine Y393 und Y529, welche in der Studie von Rüdell et al. aus 2011 als phosphoryliert beschrieben wurden (Rüdell et al., 2011), scheinen nicht das Hauptziel der Fyn-Kinase zu sein. Es kann mit den durchgeführten Experimenten nicht ausgeschlossen werden, dass diese beiden Aminosäuren von Fyn phosphoryliert werden, allerdings konnte gesichert bewiesen werden, dass noch weitere Tyrosine innerhalb der Ago2-Sequenz von Fyn phosphoryliert werden müssen. Die genaue Position dieser Tyrosine konnte allerdings im Rahmen dieser Arbeit nicht genauer identifiziert werden.

Es wurde in der Vergangenheit gezeigt, dass die Phosphorylierung des Tyrosins an der Position Y529 die Bindung zur kleinen RNA beeinflusst (Rüdell et al., 2011). Da gezeigt werden konnte, dass Ago2 ein Zielprotein der Fyn-Kinase ist, sollte untersucht werden, ob die Fyn-abhängige Phosphorylierung möglicherweise die Bindung der sncRNA715 zu Ago2 beeinflusst.

4.1.8 Hat die Fyn-abhängige Phosphorylierung von Ago2 einen Einfluss auf die Bindung zur sncRNA 715?

Um die eventuell Fyn-abhängige Interaktion von sncRNA715 mit Ago2 zu untersuchen, wurden HEK293T Zellen mit FLAG/HA-Ago2 oder GFP und GFP, FynWT oder Fyn+ cotransfiziert. Anschließend wurde eine FLAG-IP durchgeführt, synthetische sncRNA715 wurde *in vitro* auf die gebundenen Ago2-Proteine inkubiert, extrahiert und anschließend mittels RT- und qPCR analysiert.

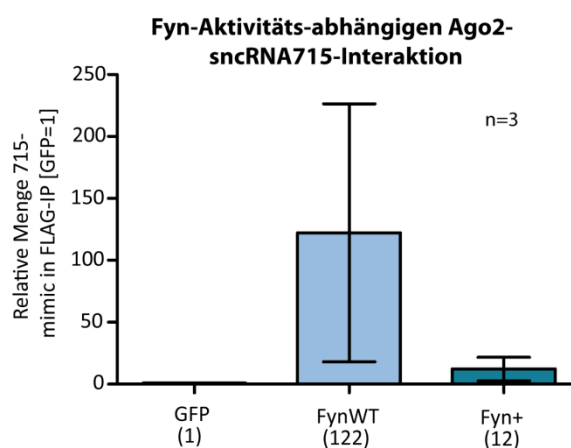


Abbildung 37: *In vitro* Bindungsversuch zur Fyn-Aktivitäts-abhängigen Ago2-sncRNA715-Interaktion

Es wurden FLAG-IPs aus FLAG/HA-Ago2 und GFP oder FynWT oder Fyn+ cotransfizierten HEK293T Zellen durchgeführt und die gebundenen Proteine wurden mit synthetischer sncRNA715 (715-mimic) inkubiert. Die assoziierten RNAs wurden extrahiert und anschließend mittels qualitativer qPCR auf die absolute Menge an sncRNA715 untersucht. Es wurde der Mittelwert aus 3 Experimenten (n=3) +/- SEM aufgetragen.

Es wurde in einem *in vitro* Bindungsversuch untersucht, ob die Interaktion zwischen Ago2 und sncRNA715, welche in Abbildung 30 gezeigt werden konnte, durch Fyn-abhängige Phosphorylierung von Ago2 beeinflusst werden kann. Während des Experiments wurden FLAG/HA-Ago2-Proteine mittels FLAG-IP aufgereinigt und anschließend wurde die synthetische sncRNA715 (715-mimic) darauf inkubiert. Es wurden parallel zur RNA Analyse Western Blots der IPs auf Phosphorylierung der FLAG/HA-Ago2-Proteine durchgeführt und nur die Experimente, in welchen FLAG/HA-Ago2 eindeutig durch FynWT bzw. Fyn+ Tyrosin-phosphoryliert wurden, wurden zur Untersuchung der gebundenen sncRNA715 verwendet. Die RNA wurde aus dem IP-Eluat extrahiert und auf die Menge an sncRNA715 mittels qPCR und absoluter Quantifizierung analysiert. Um die unterschiedlichen Experimente besser vergleichen zu können, wurden jeweils die Verhältnisse der Menge an sncRNA715 im GFP Ansatz zu den FynWT bzw. Fyn+ Ansätzen gebildet, der Mittelwert berechnet und gegeneinander aufgetragen (Abbildung 37). Es wurden drei voneinander unabhängige Experimente gleicher Art durchgeführt und es konnten folgende Mittelwerte der an FLAG/HA-Ago2-gebundenen relativen sncRNA715-Menge berechnet werden. Für GFP wurde der Wert auf 1 gesetzt, bei FynWT wurde ein Wert von 122,3 +/- 104, bei Fyn+ ein Wert von 12,3 +/- 9,4 und für die Kontrolle (K-IP) ein Wert von 0,16 +/- 0,16 errechnet. Es erscheint im ersten Eindruck, dass deutlich mehr sncRNA715 aus FynWT und etwas mehr sncRNA715 aus Fyn+ transfizierten Zellen an FLAG/HA-Ago2 bindet. Wenn man allerdings die jeweilige Standardabweichungen des Mittelwertes (SEM) betrachtet, ist zu erkennen, dass kein Unterschied in der jeweiligen sncRNA715 Menge zwischen den Konditionen zu detektieren ist. Also scheint die Bindung zwischen Ago2 und sncRNA715 nicht durch die Fyn-abhängige Phosphorylierung beeinflusst zu werden. Es wurden extrem hohe Variationen zwischen den einzelnen Experimenten gemessen (zu erkennen an dem sehr hohen SEM). Möglicherweise bindet die synthetische sncRNA715 unspezifisch an Proteinkomplexe, wobei experimentelle Schwankungen entstehen, die in hohen Variationen der endgültigen Ergebnisse resultieren. Außerdem ist es möglich, dass kleinste Ungenauigkeiten während der Erstellung der Standardkurve zu großen Schwankungen in der kalkulierten absoluten sncRNA715-Menge führen, wodurch die weiteren Berechnungen fehlerhaft sein könnten.

Abschließend kann festgehalten werden, dass Oligodendrozyten Argonaut-Proteine exprimieren und Ago2-Proteine Teil des hnRNP A2 Transport-Granulas sind. Möglicherweise spielen diese eine Rolle während der sncRNA715-abhängigen translationalen Inhibition von *Mbp* mRNA während des Transports in die Zellperipherie. Ago2 interagiert spezifisch mit hnRNP A2, *Mbp* mRNA und sncRNA715 und wird von der Src-Kinase Fyn phosphoryliert. Die genaue Phosphorylierungsstelle konnte nicht identifiziert werden und es konnten keine Hinweise darauf gefunden werden, dass die Tyrosin-Phosphorylierung einen Einfluss auf die Bindung zur sncRNA715 ausübt. Es scheint, dass die Bindung von sncRNA715 an Ago2 nicht durch die Phosphorylierung aufgehoben wird.

4.2 SncRNA715 in Schwann Zellen

Translationale Regulation von mRNAs durch kleine RNAs während verschiedener Zellprozesse bzw. in unterschiedlichen Differenzierungsstadien scheint ein weit verbreiteter Mechanismus in vielen unterschiedlichen Zelltypen zu sein (Carthew, 2006). In diesem Zusammenhang konnten viele kleine regulatorische RNAs und deren Ziele identifiziert werden. Ein Beispiel hierfür ist die kleine nicht-codierende RNA 715 (sncRNA715). Sie spielt eine entscheidende Rolle bei der translationalen Regulation von *Mbp* mRNA in Oligodendrozyten während des Transports der mRNA zur axo-glialen

Kontaktstelle, an welcher die lokale Translation von *Mbp* als Antwort auf axonale Signale stattfinden kann (Müller et al., 2013; Bauer et al., 2012). In Schwann Zellen, den myelinisierenden Zellen des PNS, konnte *Mbp* mRNA auch in den peripheren Ausläufern der Zellen nachgewiesen werden, wobei lokale Translation und translationale Repression vermutet werden (Trapp et al., 1987). Da MBPs im ZNS und PNS homolog sind (Mentaberry et al., 1986), liegt die Vermutung nahe, dass sie ähnlichen Regulationsmechanismen unterliegen. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob *Mbp* mRNA in Schwann Zellen translational reprimiert wird und wenn ja, ob sncRNA715 eine Rolle während dieser Regulation spielen könnte.

4.2.1 Translationale Repression von *Mbp* in der Schwann Zelllinie IMS32

Zur Untersuchung der MBP Expression in Schwann Zellen wurden initiale Experimente in der spontan immortalisierten murinen Schwann Zelllinie IMS32 durchgeführt. Es wurde untersucht, ob diese Zellen *Mbp* mRNAs sowie MBP Proteine exprimieren.

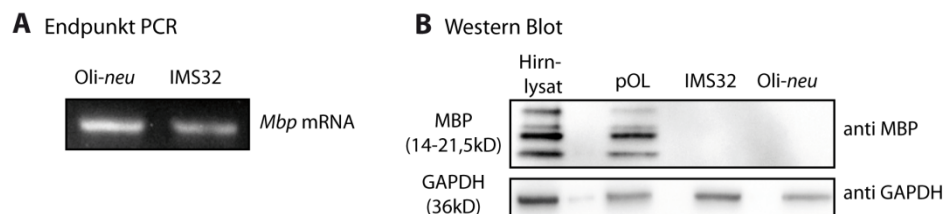


Abbildung 38: IMS32 Zellen exprimieren *Mbp* mRNA aber kein Protein

A: RT-PCR auf IMS32 und Oli-*neu* Gesamtzell-RNA. Es wurden spezifische Primer für *Mbp* mRNA verwendet und das PCR-Produkt wurde über ein 4%iges Agarosegel aufgetrennt und analysiert. Das amplifizierte Fragment besitzt eine Größe von 88nt. In Oli-*neu* und IMS32 Zellen wird das gleiche Produkt amplifiziert. (Die RT-PCR wurde von Nina Hochhaus durchgeführt).

B: Western Blot auf Gesamthirnlysate einer 18 Tage alten Maus, primären Oligodendrozyten (7DIV), IMS32 und Oli-*neu* Zellen. Es wurden Antikörper gegen MBP und GAPDH verwendet.

Es wurde Gesamtzell-RNA aus Oli-*neu* Zellen und IMS32 Zellen extrahiert und auf die Expression von *Mbp* mRNA mittels RT-PCR untersucht. Abbildung 38A zeigt, dass in IMS32 *Mbp* mRNA exprimiert wird. Oli-*neu* RNA diente als Positivkontrolle (Die RT-PCR wurde von Nina Hochhaus durchgeführt). Die Zellen wurden außerdem auf die Expression von MBP Protein mittels Western Blot untersucht (siehe Abbildung 38B). Als Positivkontrolle wurde ein Gesamtzelllysate des Gehirns einer 18 Tage alten Maus sowie ein Zelllysate aus primären Oligodendrozyten nach sieben Tagen *in vitro* verwendet (zu erkennen in Spalte 1 und 2). Die Spalten 3 und 4 zeigen Lysate aus IMS32 Zellen und Oli-*neu* Zellen. Es wird deutlich, dass diese beiden Zelllinien kein MBP Protein bilden. Für die oligodendrogliale Vorläuferzelllinie wurde dies bereits früher gezeigt, da hier MBP im Vorläuferstadium nur als mRNA exprimiert wird, welche translational gehemmt vorliegt (Pereira et al., 2011). Auch für die Schwann Zelllinie IMS32 kann kein Signal für MBP Proteine im Western Blot detektiert werden. GAPDH diente als Ladekontrolle.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Schwann Zelllinie IMS32 die mRNA für *Mbp* exprimiert, allerdings kann kein Protein detektiert werden. Dies weist möglicherweise darauf hin, dass *Mbp* in Schwann Zellen ebenfalls im frühen Entwicklungsstadium bzw. vor der

Myelinisierung translational reprimiert vorliegt. Für Oligodendrozyten konnte dies bereits gezeigt werden, wobei die kleine nicht-codierende RNA 715 als translationaler Regulator der *Mbp* mRNA identifiziert wurde (Bauer et al., 2012). Im Folgenden sollte nun untersucht werden, ob die *sncRNA715* in Schwann Zellen exprimiert wird und möglicherweise für die translationale Repression der *Mbp* mRNA verantwortlich ist.

4.2.2 Expression von *sncRNA715* in der Schwann Zelllinie IMS32 und in primären Schwann Zellen

Es wurde die Gesamtzell-RNA aus *Oli-neu* Zellen und IMS32 Zellen sowie aus unreifen, proliferierenden primären Schwann Zellen (pSC) extrahiert und mittels RT-PCR bzw. Northern Blot Analysen auf die Expression der *sncRNA715* untersucht. (Die RT-PCR in Abbildung 39A wurde von Nina Hochhaus durchgeführt).

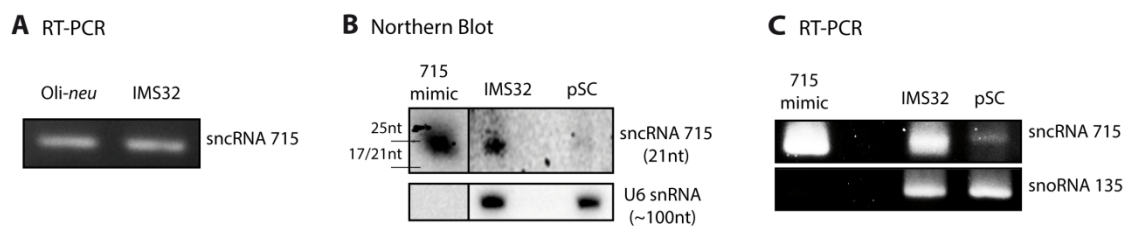


Abbildung 39: IMS32 Zellen exprimieren *sncRNA715*

A: RT-PCR der *sncRNA715* auf Gesamtzell-RNA aus *Oli-neu* und IMS32 Zellen. Es wurde ein spezifischer Primer Assay verwendet, welcher nur *sncRNA715* amplifiziert.

B: Northern Blot auf Gesamtzell-RNA aus IMS32 Zellen und primären undifferenzierten Schwann Zellen. 715-mimic entspricht der synthetischen *sncRNA715* Sequenz und wurde als Positivkontrolle verwendet. SnRNA U6 wurde als Ladekontrolle verwendet.

C: RT-PCR der *sncRNA715* und *snoRNA135* als Ladekontrolle auf IMS32 Zellen und undifferenzierten primären Schwann Zellen. 715-mimic wurde als Positivkontrolle verwendet.

Es wird in Abbildung 39 deutlich, dass *sncRNA715* in IMS32 Zellen und primären Schwann Zellen nachgewiesen werden kann. In (A) ist die RT-PCR gezeigt, in welcher als Positivkontrolle *Oli-neu* RNA verwendet wurde. Es ist zu erkennen, dass die hier amplifizierten Produkte in der Größe übereinstimmen, wodurch anzunehmen ist, dass die in IMS32 Zellen exprimierte *sncRNA715* der in *Oli-neu* entspricht. Die endogene Expression der *sncRNA715* kann durch einen Northern Blot auf IMS32 Zellen und primäre Schwann Zellen gezeigt werden (Abbildung 39B). Als Positivkontrolle wurde die synthetische 21 Nukleotid-lange *sncRNA715* (715-mimic) verwendet und als Ladekontrolle wurde die Membran mit einer LNA-Sonde gegen spliceosomal U6 RNA (U6 snRNA) inkubiert, welche eine Bande bei etwa 100nt hervorruft und nicht in der Spalte der 715-mimic detektierbar ist, da hier nur die synthetische *sncRNA715* aufgetragen wurde. *SncRNA715* kann mit einer spezifischen Digoxigenin-gelabelten LNA-Sonde in der Gesamt-RNA aus IMS32 Zellen bei etwa 20nt detektiert werden. Die Analyse der RNA aus unreifen primären Schwann Zellen ergibt eine schwächere Bande

im Vergleich zur Schwann Zelllinie IMS32 bei gleicher Menge an aufgetragener RNA (zu erkennen an der Bande für U6 snRNA). Die geringere Menge an sncRNA715 in primären Schwann Zellen konnte durch RT-PCRs auf cDNA aus primären undifferenzierten Schwann Zellen und IMS32 verifiziert werden (Abbildung 39C).

Gründe für die deutlich schwächere Bande in primären Schwann Zellen könnten sein, dass die Schwann Zelllinie IMS32 mehr *Mbp* mRNA enthält als die primären undifferenzierten Schwann Zellen. Diese muss im Vorläuferstadium translational reprimiert werden, wobei die sncRNA715 eine entscheidende Rolle spielt. Ein Vergleich der Expressionsmengen an *Mbp* mRNA wurde allerdings innerhalb dieser Studie nicht durchgeführt. Des Weiteren ist möglich, dass primäre Schwann Zellen in nicht-differenzierenden Kondition bereits etwas differenzierter sind als IMS32 Zellen und damit bereits mehr *Mbp* mRNA und weniger sncRNA715 exprimieren.

4.2.3 Differenzierung von primären Schwann Zellen *in vitro*

Primäre Schwann Zellen wurden aus den Ischiasnerven von drei Tage alten Wistar Ratten extrahiert und zu Beginn in Expansionsmedium kultiviert, in welchem sie ihre Proliferationsfähigkeit beibehalten. Nach Erreichen von 100%iger Konfluenz wurde das Expansionsmedium gegen definiertes Medium nach Arthur-Farraj et al. von 2011 ausgetauscht, um die Differenzierung in myelinisierende Schwann Zellen zu ermöglichen (Arthur-Farraj et al., 2011). In diesem Medium stoppt die Proliferation und die Differenzierung kann durch Zugabe von NRG1 und dbcAMP eingeleitet werden (Arthur-Farraj et al., 2011). Das Differenzierungsmedium wurde je zweimal für 48h appliziert und anschließend wurde mittels Immunzytochemie gegen den Schwann Zell-Marker S100 gefärbt und mit Antikörpern gegen MBP der Differenzierungsstatus untersucht.

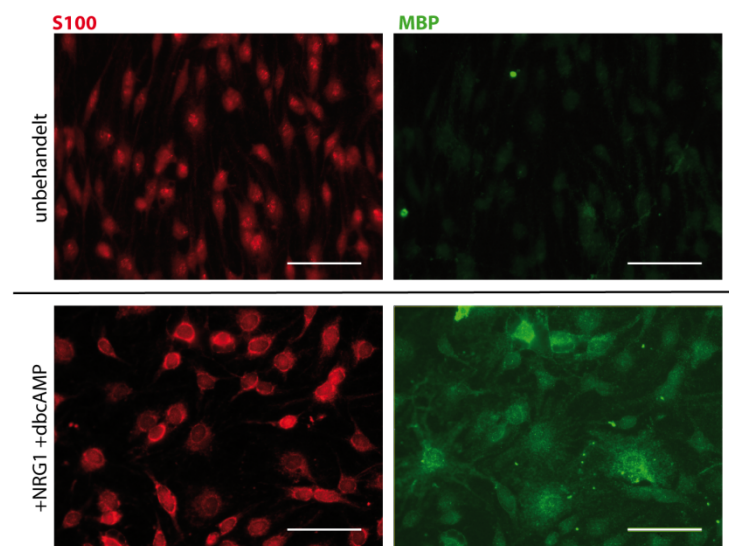


Abbildung 40: Differenzierung von primären Schwann Zellen *in vitro*

Primäre Schwann Zellen wurden zum einen in undifferenzierenden Konditionen (unbehandelt) und zum anderen in differenzierenden Konditionen (NRG1+dbcAMP) kultiviert, fixiert und gegen S100 als Schwann Zellmarker und MBP als Differenzierungsmarker gefärbt. Die Behandlung der primären Schwann Zellen mit NRG1 und dbcAMP resultiert in der MBP Synthese in den Zellen. Der Maßstabsbalken entspricht 50µm.

Abbildung 40 zeigt die immunzytochemische Analyse von unbehandelten und differenzierten (NRG1+dbcAMP) primären Schwann Zellen. S100 gilt als Marker für Schwann Zellen unabhängig des Differenzierungsstadiums und zeigt in beiden Konditionen eine deutlich positive Färbung. Die Antigenfärbung des Myelin Basischen Proteins (MBP) zeigt im undifferenzierten Stadium (unbehandelt) keine Immunreaktion, allerdings können nach Behandlung mit NRG1 und dbcAMP eine Vielzahl MBP-positiver Schwann Zellen identifiziert werden.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Behandlung mit NRG1 und dbcAMP die Synthese von MBP induziert. Es können somit unterschiedliche Stadien von primären Schwann Zellen *in vitro* hergestellt werden, zum einen undifferenzierte und zum anderen differenzierte, MBP positive Schwann Zellen.

Im Folgenden sollte die differenzielle Expression der sncRNA715 in den unterschiedlichen Stadien der Schwann Zell-Differenzierung untersucht werden.

4.2.4 Regulation der sncRNA 715 in differenzierten Schwann Zellen *in vitro*

Es wurden primäre Schwann Zellen hergestellt und im undifferenzierten Stadium kultiviert oder mittels NRG1 und dbcAMP Behandlung in MBP-positive Schwann Zellen differenziert. Zum einen wurde die Gesamtzell-RNA extrahiert und auf *Mbp* mRNA und sncRNA715 bzw. *G6pdh* mRNA und snoRNA135 als Ladekontrollen getestet. Zum anderen wurden Western Blots gegen MBP, CNP und GAPDH als Ladekontrolle durchgeführt.

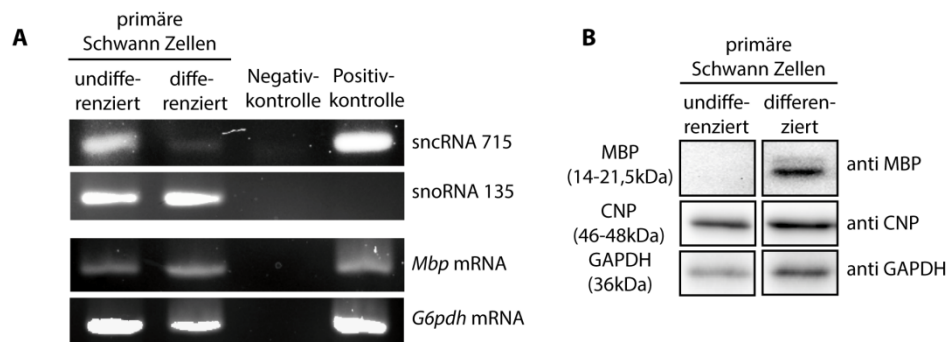


Abbildung 41: Expression der sncRNA715 in differenzierenden primären Schwann Zellen

A: Undifferenzierte und differenzierte Schwann Zellen wurden mittels RT-PCR auf die Expression von *Mbp* mRNA und sncRNA715 getestet. SnoRNA135 sowie *G6pdh* mRNA wurden jeweils als Ladekontrolle verwendet. In differenzierten Schwann Zellen ist nur wenig sncRNA715 und etwas mehr *Mbp* mRNA im Vergleich zu undifferenzierten Schwann Zellen detektierbar.

B: Western Blot Analyse auf undifferenzierte und differenzierte Schwann Zellen. Es wurden Antikörper gegen MBP und CNP verwendet. GAPDH diente als Ladekontrolle. MBP kann nur in differenzierten Schwann Zellen detektiert werden.

Die Analyse der differenziellen Expression von sncRNA715 in primären Schwann Zellen zeigt in Abbildung 41A, dass undifferenzierte Schwann Zellen sncRNA715 exprimieren, allerdings in differenzierten Schwann Zellen nur noch ein sehr schwaches Signal detektierbar ist. Der Differenzierungsstatus ist in Abbildung 41B gezeigt, in welcher in Lysaten aus differenzierten

Schwann Zellen MBP Protein nachgewiesen werden kann, allerdings undifferenzierte Zellen keine Protein Expression zeigen. *Mbp* mRNA kann in undifferenzierten sowie differenzierten Schwann Zellen detektiert werden, wobei die Expression in differenzierten Zellen gesteigert ist. In differenzierten Schwann Zellen wird MBP Protein gebildet, wobei möglicherweise mehr mRNA benötigt wird. SnRNA135 und *G6pdh* mRNA wurden als Ladekontrollen verwendet.

CNP wird in beiden Stadien der Schwann Zelldifferenzierung exprimiert und kann aus diesem Grund in weiteren Experimenten als Schwann Zell-spezifische Ladekontrolle im Western Blot verwendet werden.

Durch das in Abbildung 41 dargestellte Experiment konnte bewiesen werden, dass sncRNA715 in differenzierten, MBP positiven Schwann Zellen in der Expression herunter reguliert wird.

4.2.5 MBP Proteinmengen lassen sich durch Überexpression der sncRNA715 reduzieren

Bisher konnte gezeigt werden, dass Schwann Zellen die regulatorische sncRNA715 exprimieren und diese während der Differenzierung von Schwann Zellen in MBP-positiven Zellen herunter reguliert wird. In Oligodendrozyten wurde kürzlich der direkte Effekt der sncRNA715 auf *Mbp* mRNA gezeigt, in dem die direkte Bindung von sncRNA715 in der 3'UTR der mRNA nachgewiesen wurden. Außerdem konnte durch Überexpression einer synthetischen sncRNA715 in primären Oligodendrozyten die endogenen MBP Proteinmengen verringert werden (Bauer et al., 2012). Es sollte nun die Frage beantwortet werden, ob auch in Schwann Zellen die sncRNA715 einen regulatorischen Einfluss auf die Translation der *Mbp* mRNA hat. Hierzu wurden primäre Schwann Zellen wie beschrieben differenziert. Nach zweimal zweitägiger Behandlung mit Differenzierungsmedium wurde entweder die synthetische sncRNA715 (715-mimic) oder eine Kontroll-siRNA in den Zellen überexprimiert. Nach Wiederum 48 stündiger Inkubationszeit wurden die Zellen lysiert und auf die Menge an MBP Protein mittels Western Blot getestet.

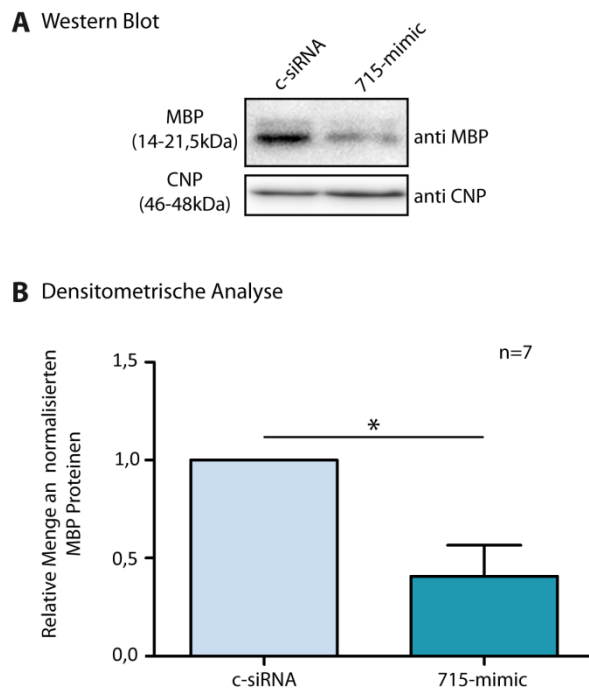


Abbildung 42: Überexpression von sncRNA715 resultiert in verringerten MBP Proteinmengen in differenzierten primären Schwann Zellen

A: Beispiel eines Western Blots von differenzierten Schwann Zellen zum einen transfiziert mit einer Kontroll-siRNA (c-siRNA) und zum anderen mit der synthetischen sncRNA715 (715-mimic). Es wurden Antikörper gegen MBP und CNP als Ladekontrolle verwendet.

B: Densitometrische Auswertung von 7 voneinander unabhängigen Experimenten der gleichen Art wie in A dargestellt. MBP Proteinlevel wurden auf CNP normalisiert, die relative MBP Proteinmenge der c-siRNA wurde auf 1 gesetzt und die MBP Proteinmenge der 715-mimic Transfektion darauf bezogen. Es ergibt sich für 715-mimic ein Wert von 0,408, was einer etwa 60%igen Reduktion der MBP Level entspricht. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung des Mittelwertes (SEM). Es wurde ein Wilcoxon-signed-rank Test durchgeführt (P-Wert= 0,0156).

In Abbildung 42A ist ein repräsentativer Western Blot der MBP Level nach Überexpression von sncRNA715 in primären differenzierten Schwann Zellen gezeigt. Es ist deutlich zu erkennen, dass nach Transfektion der synthetischen sncRNA715 (715-mimic) in differenzierten Schwann Zellen die Proteinmengen von MBP um etwa 60% reduziert sind im Vergleich zu einer Transfektion mit einer Kontroll-siRNA (c-siRNA) (715-mimic: 0,048 +/- 0,157). CNP dient in diesem Fall als Ladekontrolle. Es wurden insgesamt 7 voneinander unabhängige Experimente der gleichen Art durchgeführt und die Western Blots wurden mithilfe der ImageLab Software (Biorad) densitometrisch analysiert. Es wurde die jeweilige Menge an MBP auf CNP normalisiert und die normalisierte MBP Proteinmenge der c-siRNA behandelten Zellen wurde auf 1 gesetzt und mit der normalisierten MBP Proteinmenge der sncRNA715 überexprimierenden Zellen verglichen.

Abschließend kann festgehalten werden, dass *Mbp* in Schwann Zellen, vergleichbar zu Oligodendrozyten, im undifferenzierten Stadium translational reprimiert wird. Außerdem konnte die kleine nicht-codierende RNA 715 in primären Schwann Zellen identifiziert werden. Sie wird in differenzierten Schwann Zellen im Vergleich zu undifferenzierten Zellen weniger stark exprimiert. Die Überexpression der sncRNA715 in MBP positiven, differenzierten Schwann Zellen resultiert in

verminderten MBP Proteinlevel. Zusammenfassend konnten gezeigt werden, dass Schwann Zell-MBP in gleicher Weise translational reguliert wird, wie oligodendrogliales MBP.

5 Diskussion

Die Myelinisierung von Axonen ermöglicht die schnelle und energieeffiziente Weiterleitung von Aktionspotentialen in Nervenzellen. Die Myelinschicht wird im zentralen Nervensystem von Oligodendrozyten und im peripheren Nervensystem von Schwann Zellen durch Bildung von Membranstapeln etabliert, welche sich spiralg um das Axon wickeln. Während der Expansion dieser Membranen müssen innerhalb kürzester Zeit große Mengen Proteine und Lipide gebildet werden. Das zweithäufigste Myelinprotein im ZNS und dritthäufigste im PNS ist das Myelin Basische Protein (MBP). MBP ist entscheidend an der Bildung der Myelinmembran beteiligt, da es mit den negativ geladenen Phospholipiden der Zellmembranen interagiert und damit die Membranen einander annähert und die Myelinschicht kompaktiert (Nave and Werner, 2014). Des Weiteren können MBP-Proteine *in vitro* mit sich selbst interagieren und bilden ein molekulares Sieb, worüber die Protein- und Lipidkomposition der Myelinmembran reguliert wird (Aggarwal et al., 2013, 2011b).

Bereits 1982 konnten Hinweise dafür gefunden werden, dass MBP einem spezialisierten Syntheseweg folgt, da die mRNA nicht nur perinukleär, sondern auch in aufgereinigten Myelinfraktionen nachgewiesen werden konnte (Colman et al., 1982). *Mbp* mRNA bindet im Zellkern an den *trans-acting* Faktor hnRNP A2 über eine spezielle Sequenz in der 3'UTR (*A2 Response Element*, A2RE), wodurch die mRNA zum Transport in die Zellperipherie markiert ist (Munro et al., 1999). Nach Export aus dem Nukleus assoziieren verschiedene weitere Proteine und andere Faktoren, wodurch sich ein Ribonukleoproteinpartikel (RNP) bildet (Carson and Barbarese, 2005; Kosturko et al., 2005, 2006; Raju et al., 2008; Barbarese et al., 1995; Laursen et al., 2011). Dieser wird entlang des Zytoskeletts in die Zellperipherie transportiert, wo in Antwort auf spezifische Signale die Translation gestartet wird (Laursen et al., 2009; Lyons et al., 2009; Brumwell, 2002; White et al., 2008). Innerhalb dieser RNPs befinden sich wahrscheinlich unterschiedliche A2RE-enthaltene mRNAs, welche während des Transports translational inaktiviert und spezifisch räumlich und zeitlich reaktiviert werden müssen (Mouland et al., 2001; Gao et al., 2008). Für *Mbp* mRNA konnte die regulatorische kleine nicht-kodierende RNA 715 (*sncRNA715*) identifiziert werden, welche innerhalb der 3'UTR bindet und die Translation unterdrückt (Bauer et al., 2012). Diese *sncRNA715* wurde zu Beginn als mikroRNA (miRNA) eingeordnet, allerdings stellte sich im Verlauf der Studie heraus, dass sie nicht dem Maturierungsmuster von miRNAs folgt und wurde deswegen als kleine nicht-kodierende RNA bezeichnet. Der Vorläufer dieser 21 Nukleotid-langen RNA befindet sich innerhalb der Sequenz der 45kb rRNA und kann damit in die Klasse der srRNAs eingeordnet werden (*small rDNA-derived RNA*) (Wei et al., 2013). Die Reifung von srRNAs ist unabhängig von dem Enzymkomplex Dicer, allerdings konnte gezeigt werden, dass diese kleinen regulatorischen RNAs in *Arabidopsis thaliana* und *Drosophila melanogaster* mit Proteinen der Argonaut-Familie interagieren (Wei et al., 2013).

In Oligodendrozyten spielt die *sncRNA715* eine entscheidende Rolle während der translationalen Regulation von *Mbp* mRNA, höchstwahrscheinlich während des Transports in die Peripherie, wo die lokale Translation in Antwort auf axonale Signale stattfindet (Müller et al., 2013). Allerdings bleibt bisher unklar, welche weiteren molekularen Faktoren die Repression der Translation vermitteln und wie dies letztendlich auch wieder aufgehoben wird. Argonaut-Proteine bilden zusammen mit kleinen regulatorischen RNAs den Kernkomplex des *microRNA induced silencing complex* (miRISC), welcher zum einen für den Abbau oder zum anderen für die translationale Inhibition der assoziierten mRNA verantwortlich sein kann (Cenik and Zamore, 2011). Letzteres wird wiederum vermittelt durch die Rekrutierung weiterer Faktoren innerhalb des miRISC wie dem GW182-Protein, welches die

ribosomalen Untereinheiten hemmt und damit die Translation der mRNA verhindert (Eulalio et al., 2008).

Die zugrunde liegende Hypothese ist, dass die sncRNA715 mit einem Argonaut-Protein interagiert, damit den miRISC bildet und innerhalb des A2-Granulas die Translation der *Mbp* mRNA verhindert. Wie allerdings wird diese Interaktion reguliert und wie kann die Translation wieder reaktiviert werden?

5.1 Argonaut-Proteine in Oligodendrozyten

Die Expression der Argonaut-Proteine Ago1 bis Ago4 wurde bisher in oligodendroglialen Zellen nicht ausreichend untersucht. Es wurde gezeigt, dass Oligodendrozyten Ago2-Proteine exprimieren und dass die Assemblierung des miRISC während der pathologischen Demyelinisierung des ZNS im EAE Mausmodell gestört ist (Lewkowicz et al., 2015). Die im Laufe der vorliegenden Studie durchgeführte Analyse zur Expression der vier mRNAs der in Säugetieren beschriebenen Argonaut-Proteine zeigt, dass alle vier mRNAs in der oligodendroglialen Vorläuferzelllinie *Oli-neu* und in primären Oligodendrozyten verschiedener Differenzierungsstadien exprimiert werden (siehe Abbildung 22). Außerdem konnten in differenzierenden Oligodendrozyten sowie im optischen Nerven aus Mäusen verschiedenen Alters und Entwicklungsstufen Ago1 und Ago2 auf Proteinebene nachgewiesen werden (siehe Abbildung 24 und Abbildung 25). Damit ist gezeigt, dass Argonaut-Proteine in Oligodendrozyten exprimiert werden und es liegt nahe, dass die miRNA-abhängige translationale Inhibition durch den Ago-enthaltenen miRISC auch in diesen Zellen eine Rolle spielt.

Die zelluläre Lokalisation des Argonaut-Proteins Ago2 wurde mithilfe immunzytochemischer Analysen in primären Oligodendrozyten untersucht. Die Färbungen von endogenen Ago2-Proteinen in oligodendroglialen Zellen zeigen eine granuläre Verteilung im Zellsoma, in den distalen Ausläufern sowie in den Rändern der *in vitro* gebildeten Myelinmembranen (siehe Abbildung 26). Es existieren drei Klassen von zellulären Granulas, Stressgranulas, P-Bodies (*processing bodies*) und RNA-Granulas (Moser and Fritzier, 2010). Sie unterscheiden sich in der jeweiligen Größen-Spanne (Stressgranula: 100-2000nm, P-Bodies: 100-300nm, RNA-Granula: 150-1000nm), wobei kleine Granulas zwischen 100nm und 300nm nicht eindeutig über ihren Durchmesser zugeordnet werden können (Eystathioy et al., 2002; Krichevsky and Kosik, 2001; Anderson and Kedersha, 2009). Stressgranula zeichnen sich durch ihre heterogene Form aus, wobei P-Bodies eher einheitlich geformt sind (Moser and Fritzier, 2010). In allen drei Granula-Typen wird die assoziierte mRNA translational reprimiert und kann in Antwort auf spezifische Signal reaktiviert werden, wobei nur in Stressgranula und RNA-Granula ribosomale Proteine nachgewiesen werden konnten. Dem entgegen stehen P-Bodies, in welchen die mRNA abgebaut wird (Buchan, 2014). Sie enthalten Enzyme, die an Prozessen des Decapping, der Deadenylierung und Degradation beteiligt sind und es können keine ribosomalen Proteine nachgewiesen werden (Sheth and Parker, 2003). Argonaut-Proteine konnten in früheren Studien in P-Bodies detektiert werden, wo sie für translationale Repression bzw. mRNA-Abbau verantwortlich sind (Liu et al., 2005b). Unter zellulären Stressbedingungen lokalisierten Ago-Proteine in HeLa-Zellen innerhalb von Stressgranula. Diese Umlokalisierung von P-bodies in Stressgranula scheint von sncRNAs abhängig zu sein, da in Dicer-knockout Zellen, welche keine reifen miRNAs bilden, Ago-Proteine nicht in Stressgranula nachzuweisen sind (Leung et al., 2006). Da allerdings in den hier durchgeführten Experimenten keine Stresssituation hervorgerufen wurde, kann ausgeschlossen

werden, dass es sich bei den in Abbildung 26 zu erkennenden Strukturen um Stressgranula handelt. Die identifizierten granulären Strukturen innerhalb der oligodendroglialen Ausläufer erinnern durch ihre Lokalisation an bereits bekannte oligodendrogliale hnRNP A2-Granula (vergleiche White et al., 2008) und es konnte eine Interaktion von Ago2 mit hnRNP A2 immunzytochemisch sowie biochemisch nachgewiesen werden (siehe Abbildung 27, Abbildung 28 und Abbildung 29). Dies deutet darauf hin, dass Ago2 möglicherweise an der translationalen Regulation von *Mbp* mRNA während des Transports beteiligt ist.

In einer früheren Studie konnte gezeigt werden, dass in Oligodendrozyten Ago2 mit dem QKI-6 RNA-bindenden Proteinen unter Stressbedingungen in zytoplasmatischen Granula assoziiert und QKI-6 wiederum mit *Mbp* mRNA in Stressgranula der humanen Glioblastoma Zelllinie U343 colokalisiert, wobei eine Beteiligung des miRISC nicht vermutet wird (Wang et al., 2010). Eine direkte Interaktion von Ago2 und *Mbp* mRNA konnte allerdings noch nicht bewiesen werden.

5.1.1 Argonaut-Proteine und der *Mbp* mRNA Lokalisationsweg

Der *Mbp* mRNA Lokalisationsweg ist ein spezialisierter Mechanismus, um die mRNA an ihren Zielort zu transportieren. Innerhalb des Ribonukleoproteinpartikels ist die zu transportierende mRNA translational reprimiert und muss reaktiviert werden, wenn die Zielregion erreicht ist. Für *Mbp* mRNA konnte die sncRNA715 als translationaler Repressor identifiziert werden, allerdings bleibt ungeklärt, wie diese Inhibition vermittelt wird. SncRNA715 interagiert mit hnRNP A2 und scheint damit Teil des A2-Granula zu sein (Bauer et al., 2012). Durch immunzytochemische Untersuchungen in oligodendroglialen Zellen konnte eine partielle Colokalisation von hnRNP A2 und Ago2 gezeigt werden (siehe Abbildung 27 und Abbildung 28). Die beiden Proteine colokalisieren in granulären Strukturen in den Zellausläufern und in den Rändern der *in vitro* gebildeten Myelinmembranen, wodurch die Beteiligung von Ago2 während des Transports von oligodendroglialen mRNAs in die Zellperipherie vermutet werden kann. Ago2 sowie hnRNP A2/B1 konnten bereits unabhängig voneinander innerhalb von oligodendroglialen TIA-1 positiven Stressgranulas detektiert werden (McDonald et al., 2011; Detzer et al., 2011). Da in dem durchgeführten Experiment keine Stresssituation hervorgerufen wurde, kann davon ausgegangen werden, dass die beobachtete Colokalisation der Proteine nicht innerhalb von Stressgranula stattfindet, sondern in anderen zellulären Granula. Der verwendete Antikörper gegen hnRNP A2/B1 erkennt alle vier Isoformen der A2/B1-Proteine, wodurch keine Aussage darüber getroffen werden kann, welche der Isoformen mit Ago2 colokalisiert. HnRNP A2b ist als die vorwiegende zytoplasmatische Isoform beschrieben, welche möglicherweise überwiegend an dem granulären Transport der *Mbp* mRNA beteiligt ist, wobei die Isoform A2 hauptsächlich im Zellkern nachzuweisen sein soll (Han et al., 2010). Auch die durchgeführten Immunpräzipitationsexperimente konnten keinen Nachweis darüber liefern, welche der A2-Isoformen mit Ago2 interagiert (vergleiche Abbildung 29). Es scheint, dass A2 und A2b dimerisieren, da beide Proteine innerhalb einer spezifischen Immunpräzipitation von hnRNP A2b-FLAG detektiert werden können. Damit kann keine der beiden Isoformen als Bindungspartner von Ago2 ausgeschlossen werden.

Die starke Anreicherung der Ago2- und A2-enthaltenen Granula an den Rändern der Myelinmembranen kann darauf zurück geführt werden, dass die RNA-Granula bis zu dieser Position transportiert werden und auf ein Signal „warten“, welches den Granula auflöst und die Translation

startet. Während des Prozesses der Myelinisierung müssen in der Zellperipherie in Antwort auf spezifische Signale hohe Mengen an Myelinproteinen wie MBP gebildet werden. Es erscheint damit zeit- sowie energieeffizient, dass die mRNAs der Myelinproteine in der Peripherie in einem translational reprimierten Zustand zwischen gelagert und erst auf Anforderung translatiert werden.

Durch biochemische Analysen der Interaktion von Ago2 und hnRNP A2 aus transfizierten Zellen konnte die direkte Interaktion der beiden Proteine gezeigt werden (siehe Abbildung 29). Ein endogener Nachweis dieser Interaktion konnte aufgrund der geringen Expressionslevel und nur partiellen Interaktion nicht geliefert werden. Argonaut-Proteine sind an vielen unterschiedlichen zellulären Prozessen beteiligt. Die Differenzierung sowie Proliferation von Oligodendrozyten ist unter anderem stark abhängig von miRNAs (Dugas and Notterpek, 2011). Da miRNAs im Komplex mit Ago-Proteinen den miRISC bilden, welcher die Wirkung der miRNA vermittelt, werden Ago-Proteine höchstwahrscheinlich auch in Oligodendrozyten an diesen Prozessen beteiligt sein. Damit stellt die translationale Regulation von transportierten mRNAs in die Zellperipherie nur einen kleinen Teil der Funktion von Argonaut-Proteinen in Oligodendrozyten dar und die Colokalisation kann nur partiell auftreten.

Die direkte Beteiligung von Ago2 am *Mbp* mRNA Lokalisationsweg konnte durch Immunpräzipitationsexperimente gezeigt werden. Aus mit FLAG/HA-Ago2, MBP14 und sncRNA715 überexprimierenden *Oli-neu* Zellen wurden Ago2-Proteine aufgereinigt und auf Copräzipitation von *Mbp* mRNA und sncRNA715 getestet. *Mbp* mRNA sowie sncRNA715 interagieren spezifisch mit FLAG/HA-Ago2 Proteinen (siehe Abbildung 30).

Die Lokalisation von Ago2 in oligodendroglialen A2-Granula und die Assoziation mit *Mbp* mRNA und sncRNA715 weist auf die Beteiligung von Ago2 im Lokalisationsmechanismus von oligodendroglialen mRNAs hin. Die mRNA muss während des Transports in die Zellperipherie translational inhibiert werden und möglicherweise sind daran Proteine des miRISC, wie GW182, beteiligt. Es bleibt damit zu untersuchen, ob GW182 eine zusätzliche Komponente des A2-Granulas ist. mRNA-Transportgranula enthalten unter anderem Komponenten der Translationsmaschinerie, wie Elongationsfaktoren und ribosomale Untereinheiten (Anderson and Kedersha, 2006). Bildet möglicherweise GW182 eine weitere Komponente des RNA-Granula, so könnte dieses dafür zuständig sein, die ribosomalen Untereinheiten zu blockieren und die Translation zu unterdrücken. Die Wichtigkeit des GW182-Proteins während der translationalen Regulation von mRNAs durch siRNAs respektive miRNAs konnte bisher nur zum einen in den humanen Zelllinien HeLa und HEK293 und zum anderen in *Drosophila melanogaster* gezeigt werden (Liu et al., 2005a; Jakymiw et al., 2005; Rehwinkel et al., 2005).

5.1.2 Ago2 wird von der Src-Kinase Fyn phosphoryliert

Es konnte im Laufe dieser Arbeit gezeigt werden, dass das Argonaut-Protein Ago2 Teil des A2-Granulas ist, in welchem *Mbp* mRNA durch sncRNA75 translational reprimiert zur axo-glialen Kontaktstelle transportiert wird. Erreicht dieser Granula die Zielregion, muss die mRNA translational reaktiviert werden. Wie kann dieser Schritt reguliert werden?

In Oligodendrozyten wird unter anderem durch Interaktion des axonalen Zelladhäsionsmoleküls L1 mit oligodendroglialem F3/Contactin die membranständige Src-Kinase Fyn aktiviert und Komponenten des RNA-Granulas, wie hnRNP A2 und F, phosphoryliert, wodurch der RNA-Granula

dissoziiert und die Translation der *Mbp* mRNA gesteigert wird (White et al., 2008, 2012). Fyn kann des Weiteren über die Interaktion von oligodendroglialen $\alpha 6\beta 1$ -Integrinen mit Laminin2 sowie über elektrische Aktivität des Axons und damit verbundene Glutamat-Freisetzung an der axo-glialen Kontaktstelle aktiviert werden (Cognato et al., 2002; Wake et al., 2011). Die weitere Bildung der Myelinschicht und deren Aufrechterhaltung scheinen außerdem von der Ausschüttung synaptischer Vesikel abzuhängen (Hines et al., 2015). Die Fyn-Kinase ist ein Schlüsselregulator der translationalen Reaktivierung von *Mbp* mRNA an der axo-glialen Kontaktstelle und die Myelinisierung hängt damit stark von der Aktivierung von Fyn durch unterschiedliche axonale Signale ab (Krämer-Albers et al., 2011). Wie allerdings genau wird die Translation reaktiviert? Wie wird die Bindung zum miRISC reguliert? Und löst sich der gesamte Komplex auf oder wird nur die Funktion unterdrückt?

In einer Studie aus 2011 wurde die Phosphorylierung des Argonaut-Proteins Ago2 nachgewiesen. Rüdell und Kollegen konnten zeigen, dass verschiedene Aminosäuren innerhalb der Sequenz phosphoryliert werden und dass speziell die Phosphorylierung des Tyrosins an der Position Y529 in der sncRNA-Bindestasche die Bindung zur kleinen RNA beeinflusst. Durch Nachahmung der Phosphorylierung durch Austausch des Tyrosins gegen ein Glutamat wurde die Bindung zu sncRNAs stark reduziert (Rüdell et al., 2011). Die Phosphorylierung eines weiteren Tyrosins an der Position Y393 stellte sich als regulatorisch für die Interaktion mit dem Enzymkomplex Dicer heraus (Yang et al., 2014). Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Ago2 in Abhängigkeit von der Fyn-Kinase Tyrosin-phosphoryliert wird (siehe Abbildung 32, Abbildung 33 und Abbildung 34), allerdings konnte das genaue Tyrosin innerhalb der Sequenz nicht identifiziert werden. Es konnten über Experimente mit Phosphorylierungsmutanten von FLAG/HA-Ago2 und Ago2-Myc/His Konstrukten die beiden Tyrosine Y393 und Y529 als einzige Ziele der Fyn-Kinase ausgeschlossen werden. Die Mutation der Tyrosine in Phenylalanine verhindert eine Phosphorylierung, allerdings konnte in Anwesenheit der Wildtyp Fyn (FynWT) bzw. der konstitutiv aktiven Fyn-Kinase (Fyn+) eine nahezu gleiche Menge an Tyrosin-phosphorylierten Ago2-Proteinen nachgewiesen werden (siehe Abbildung 35 und Abbildung 36). Durch weitere Analysen, zum Beispiel mittels Massenspektrometrie nach Fyn-Manipulation, gilt es die genauen bzw. weiteren Phosphorylierungsstellen zu identifizieren. In der zugrunde liegenden Studie aus 2011 wurden allerdings keine weiteren Tyrosine als mögliche Phosphorylierungsstellen beschrieben (Rüdell et al., 2011). Dies liegt höchstwahrscheinlich an den experimentellen Gegebenheiten, da in den publizierten Experimenten HEK293 Zellen verwendet wurden, in welchen die endogene Fyn-Aktivität nur sehr gering ist und auch in den hier durchgeführten Analysen nicht nachgewiesen werden konnte (vergleiche Src418-Blot in Abbildung 32 bis Abbildung 36). Es wäre also nötig, die Fyn-Aktivität durch Überexpression von Wildtyp-Fyn oder konstitutiv aktivem Fyn zu erhöhen und damit die Phosphorylierung von Ago2 zu verstärken, damit diese per Massenspektrometrie nachgewiesen werden kann. Es wäre von Interesse die genaue Phosphorylierungsstelle der Fyn-Kinase innerhalb der Ago2-Sequenz zu identifizieren, da anschließend weitere Experimente zur Verifizierung der exakten Funktion dieser Tyrosin-Phosphorylierung durchgeführt werden könnten. Es wurde hier untersucht, ob die Fyn-abhängige Phosphorylierung einen Einfluss auf die Bindung von Ago2 zur sncRNA715 hat, allerdings konnte aufgrund zu starker experimenteller Schwankungen kein signifikanter Effekt gezeigt werden, es ist allerdings eine Tendenz erkennbar, dass die direkte Bindung der sncRNA715 an Ago2 nicht durch Fyn-abhängige Phosphorylierung beeinflusst wird (siehe Abbildung 37). Die Vermutung, dass die Fyn-Kinase das regulatorische Tyrosin Y529 in der MID-Domäne des Ago2-Proteins phosphoryliert, wodurch die Bindung zur sncRNA715 reduziert wird, konnte damit nicht betätigt werden. Dieses

Tyrosin an der Position Y529 befindet sich in nativem Zustand des Proteins innerhalb einer engen Bindungstasche und ist damit möglicherweise nicht leicht zugänglich für die Kinase. Das Tyrosin an der Position Y393 befindet sich in der Linker-Region zwischen der PAZ- und der MID-Domäne und die Phosphorylierung beeinflusst die Bindung zum Enzymkomplex Dicer, wodurch die Reifung von sncRNAs beeinflusst wird (Shen et al., 2013). Wie allerdings genau diese Inhibition der Interaktion stattfindet bleibt unklar. Möglicherweise wird die Konformation von Ago2 so verändert, dass die Interaktion mit Dicer nicht länger möglich ist. Innerhalb der gesamten humanen Ago2-Aminosäuresequenz befinden sich 27 Tyrosine. Welches von diesen durch Fyn phosphoryliert wird, kann ohne weitere Analysen nicht genau definiert werden. Es ist wahrscheinlich, dass die Fyn-abhängige Phosphorylierung die Konformation des Ago2-Proteins verändert und damit die translationale Inhibition aufgehoben wird. Es ist bekannt, dass verschiedene andere Komponenten des RNA-Granulas, wie hnRNP A2 und F, in Antwort auf axonale Signale von Fyn phosphoryliert werden und die Synthese des MBP Proteins gesteigert wird (Müller et al., 2013). Auch Ago2 wird Fyn-abhängig phosphoryliert und durch die abstoßenden Kräfte der negativen Ladungen der phosphorylierten Proteine entfernen sich diese möglicherweise voneinander und der RNA-Granula zerbricht, wodurch die Komponenten frei werden und die mRNA translatiert werden kann. Es wird vermutet, dass noch weitere Komponenten der RISC-Maschinerie, wie GW182, im Granula enthalten und an der translationalen Inhibition beteiligt sind. Auch GW182 wird posttranslational über Phosphorylierung modifiziert (Eystathioy et al., 2002) und es konnte gezeigt werden, dass Phosphorylierung von miRISC-Komponente die Aktivität oder die Bildung von miRNAs reguliert (Ando and Leung, 2013; Wu et al., 2013). Es erscheint wahrscheinlich, dass die Fyn-abhängige Phosphorylierung von Granula- und miRISC-Komponenten den Zerfall des Granulas hervorruft und damit ein Startsignal zu Translation der transportierten mRNA darstellt. Es gilt in zukünftigen Studien diese Vermutung zu untersuchen und zu analysieren, wie die genaue Reaktivierung der Translation stattfindet. Es bleibt bisher ungeklärt, ob sich auch der gesamte miRISC auflöst, oder ob dieser sich nur von der mRNA ablöst aber funktional vollständig bleibt. Dies könnte durch Immunpräzipitationsexperimente unter Manipulation der Fyn-Kinase stattfinden, wobei die Assoziation verschiedenster Proteine an Ago2 sowie die Interaktion nach Fyn-Überexpression analysiert werden können. Des Weiteren besteht die Frage, ob und wie der miRISC bzw. die einzelnen Komponenten anschließend wieder aus der Zellperipherie abtransportiert werden oder ob diese an Ort und Stelle abgebaut werden. Es bleibt bisher ungeklärt, ob ein bestimmter RISC-Komplex immer nur eine sncRNA bindet und damit nur für die translationale Regulation einer spezifischen mRNA zuständig ist, oder ob die assoziierten kleinen RNAs ausgetauscht werden, je nach zellulärer Lokalisation und Situation.

5.1.3 Derepression der miRNA-abhängigen translationalen Regulation von mRNAs

Während der miRNA-abhängigen translationalen Repression von mRNAs bindet der miRISC innerhalb der 3'UTR der mRNA und rekrutiert weitere Proteine, welche wiederum Komponenten der Translationsmaschinerie inhibieren (Ender and Meister, 2010). Es bleibt allerdings unklar, wie die Translation wieder reaktiviert wird. In HEK293 und HeLa sowie in Immunzellen ist das APOBEC3G Protein (*apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3G*, A3G) in die Prozesse der Derepression involviert. Es konnte gezeigt werden, dass A3G mit Komponenten des miRISC, wie Ago2 und GW182, interagiert und die Rekrutierung der mRNA in Richtung Polysomen fördert. Es wird vermutet, dass die Interaktion von Ago2 mit A3G verhindert, dass die mRNA in P-Bodies eingebaut

wird und damit die Translation nicht inhibiert wird (Huang et al., 2007). Ob allerdings die direkte miRNA-mRNA-Bindung von der Assoziation der beiden Proteine beeinflusst wird, bleibt unklar. Des Weiteren wird nicht deutlich, ob die Translation nach einer Inaktivierung durch A3G-Ago2-Interaktion reaktiviert werden kann, oder ob die Translation erst gar nicht reprimiert wird. Die Expression des A3G-Proteins ist abhängig von Interferon-(IFN) α/β (Huang et al., 2007) und die Erhöhung von IFN α/β führt möglicherweise zu einer reduzierten translationalen Repression durch miRNAs. Durch IFN α/β abhängige Steigerung der Expression von A3G könnte die Interaktion von Ago2 mit A3G auch in Oligodendrozyten zunehmen und damit die translationale Repression von *Mbp* mRNA aufgehoben werden, wodurch die Myelinbildung gesteigert wird. Dieser Spekulation liegt allerdings zugrunde, dass A3G von Oligodendrozyten exprimiert wird und an der axo-glialen Kontaktstelle auf Ago2 trifft. Dies müsste in zukünftigen Expressionsanalysen in oligodendroglialen Zellen untersucht werden.

In einer weiteren Studie aus 2007 konnte gezeigt werden, dass die miRNA-abhängige Translation von mRNAs durch Assoziation von RNA-bindenden Proteinen in konservierten Regionen innerhalb der mRNA reguliert werden kann. Die Expression des Proteins Dnd 1 (*dead end 1*) innerhalb einer Uridin-reichen Region der mRNA verhindert die Bindung der kleinen RNA und wirkt damit der translationalen Inhibition entgegen (Kedde et al., 2007). Ob allerdings Dnd 1 in Oligodendrozyten exprimiert wird und an der translationalen Regulation beteiligt ist, wurde bislang nicht analysiert. *Mbp* mRNA weist innerhalb der 3'UTR drei dieser Uridin-reichen Regionen auf, welche die RNA-Transportsequenz (RTS) flankieren. Innerhalb dieser RTS bindet hnRNP A2 die mRNA und sorgt für den Transport in die Zellperipherie (Ainger et al., 1997). hnRNP A2 und Ago2 interagieren mit *Mbp* mRNA innerhalb des RNA-Granulas, in welchem sie nah beieinander liegen müssen. Stellt Dnd 1 eine Komponente dar, die die translationale Repression verhindert oder auflöst, so erscheint es sinnvoll, dass Dnd 1 innerhalb der Uridin-reichen Region neben dem A2RE bindet und damit die Assoziation des A2-Granulas räumlich verhindert bzw. stört und die Translation ermöglicht.

5.1.4 Deregulation von Ago2 Proteinen verursacht schwerwiegende Erkrankungen

Argonaut-Proteine spielen in vielen unterschiedlichen Spezies eine entscheidende Rolle während der Entwicklung und Reifung verschiedenster Zellen. Es ist naheliegend, dass diese Proteine in ihrer Funktion genauestens reguliert werden müssen, damit diese Prozesse korrekt ablaufen können. Treten Defekte in der Regulation der Argonaut-Proteine auf, so kommt es zu erheblichen Störungen der posttranskriptionellen Genregulation. In myeloiden Leukämiezellen zum Beispiel spielt Ago2 eine Rolle während der Determinierung der Zellen und die Störung resultiert in schwerwiegenden Folgen im Verlauf der Krankheit (Iosue et al., 2013). Auch in der neurodegenerativen Erkrankung Chorea Huntington konnte die Beteiligung von Ago2 gezeigt werden. Chorea Huntington ist eine genetische Erkrankung, in welcher Protein-Aggregate innerhalb von Neuronen des Striatum und des Cortex detektiert werden können. Diese Aggregate enthalten Fragmente des Huntingtin-Proteins (Epplen et al., 2000). Ago2 assoziiert mit diesem Huntingtin-Protein und beide lokalisieren innerhalb der Zelle in P-Bodies. Während des Krankheitsverlaufes ist die Integrität und Funktion der P-Bodies in Neuronen gestört und es kommt damit zu erheblichen Einschränkungen der posttranskriptionellen Genregulation von dendritisch lokalisierten mRNAs (Savas et al., 2010). Untersuchungen an konditionellen Knockout-Mäusen der vier verschiedenen Argonaut-Proteine konnten zeigen, dass nur der Verlust von Ago2 zu embryonaler Letalität führt (Wang et al., 2012).

Die Interaktion von Ago2 mit dem *Mbp* mRNA Lokalisationsweg über die Bindung an die kleine nicht-kodierende RNA 715 muss auch genauestens reguliert werden, da kleinste Abweichungen einen erheblichen Einfluss auf die Entwicklung der Myelinschicht haben könnten. Es wird vermutet, dass die Ago2- und sncRNA715-abhängige translationale Regulation der *Mbp* mRNA an der axo-glialen Kontaktstelle ganz spezifisch deaktiviert werden muss, um die lokale Translation von *Mbp* und damit die räumlich und zeitlich spezifisch regulierte Myelinisierung zu starten. Diese genaue Regulation scheint essentiell zu sein, da die Bildung der Myelinschicht in Antwort auf spezifische Signale schnell und energieeffizient erfolgen muss, um auf mögliche Änderungen reagieren zu können. In einer eleganten Studie aus 2014 konnte gezeigt werden, dass neuronale Aktivität die Bildung des Myelins *in vivo* beeinflusst und Verhaltensänderungen hervorruft. Die Autoren schlussfolgerten, dass adaptive Änderungen der myelinbildenden Zellen eine Form der verhaltensrelevanten neuronalen Plastizität repräsentieren. Dies zeigt, dass die Plastizität der Myelinschicht eine entscheidende Rolle bei adaptiven und neuronalen Funktionen spielt und damit genauestens reguliert werden muss (Gibson et al., 2014). Da die Fyn-Kinase durch neuronale Aktivität beeinflusst wird (Wake et al., 2011), ist es wahrscheinlich, dass auch die Anpassung der Myelinisierung und damit verbundene Verhaltensänderungen in Antwort auf neuronale Aktivität über die lokale Aktivierung der Fyn-Kinase und daraus resultierende Steigerung der MBP-Synthese resultiert. Werden im *Mbp* mRNA-Transportkomplex Komponenten nicht korrekt exprimiert oder in ihrer Aktivität falsch reguliert, so kann es zu erheblichen Schäden kommen. Eines der Granula-Komponenten, hnRNP F, muss in korrekten Mengen exprimiert werden um die MBP-Synthese aufrechtzuerhalten. Überexpression sowie Herunterregulation durch siRNA-Behandlungen führt in oligodendroglialen Zellen zu einer verminderten MBP-Synthese (White et al., 2012). Damit ist gezeigt, dass die Komponenten korrekt ausbalanciert exprimiert werden müssen und es kann vermutet werden, dass auch die Expression des Ago2-Proteins innerhalb des Granulas ein spezifisches Level erreichen muss und nicht überschreiten sollte, um die exakte Funktion zu gewährleisten. Die Translation des Myelinproteins MBP ist ein entscheidender Schlüsselpunkt der Initiierung der Myelinbildung, allerdings ist diese nicht der einzige Regulationsmechanismus. Es ist möglich, dass Unregelmäßigkeiten in der Ago-Expression durch andere Mechanismen ausgeglichen werden. Außerdem könnten die anderen Ago-Proteine möglicherweise die Funktion von Ago2 kompensieren, da diese auch einen funktionalen RISC bilden können. Die natürliche Mausmutante *shiverer*, in welcher keine MBP Proteine gebildet werden können, zeigt deutlich, wie essentielle die Synthese der MBP Proteine im ZNS für die Bildung der Myelinschicht benötigt wird, da hier kein funktionales Myelin gebildet werden kann und die Mäuse erhebliche phänotypische Defekte aufweisen (Nave, 1994). Damit muss die *Mbp*-Translation genauestens reguliert und balanciert werden, damit eine funktionale Myelinschicht gebildet werden kann.

5.2 MiRNA-abhängige translationale Regulation im peripheren Nervensystem

Die Rolle der translationalen Regulation durch sncRNAs im zentralen Nervensystem wurde bisher umfangreich untersucht sowie diskutiert und es konnte gezeigt werden, dass kleine regulatorische RNAs eine entscheidende Rollen während allen zellulären Prozessen spielen (Lau et al., 2008; Krichevsky et al., 2004). Auch im peripheren Nervensystem hängt die Entwicklung und Reifung unablässig von kleinen regulatorischen RNAs ab. Eines der Haupt-Myelinproteine PMP22 wird durch die miRNA-29a reguliert. Außerdem kontrolliert miRNA-138 den Transkriptionsfaktor Sox2, welcher in unreifen Schwann Zellen exprimiert wird und während der Differenzierung in myelinisierende

Schwann Zellen unterdrückt wird (Yun et al., 2010; Verrier et al., 2009). Die genetische Deletion des sncRNA-Prozessierungsenzyms Dicer in Schwann Zellen führt zu Hypomyelinisierung im PNS (Bremer et al., 2010; Pereira et al., 2010; Yun et al., 2010). Im zentralen Nervensystem wird in Oligodendrozyten das zweithäufigste Myelinprotein MBP von der sncRNA715 reguliert. Auch im peripheren Myelin spielt MBP eine entscheidende Rolle. In der natürlich vorkommenden Mausmutante *shiverer*, in welcher das MBP-Gen durch Deletion funktionsuntüchtig ist, besteht weiterhin funktionell kompaktes Myelin, allerdings ist die Anzahl zytoplasmatischer Kanäle, der sogenannten Schmidt-Lantermann Einkerbungen (*Schmidt-Lantermann incisures*, SLI) verdoppelt (Smith-Slatas and Barbarese, 2000). Myelin Basisches Protein in Schwann Zellen beeinflusst die Stabilität und Umsetzung von Proteinen der SLI wie Connexin-32 und MAG (Smith-Slatas and Barbarese, 2000). Damit ist MBP auch im PNS entscheidend an der Aufrechterhaltung der funktionellen Myelinschicht beteiligt. Auch in Schwann Zellen wird vermutet, dass MBP als mRNA in die Zellperipherie lokalisiert, da *Mbp* mRNA während des Myelinisierungsprozesses diffus im Zytoplasma verteilt nachgewiesen werden konnte (Trapp et al., 1987). Aus dieser Beobachtung heraus liegt die Vermutung nahe, dass die mRNA translational in ähnlicher Weise reguliert werden muss, wie bereits in Oligodendrozyten bekannt (Müller et al., 2013). Wie allerdings wird in Schwann Zellen die Translation von *Mbp* reguliert? Spielt auch hier die sncRNA715 eine Rolle, ähnlich wie in Oligodendrozyten?

5.2.1 Translationale Regulation von *Mbp* mRNA durch sncRNA715 in Schwann Zellen

Durch Untersuchungen an der spontan immortalisierten Schwann Zelllinie IMS32 sowie an primären Schwann Zellen unterschiedlicher Differenzierungsstadien, konnte gezeigt werden, dass undifferenzierte Zellen *Mbp* mRNA exprimieren, aber kein Protein synthetisiert wird (vergleiche Abbildung 38 und Abbildung 41B), womit eine translationale Inhibition wahrscheinlich erscheint. Da die MBP Proteine des peripheren Nervensystems sich nicht von denen im zentralen Nervensystem unterscheiden (Mentaberry et al., 1986), liegt die Vermutung nahe, dass auch Schwann Zell MBP über die Assoziation mit der kleinen nicht-kodierende RNA 715 translational reguliert wird. Es konnte die Expression der sncRNA715 in der Schwann Zelllinie IMS32 sowie in primären Schwann Zellen nachgewiesen werden (siehe Abbildung 39 und Abbildung 41). Des Weiteren wird die sncRNA715 in differenzierten, MBP-positiven Schwann Zellen im Vergleich zu undifferenzierten in ihrer Expression herunter reguliert (siehe Abbildung 41).

Durch Zugabe des zur Familie der epidermalen Wachstumsfaktoren (*epidermal growth factor*, EGF) gehörenden Proteins Neuregulin 1 Typ III (NRG1) und gleichzeitige Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels durch Zugabe von dbcAMP oder Forskolin wurde die Differenzierung von Schwann Zellen *in vitro* vermittelt (Arthur-Farraj et al., 2011). Die Reifung der Zellen konnte durch immunzytochemische sowie proteinbiochemische Analysen des MBP-Proteins nachgewiesen werden (vergleiche Abbildung 40 und Abbildung 41B). Damit die Translation von *Mbp* ermöglicht werden kann, muss die translationale Repression aufgehoben werden. Es konnte gezeigt werden, dass die regulierende sncRNA715 in differenzierten Schwann Zellen schwächer exprimiert wird als in undifferenzierten (vergleiche Abbildung 41A). Der Effekt der sncRNA715 auf die Translation von *Mbp* konnte durch Überexpression der synthetischen sncRNA715 Sequenz in differenzierten primären Schwann Zellen bewiesen werden, da hier die MBP Level um etwa 60% reduziert sind. Der direkter Effekt der sncRNA715 auf die Translation von MBP wurde in einer früheren Studie in

Oligodendrozyten untersucht, in welcher durch Mutation der sncRNA715 Bindestelle innerhalb der 3'UTR der *Mbp* mRNA in Luziferase-Reporterkonstrukten die translationale Repression verringert wurde (Bauer et al., 2012).

5.2.2 Regulation der Myelin-Genexpression nach axo-glialem Kontakt im peripheren Nervensystem

Die Myelinisierung im peripheren Nervensystem durch Schwann Zellen hängt von diversen Faktoren ab. Zu Beginn muss entschieden werden, ob eine Schwann Zelle Axone ummantelt und sogenannte Remak-Bundle bildet, oder ob die Schwann Zelle spezifisch um einzelne Axone die Myelinschicht synthetisiert (Jessen and Mirsky, 2005). Bei Axonen mit einem Durchmesser größer als 1µm assoziiert die Schwann Zelle mit einem axonalen Abschnitt und bildet die Myelinschicht. Zur Bildung einer funktionalen Myelinschicht muss die Synthese der Myelinprotein gestartet werden, was wiederum von unterschiedlichsten Faktoren abhängt. Da Schwann Zellen im PNS nur ein einzelnes axonales Segment myelinisieren, wohingegen Oligodendrozyten im ZNS mehrere Abschnitte auf unterschiedlichen Axonen ummanteln (Poliak and Peles, 2003), muss die lokale Synthese von Myelinproteinen in Schwann Zellen weniger komplex reguliert werden. In Oligodendrozyten muss die Bildung der Myelinschicht in den unterschiedlichen Ausläufern auf die verschiedenen Eigenschaften der axonalen Segmente angepasst werden. Da sich Schwann Zellen im Gesamten um den axonalen Abschnitt wickeln, also nur einen „Ausläufer“ bilden, müssen sie nur auf die Eigenschaften eines axonalen Segments adaptieren. Die genau angepasste, lokale Regulation der MBP Synthese scheint damit nicht so komplex, wie in Oligodendrozyten. Allerdings muss auch die Schwann Zelle vor der Kompaktierung von intrazellulären Membranen durch MBP Proteine geschützt werden. Würde MBP als Protein ungeschützt im Zytoplasma des Zellsomas synthetisiert, könnte es durch die basischen Eigenschaften und damit positiven Ladung intrazelluläre Membranen, wie Endoplasmatisches Reticulum oder Golgi-Apparat, kompaktieren und die Funktionen dieser Organellen damit beeinträchtigen (Staugaitis et al., 1990). Damit muss auch die Translation von MBP in Schwann Zellen lokal reguliert werden. In der durchgeführten Studie konnte gezeigt werden, dass die Translation von MBP in Schwann Zellen durch die kleine nicht-codierenden RNA 715 inhibiert wird. Wie allerdings wird die Translation gestartet? Dissoziiert die sncRNA715 von der *Mbp* mRNA? Es konnte in den myelinisierenden Zellen des zentralen Nervensystems gezeigt werden, dass der Transport der *Mbp* mRNA in die Zellperipherie von dem Transportfaktor hnRNP A2 abhängt. Hier wird in Antwort auf Interaktion von axonalem L1 mit oligodendroglialem F3/Contactin bzw. axonalem Laminin $\alpha 2$ und oligodendroglialem $\beta 1$ Integrin die Nicht-Rezeptor Tyrosinkinase Fyn aktiviert. Fyn phosphoryliert unter anderem hnRNP A2 und F, wodurch die Synthese des MBP Proteins gesteigert wird (Müller et al., 2013). Im ersten Teil der durchgeführten Studie konnte gezeigt werden, dass in Oligodendrozyten auch Ago2 Teil des hnRNP A2-abhängigen Transportgranulas ist und Ago2-Proteine von Fyn phosphoryliert werden. Es wird vermutet, dass durch Ago2-enthaltende miRISCs die translationale Repression vermittelt wird und die Derepression am Ort der lokalen Translation durch Fyn-abhängige Phosphorylierung von miRISC Komponenten gestartet wird. Wie genau die Aktivierung der Translation stattfindet konnte allerdings nicht gezeigt werden. Es kommt die Frage auf, ob auch in Schwann Zellen die *Mbp* mRNA in hnRNP A2-enthaltenen RNA Granulas transportiert wird und in welcher Weise die Derepression der mRNA an der axo-glialem Kontaktstelle stattfindet. Es konnte in früheren Studien gezeigt werden, dass nur Schwann Zellen, welche Laminin $\gamma 1$ exprimieren, MBP Protein synthetisieren. Schwann Zellen negativ für Laminin $\gamma 1$ bilden nicht den

differenzierungsfördernden Transkriptionsfaktor Krox20 und MBP und es wird keine Myelinschicht gebildet. Die Zellen verweilen im prämyelinisierendem Stadium (Chen and Strickland, 2003). Des Weiteren wird vermutet, dass die Src-kinase Fyn auch eine entscheidende Rolle während der Differenzierung in myelinbildenden Schwann Zellen spielt (Sobko et al., 1998). Die Aktivierung von Fyn aktiviert wiederum Kalium-Kanäle, wodurch die Differenzierung begünstigt wird (Sobko et al., 1998). Fyn bildet zusammen mit $\beta 1$ Integrinen, der *focal adhesion kinase* und Paxillin einen Aktin-assoziierten Komplex, welcher die Initiation der Differenzierung von Schwann Zell Vorläuferzellen in myelinisierende Schwann Zellen hervorruft (Chen et al., 2000). Es erscheinen damit einige Gemeinsamkeiten in der Aktivierung der Myelinisierung zwischen Oligodendrozyten und Schwann Zellen. Es bleibt allerdings zu untersuchen, ob *Mbp* mRNA in Schwann Zellen an hnRNP A2 bindet und ob der Transport in die Zellperipherie über diesen *trans-acting* Faktor vermittelt wird. Wird auch in Schwann Zellen die lokale Translation der *Mbp* mRNA über Fyn-abhängige Phosphorylierung der Granula Komponenten aktiviert? Spielen auch in Schwann Zellen Argonaut-Proteine während der posttranskriptionellen Genregulation eine Rolle? Wird die sncRNA715-abhängige translationale Repression von *Mbp* mRNA auch in Schwann Zellen über Ago2 vermittelt? In einer Studie aus 2009 konnte gezeigt werden, dass das periphere Myelinprotein PMP22 mit Ago2-Proteinen interagiert. Die Expression von PMP22 wird über die miR-29a reguliert, welche im Komplex mit Ago2 die Translation inhibiert (Verrier et al., 2009). Damit ist ein Beispiel gezeigt, in welchem ein peripheres Myelinprotein durch die Interaktion mit einem Ago2-enthaltenen miRISC translational reguliert wird. Es bleibt allerdings genauer zu untersuchen, in welcher Weise Ago-Proteine in Schwann Zellen exprimiert und reguliert werden.

5.3 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Oligodendrozyten Argonaut-Proteine exprimieren und dass Ago2 eine Komponente des hnRNP A2-abhängigen *Mbp* mRNA Transportgranulas darstellt. Ago2 interagiert mit hnRNP A2, *Mbp* mRNA, sncRNA715 und der Fyn-Kinase. Ago2 bildet also vermutlich zusammen mit der sncRNA715 den miRISC, welcher für die translationale Inhibition verantwortlich ist. Für die Repression der Translation sind allerdings weitere Proteine nötig. Im Allgemeinen wird GW182 von Ago2 rekrutiert und bildet eine weitere Komponente des miRISCs, in welchem es für die Hemmung der ribosomalen Untereinheiten zuständig ist (Eulalio et al., 2008). In zukünftigen Experimenten könnten die weiteren Faktoren des miRISC innerhalb des RNA-Granula identifiziert werden. Dies wäre wichtig um die genaue Funktion der einzelnen Komponenten zu definieren und einen Eindruck darüber zu gewinnen, welche Komponenten möglicherweise in verschiedensten Krankheitssituationen verändert sein könnten.

Ago2 konnte außerdem als neues Fyn-Zielprotein identifiziert werden. Die Fyn-abhängige Phosphorylierung von Ago2 hat keinen Einfluss auf die Bindung zur sncRNA715, allerdings wird vermutet, dass die Phosphorylierung generell den Zerfall des RNA-Granula verursacht und damit die Translation ermöglicht. Es gilt in Zukunft zu analysieren, wie sich die einzelnen Granula-Komponenten nach Phosphorylierung zueinander verhalten. Es könnten nach Überexpression von Fyn in oligodendrogialen Zellen Coimmunopräzipitationsexperimente durchgeführt werden, in welchen die Interaktion verschiedener Proteine in Abhängigkeit des Phosphorylierungsstatus untersucht werden kann. Dies könnte Aufschluss darüber geben, wie die *Mbp* mRNA bei der Initiierung der Myelinisierung translational reaktiviert wird.

Um einen genaueren Eindruck über die Verteilung des Argonaut-Proteins Ago2 *in vivo* zu gewinnen, könnten immunhistochemische Analysen auf corticalen Schnittkulturen durchgeführt werden. Diese Schnittkulturen stellen ein relativ simples Modellsystem zur Beobachtung der Myelinisierung *in vivo* dar, da die Oligodendrozyten im Laufe der Kultivierung axonale Segmente myelinisieren. Durch Cofärbungen von Ago2 mit MBP oder auch hnRNP A2 könnte ein Eindruck darüber gewonnen werden, wo innerhalb der myelinisierenden Oligodendrozyten sich Ago2-Proteine befinden und außerdem an welcher Stelle die Interaktion von Ago2 mit hnRNP A2 stattfindet.

In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass im EAE-Mausmodell die Expression von Ago2 herunterreguliert ist (Lewkowicz et al., 2015). Im EAE-Modell entwickeln sich durch Infiltration von Immunzellen demyelinisierte Läsionen in der weißen Substanz des Gehirns, welche axonale Degeneration zur Folge haben und damit verbundene phänotypische Defekte auftreten (Mccarthy et al., 2012). In zukünftigen Experimenten könnte die Expression der sncRNA715 im EAE-Modell untersucht werden um einen möglichen Zusammenhang zu den Veränderungen der Ago2-Expression zu erkennen.

In der durchgeführten Studie konnte auch in Schwann Zellen die sncRNA715 als Regulator der translationalen Repression der *Mbp* mRNA identifiziert werden. *Mbp* mRNA wird auch in Schwann Zellen in die Zellperipherie transportiert, wobei die Translation während des Transports verhindert werden muss (Trapp et al., 1987). In zukünftigen Studien gilt festzustellen, ob der gesamte Transportprozess der *Mbp* mRNA in gleicher Weise abläuft, wie bereits für Oligodendrozyten gezeigt. Dabei könnte auf Interaktion von *Mbp* mRNA mit verschiedenen Granula-Komponenten, wie hnRNP A2, hnRNP F und Ago2 mittels Immunpräzipitationsexperimenten getestet werden. Außerdem könnte untersucht werden, ob auch in Schwann Zellen die Fyn-Kinase eine entscheidende Rolle bei der translationalen Reaktivierung an der axo-glialen Kontaktstelle darstellt. Wird die Schwann Zelle *Mbp* mRNA in gleicher Weise transportiert wie in Oligodendrozyten, so liegt es nahe, dass die Fyn-Kinase die Komponenten phosphoryliert und darüber die Myelinisierung steuert.

Die sncRNA715 ist entscheidend an der Regulation der lokalen Myelinisierung in Oligodendrozyten und Schwann Zellen beteiligt. Damit könnten Deregulationen dieser kleinen regulatorischen RNA eine Rolle während Prozessen der Demyelinisierung spielen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass sncRNA715 in demyelinisierten Läsionen von MS-Patienten im Vergleich zur normal erscheinenden weißen Substanz hoch reguliert ist (Bauer et al., 2012). Es könnte in zukünftigen Studien die Verteilung von miRISC-Komponenten, insbesondere von Ago2, innerhalb dieser Läsionen untersucht werden. Sind diese missreguliert im Vergleich zur normal erscheinenden weißen Substanz, so könnte ein Hinweis darauf gefunden werden, warum OPCs in diesen Läsionen nicht länger in der Lage sind MBP Proteine zu synthetisieren und damit funktionelles Myelin zu bilden. Durch diese Erkenntnisse könnten möglicherweise neue Faktoren gefunden werden, welche zur Therapieentwicklung hilfreich sein könnten.

In der natürlich vorkommenden Mausmutante *shiverer* wird durch Deletionen im MBP-Gen kein funktionales MBP Protein gebildet und das Gehirn dieser Mäuse ist hypomyelinisiert (Readhead and Hood, 1990). Das PNS dieser Mäuse weist normale Myelinisierung auf, allerdings ist der molekulare Aufbau durch Verdoppelung der Anzahl an Schmidt-Lantermann Einkerbungen verändert (Gould et al., 1995). Es könnten Schwann Zellen aus diesen Mäusen extrahiert werden und auf die Expression der sncRNA715 untersucht werden. Es ist zu vermuten, dass diese in den MBP-defizienten Zellen im

Vergleich zu Schwann Zellen aus einer Wildtyp-Maus, herunter reguliert ist. Außerdem könnten Co-Kulturen aus Wildtyp-Schwann Zellen und Neuronen hergestellt werden und es könnte analysiert werden, ob die spezifische Überexpression der sncRNA715 in Oligodendrozyten, mithilfe eines viralen Systems, die Myelinisierung *in vitro* beeinflusst.

Ein interessanter Ansatz könnte auch sein, einen AAV, welcher zu einer Überexpression der sncRNA715 führt, in Wildtyp-Mäusen *in vivo* in den Ischiasnerv zu injizieren (vergleiche Gonzalez et al., 2014) und mithilfe spezialisierter Präparation von Querschnitten durch den Ischiasnerv und anschließender Elektronenmikroskopie (vergleiche Möbius, 2009) den Aufbau der Myelinschicht zu untersuchen. Dies könnte einen Hinweis darauf liefern, ob die translationale Repression der *Mbp* mRNA durch Bindung der sncRNA715 zum gleichen molekularen Aufbau der Myelinschicht führt wie die Deletion des gesamten Proteins in *shiverer* Mäusen.

6 Zusammenfassung

Die Myelinisierung neuronaler Axone ermöglicht eine schnelle und energieeffiziente Weiterleitung von Informationen im Nervensystem. Durch lokale Synthese von Myelinproteinen kann die Myelinschicht, zeitlich und räumlich reguliert, gebildet werden. Dieser Prozess ist abhängig von verschiedensten axonalen Eigenschaften und muss damit lokal reguliert werden. Die Myelinisierung im zentralen sowie im peripheren Nervensystem hängt unter anderem stark von kleinen regulatorischen RNA Molekülen ab. In Oligodendrozyten wird das Myelin Basische Protein (MBP) von der sncRNA715 translational reguliert, indem diese direkt innerhalb der 3'UTR der *Mbp* mRNA bindet und damit die Proteinsynthese verhindert. *Mbp* mRNA wird in hnRNP A2-enthaltenen RNA Granula in die Zellperipherie transportiert, wo in Antwort auf axonale Signale die membranständige Tyrosin-Kinase Fyn aktiviert wird, welche Granula-Komponenten wie hnRNP A2 und F phosphoryliert wodurch die lokale Translation initiiert wird. Während des Transports wird die mRNA durch die Bindung der sncRNA715 translational reprimiert. SncRNAs bilden zusammen mit Argonaut-Proteinen den *microRNA induced silencing complex* (miRISC), welcher die translationale Inhibition oder den Abbau von mRNAs vermittelt. In der vorliegenden Arbeit sollte zum einen die Regulation der sncRNA715-abhängigen translationalen Repression der *Mbp* mRNA in oligodendroglialen Zellen genauer untersucht werden und im zweiten Teil wurde die Rolle der sncRNA715 in den myelinbildenden Zellen des peripheren Nervensystems, den Schwann Zellen, analysiert.

Es konnte in oligodendroglialen Zellen die mRNA-Expression der vier, in Säugern bekannten Argonaut-Proteinen nachgewiesen werden. Außerdem konnten die beiden Proteine Ago1 und Ago2 *in vitro* sowie *in vivo* detektiert werden. Ago2 interagiert mit hnRNP A2, *Mbp* mRNA und sncRNA715, womit es als neue Komponente des *Mbp* mRNA Transportgranulas identifiziert werden konnte. Des Weiteren colokalisiert Ago2 mit der Fyn-Kinase und alle vier Argonaut-Proteine werden Fyn-abhängig Tyrosin-phosphoryliert. Die Fyn-abhängige Phosphorylierung der Granula-Komponenten in Antwort auf axo-glialen Kontakt führt zum Zerfall des RNA-Granulas und zur gesteigerten MBP Proteinsynthese. Dies wird möglicherweise durch Abstoßungskräfte der negativ geladenen phosphorylierten Proteine vermittelt, wodurch diese sich voneinander und von der mRNA entfernen. Durch die Ablösung des miRISCs von der *Mbp* mRNA wird die Translation möglicherweise reaktiviert und die Myelinisierung kann starten. Mit der Identifizierung von Ago2 als neuer *Mbp* mRNA Transportgranula-Komponente konnte ein weiterer Einblick in die Regulation der lokalen Translation von MBP gewährt werden. Das Verständnis dieses Prozesses ist entscheidend für die Entwicklung neuer Therapien von demyelinisierenden Erkrankungen, da neue Faktoren als eventuelle Ziele für pharmakologische Manipulationen identifiziert und möglicherweise neue Therapiemöglichkeiten entstehen könnten.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die translationale Regulation von *Mbp* mRNA in Schwann Zellen untersucht. Auch Schwann Zell-*Mbp* wird als mRNA translational inaktiviert zur axo-glialen Kontaktstelle transportiert, wo vermutlich auch lokale Translation in Antwort auf spezifische Signale stattfindet. Allerdings bleiben die genauen Mechanismen der mRNA-Lokalisation und damit verbundenen translationalen Repression bislang ungeklärt. Es konnte hier gezeigt werden, dass auch in Schwann Zellen die sncRNA715 exprimiert wird und die Translation von *Mbp* reguliert. Überexpression der synthetischen sncRNA715 führt zu einer signifikanten Reduktion der MBP Proteinmengen in differenzierten primären Schwann Zellen. Damit kann vermutet werden, dass die Regulation der lokalen MBP Proteinsynthese in Schwann Zellen der in Oligodendrozyten ähnelt.

7 Summary

The myelination of neuronal axons facilitates fast and energy efficient transmission of information in the nervous system. Myelin sheath growth requires local synthesis of myelin proteins which is spatially and temporally regulated. This process must be regulated locally to respond to diverse axonal properties. Myelination in the peripheral as well as in the central nervous system is controlled by small regulatory RNAs. In oligodendrocytes translation of Myelin Basic Protein is dependent on sncRNA715, which binds directly in the 3'UTR of *Mbp* mRNA and inhibits its translation. *Mbp* mRNA is transported into the cell periphery in hnRNP A2-containing RNA granules. At the axo-glial contact site the tyrosine kinase Fyn is activated in response to axonal signaling and phosphorylates granule components like hnRNP A2 and F which leads to granule dissociation and translation initiation. During transport binding of sncRNA715 inhibits premature translation of *Mbp* mRNA. SncRNAs together with Argonaute proteins form the microRNA induced silencing complex (miRISC), which is responsible for translational repression or mRNA decay. It was the aim of the project described here to analyze the regulation of sncRNA715-dependent translational inhibition of *Mbp* mRNA in oligodendroglial cells. In the second part, the role of sncRNA715 in the myelinating cells of the peripheral nervous system, the Schwann cells, was investigated.

In oligodendroglial cells mRNA expression of the four mammalian Argonaute proteins could be shown. Furthermore the proteins Ago1 and Ago2 could be detected *in vitro* and *in vivo*. Ago2 interacts with hnRNP A2, *Mbp* mRNA and sncRNA715 and with this is identified as a new component of *Mbp* mRNA transport granules. In addition Ago2 colocalizes with Fyn kinase and all four Agos are shown to be tyrosine phosphorylated by Fyn. Fyn-dependent phosphorylation of granule components in response to axon-glial signaling presumably leads to granule breakdown and increases MBP protein synthesis. This could be mediated by repulsive forces of the negatively charged phosphorylated proteins by which proteins detach from another resulting in the removal of the miRISC from the mRNA and translational reactivation of repressed mRNA. With the identification of Ago2 as a new component of *Mbp* mRNA transport granules we have provided new insights into the regulation of local MBP translation in oligodendrocytes. The understanding of this process is important for new therapy developments for demyelinating diseases, because new factors were identified as targets for potential pharmacological manipulations.

In the second part of this work the translational regulation of *Mbp* mRNA in Schwann cells was analyzed. Similar to oligodendroglial *Mbp*, Schwann cell-*Mbp* is transported as translationally repressed mRNA to the axon-glial contact site, where local translation in response to specific axonal signals takes place. The distinct mechanisms of mRNA localization and translational repression in Schwann cells have not been unraveled so far. It was shown here that also Schwann cells express sncRNA715 and that this small RNA controls *Mbp* translation. Overexpression of a synthetic sncRNA715 sequence in primary Schwann cells leads to significantly decreased MBP protein levels. This suggests a similar regulatory mechanism for local *Mbp* translation in Schwann cells as in oligodendrocytes.

8 Abkürzungen

Tabelle 14: Verwendete Abkürzungen

Ago	Argonaut
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserum Albumin (Bovine Serum Albumine)
bzw.	beziehungsweise
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CNPase	2', 3'- Cyclic Nucleotide 3'-Phosphodiesterase
d.h.	das heißt
ddH₂O	doppelt destilliertes Wasser
dH₂O	destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eGFP	enhanced Green Fluorescent Protein
hnRNP	heterogene nukleäres Ribonukloprotein
LIF	Leukämie-induzierter Faktor
MAG	Myelin-associated Glycoprotein
MBP	Myelin basisches Protein
miRISC	<i>microRNA induced silencing complex</i>
miRNA	mikroRNA
MOBP	Myelin-associated Oligodendrocytic Basic Protein
mRNA	Boten-RNA (messenger RNA)
OPC	Oligodendrozyten-Vorläuferzelle (oligodendrocyte precursor cell)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PLP	Proteolipid Protein
PNS	Peripheres Nervensystem
pSC	primäre Schwann Zellen
qPCR	Quantitative Realtime-PCR
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SEM	Standardfehler des Mittelwerts (standard error of the mean)
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA
z.B.	Zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

9 Referenzen

- Abràmoff, M.D., P.J. Magalhães, and S.J. Ram. 2004. Image processing with imageJ. *Biophotonics Int.* 11:36–41. doi:10.1117/1.3589100.
- Aggarwal, S., N. Snaidero, G. Pähler, S. Frey, P. Sánchez, M. Zweckstetter, A. Janshoff, A. Schneider, M.-T. Weil, I. a T. Schaap, D. Görlich, and M. Simons. 2013. Myelin membrane assembly is driven by a phase transition of myelin basic proteins into a cohesive protein meshwork. *PLoS Biol.* 11:e1001577. doi:10.1371/journal.pbio.1001577.
- Aggarwal, S., L. Yurlova, and M. Simons. 2011a. Central nervous system myelin: structure, synthesis and assembly. *Trends Cell Biol.* 21:585–93. doi:10.1016/j.tcb.2011.06.004.
- Aggarwal, S., L. Yurlova, N. Snaidero, C. Reetz, S. Frey, J. Zimmermann, G. Pähler, A. Janshoff, J. Friedrichs, D.J. Müller, C. Goebel, and M. Simons. 2011b. A size barrier limits protein diffusion at the cell surface to generate lipid-rich myelin-membrane sheets. *Dev. Cell.* 21:445–456. doi:10.1016/j.devcel.2011.08.001.
- Ainger, K., D. Avossa, A.S. Diana, C. Barry, E. Barbarese, and J.H. Carson. 1997. Transport and Localization Elements in Myelin Basic Protein mRNA. 138:1077–1087.
- Allen, N.J., and B.A. Barres. 2009. Q & A Glia — more than just brain glue. 457:675–677.
- Anderson, P., and N. Kedersha. 2006. RNA granules. *J. Cell Biol.* 172:803–808. doi:10.1083/jcb.200512082.
- Anderson, P., and N. Kedersha. 2009. Stress granules. *Curr. Biol.* 19:397–398. doi:10.1016/j.cub.2009.03.013.
- Ando, Y., and A.K.L. Leung. 2013. Does an Emergency Visit to the ER Make MicroRNAs Stronger during Stress? *Mol. Cell.* 52:1–3. doi:10.1016/j.molcel.2013.09.022.
- Armendáriz, B.G., A. Bribian, E. Pérez-Martínez, A. Martínez, F. de Castro, E. Soriano, and F. Burgaya. 2012. Expression of Semaphorin 4F in neurons and brain oligodendrocytes and the regulation of oligodendrocyte precursor migration in the optic nerve. *Mol. Cell. Neurosci.* 49:54–67. doi:10.1016/j.mcn.2011.09.003.
- Arthur-Farraj, P., K. Wanek, J. Hantke, C.M. Davis, A. Jayakar, D.B. Parkinson, R. Mirsky, and K.R. Jessen. 2011. Mouse schwann cells need both NRG1 and cyclic AMP to myelinate. *Glia.* 59:720–33. doi:10.1002/glia.21144.
- Azevedo, F. a C., L.R.B. Carvalho, L.T. Grinberg, J.M. Farfel, R.E.L. Ferretti, R.E.P. Leite, W. Jacob Filho, R. Lent, and S. Herculano-Houzel. 2009. Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. *J. Comp. Neurol.* 513:532–41. doi:10.1002/cne.21974.
- Barbarese, E., D.E. Koppel, M.P. Deutscher, C.L. Smith, K. Ainger, F. Morgan, and J.H. Carson. 1995. Protein translation components are colocalized in granules in oligodendrocytes. *J. Cell Sci.* 108 (Pt 8:2781–90.

- Barres, B. a, M.A. Lazzar, and M.C. Raff. 1994. A novel role for thyroid hormone, glucocorticoids and retinoic acid in timing oligodendrocyte development.
- Bauer, N.G., C. Richter-Landsberg, and C. Ffrench-Constant. 2009. Role of the oligodendroglial cytoskeleton in differentiation and myelination. *Glia*. 57:1691–1705. doi:10.1002/glia.20885.
- Bauer, N.M., C. Moos, J. van Horssen, M. Witte, P. van der Valk, B. Altenhein, H.J. Luhmann, and R. White. 2012. Myelin basic protein synthesis is regulated by small non-coding RNA 715. *EMBO Rep*. 13:827–34. doi:10.1038/embor.2012.97.
- Bear, M.F., B.W. Connors, and M.A. Paradiso. 2008. *Neurowissenschaften*. 3. ed. 28-29 pp.
- Benninger, Y., H. Colognato, T. Thurnherr, R.J.M. Franklin, D.P. Leone, S. Atanasoski, K.-A. Nave, C. Ffrench-Constant, U. Suter, and J.B. Relvas. 2006. Beta1-integrin signaling mediates premyelinating oligodendrocyte survival but is not required for CNS myelination and remyelination. *J. Neurosci*. 26:7665–7673. doi:10.1523/JNEUROSCI.0444-06.2006.
- Besse, F., and A. Ephrussi. 2008. Translational control of localized mRNAs: restricting protein synthesis in space and time. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 9:971–980. doi:10.1038/nrm2548.
- Bhatheja, K., and J. Field. 2006. Schwann cells: origins and role in axonal maintenance and regeneration. *Int. J. Biochem. Cell Biol*. 38:1995–9. doi:10.1016/j.biocel.2006.05.007.
- Biosystems, A. 2011. TaqMan Small RNA Assays Protocol. 1–41.
- Bolte, S., and F.P. Cordelieres. 2006. A guided tour into subcellular colocalisation analysis in light microscopy. *J. Microsc*. 224:13–232.
- Bremer, J., T. O'Connor, C. Tiberi, H. Rehrauer, J. Weis, and A. Aguzzi. 2010. Ablation of Dicer from murine Schwann cells increases their proliferation while blocking myelination. *PLoS One*. 5:e12450. doi:10.1371/journal.pone.0012450.
- Bribián, A., P.F. Esteban, D. Clemente, N. Soussi-Yanicostas, J.-L. Thomas, B. Zalc, and F. de Castro. 2008. A novel role for anosmin-1 in the adhesion and migration of oligodendrocyte precursors. *Dev. Neurobiol*. 68:1503–16. doi:10.1002/dneu.20678.
- Britsch, S., D.E. Goerich, D. Riethmacher, R.I. Peirano, M. Rossner, K. Nave, C. Birchmeier, and M. Wegner. 2001. The transcription factor Sox10 is a key regulator of peripheral glial development. 66–78. doi:10.1101/gad.186601.precursors.
- Britsch, S., L. Li, S. Kirchhoff, F. Theuring, V. Brinkmann, C. Birchmeier, and D. Riethmacher. 1998. The ErbB2 and ErbB3 receptors and their ligand, neuregulin-1, are essential for development of the sympathetic nervous system. *Genes Dev*. 12:1825–1836. doi:10.1101/gad.12.12.1825.
- Brophy, P.J., G.L. Boccaccio, D.R. Colman, and T. Mount. 1993. The distribution of myelin basic protein mRNAs within myelinating oligodendrocytes.
- Brumwell, C. 2002. Intracellular Trafficking of HnRNP A2 in Oligodendrocytes. *Exp. Cell Res*. 279:310–320. doi:10.1006/excr.2002.5604.
- Buchan, J.R. 2014. mRNP granules. *RNA Biol*. e29034. doi:10.4161/rna.29034.

- Bunge, R.P. 1994. The role of the Schwann cell in trophic support and regeneration. *J. Neurol.* 242:S19–S21. doi:10.1007/BF00939235.
- 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.* 45:41–53. doi:10.1016/j.neuron.2004.12.028.
- Carson, J.H., and E. Barbarese. 2005. Systems analysis of RNA trafficking in neural cells. *Biol. Cell.* 97:51–62. doi:10.1042/BC20040083.
- Carson, J.H., N. Blondin, and G. Korza. 2006. Rules of engagement promote polarity in RNA trafficking. *BMC Neurosci.* 7 Suppl 1:S3. doi:10.1186/1471-2202-7-S1-S3.
- Carson, M.J., R.R. Behringer, R. Brinster, and F.A. McMorris. 1993. Insulin-like Growth Factor I Increases Brain Growth and Central Nervous System Myelination in Transgenic Mice. 10:729–740.
- Carthew, R.W. 2006. Gene regulation by microRNAs. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 16:203–208. doi:10.1016/j.gde.2006.02.012.
- Cenik, E.S., and P.D. Zamore. 2011. Argonaute proteins. *Curr. Biol.* 21:R446–9. doi:10.1016/j.cub.2011.05.020.
- Chen, L.M., D. Bailey, and C. Fernandez-Valle. 2000. Association of beta 1 integrin with focal adhesion kinase and paxillin in differentiating Schwann cells. *J. Neurosci.* 20:3776–3784. doi:20/10/3776 [pii].
- Chen, Y., H. Wang, S.O. Yoon, X. Xu, M.O. Hottiger, J. Svaren, K. a Nave, H. a Kim, E.N. Olson, and Q.R. Lu. 2011. HDAC-mediated deacetylation of NF- κ B is critical for Schwann cell myelination. *Nat. Neurosci.* 14:437–441. doi:10.1038/nn.2780.
- Chen, Z.L., and S. Strickland. 2003. Laminin γ 1 is critical for Schwann cell differentiation, axon myelination, and regeneration in the peripheral nerve. *J. Cell Biol.* 163:889–899. doi:10.1083/jcb.200307068.
- Christensen, J.R., K.B. Larsen, S.H. Lisanby, J. Scalia, V. Arango, A.J. Dwork, and B. Pakkenberg. 2007. Neocortical and hippocampal neuron and glial cell numbers in the rhesus monkey. *Anat. Rec. (Hoboken).* 290:330–40. doi:10.1002/ar.20504.
- Chun, S.J., M.N. Rasband, R.L. Sidman, A. a Habib, and T. Vartanian. 2003. Integrin-linked kinase is required for laminin-2-induced oligodendrocyte cell spreading and CNS myelination. *J. Cell Biol.* 163:397–408. doi:10.1083/jcb.200304154.
- Clarke, L.E., and B. a Barres. 2013. Emerging roles of astrocytes in neural circuit development. *Nat. Rev. Neurosci.* 14:311–21. doi:10.1038/nrn3484.
- Colello, R.J., L.R. Devey, E. Imperato, and U. Pott. 1995. The chronology of oligodendrocyte differentiation in the rat optic nerve: evidence for a signaling step initiating myelination in the CNS. *J. Neurosci.* 15:7665–7672.

- Colman, D.R., G. Kreibich, a B. Frey, and D.D. Sabatini. 1982. Synthesis and incorporation of myelin polypeptides into CNS myelin. *J. Cell Biol.* 95:598–608.
- Colognato, H., W. Baron, V. Avellana-Adalid, J.B. Relvas, A. Baron-Van Evercooren, E. Georges-Labouesse, and C. ffrench-Constant. 2002. CNS integrins switch growth factor signalling to promote target-dependent survival. *Nat. Cell Biol.* 4:833–41. doi:10.1038/ncb865.
- Colognato, H., S. Ramachandrappa, I.M. Olsen, and C. ffrench-Constant. 2004. Integrins direct Src family kinases to regulate distinct phases of oligodendrocyte development. *J. Cell Biol.* 167:365–75. doi:10.1083/jcb.200404076.
- Czaplinski, K., and R.H. Singer. 2006. Pathways for mRNA localization in the cytoplasm. *Trends Biochem. Sci.* 31:687–93. doi:10.1016/j.tibs.2006.10.007.
- Czech, B., and G.J. Hannon. 2011. Small RNA sorting: matchmaking for Argonautes. *Nat. Rev. Genet.* 12:19–31. doi:10.1038/nrg2916.
- Czopka, T., C. Ffrench-Constant, and D. a Lyons. 2013. Individual oligodendrocytes have only a few hours in which to generate new myelin sheaths in vivo. *Dev. Cell.* 25:599–609. doi:10.1016/j.devcel.2013.05.013.
- Denzer, K., M.J. Kleijmeer, H.F.G. Heijnen, W. Stoorvogel, and H.J. Geuze. 2000. Exosome : from internal vesicle of the multivesicular body to intercellular signaling device. 3374:3365–3374.
- Detzer, A., C. Engel, W. Wünsche, and G. Sczakiel. 2011. Cell stress is related to re-localization of Argonaute 2 and to decreased RNA interference in human cells. *Nucleic Acids Res.* 39:2727–2741. doi:10.1093/nar/gkq1216.
- Dombrowski, S.M., C.C. Hilgetag, and H. Barbas. 2001. Quantitative Architecture Distinguishes Prefrontal Cortical Systems in the Rhesus Monkey. 975–988.
- Dugas, J.C., T.L. Cuellar, A. Scholze, B. Ason, A. Ibrahim, B. Emery, J.L. Zamanian, L.C. Foo, M.T. McManus, and B. a Barres. 2010. Dicer1 and miR-219 Are required for normal oligodendrocyte differentiation and myelination. *Neuron.* 65:597–611. doi:10.1016/j.neuron.2010.01.027.
- Dugas, J.C., and L. Notterpek. 2011. MicroRNAs in oligodendrocyte and Schwann cell differentiation. *Dev. Neurosci.* 33:14–20. doi:10.1159/000323919.
- Dziembowska, M., T.N. Tham, P. Lau, S. Vitry, F. Lazarini, and M. Dubois-Dalcq. 2005. A role for CXCR4 signaling in survival and migration of neural and oligodendrocyte precursors. *Glia.* 50:258–69. doi:10.1002/glia.20170.
- Einheber, S., M.J. Hannocks, C.N. Metz, D.B. Rifkin, and J.L. Salzer. 1995. Transforming growth factor-beta 1 regulates axon/Schwann cell interactions. *J. Cell Biol.* 129:443–458.
- Ender, C., and G. Meister. 2010. Argonaute proteins at a glance. *J. Cell Sci.* 123:1819–23. doi:10.1242/jcs.055210.
- Epplen, J.T., M. Gencik, a Epplen, J. Andrich, C. Saft, and H. Przuntek. 2000. Morbus Huntington - a human genetic model disease. *Cytogenet. Cell Genet.* 91:90–96.

- Eulalio, A., E. Huntzinger, and E. Izaurralde. 2008. GW182 interaction with Argonaute is essential for miRNA-mediated translational repression and mRNA decay. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 15:346–53. doi:10.1038/nsmb.1405.
- Eystathiou, T., E.K.L. Chan, S.A. Tenenbaum, J.D. Keene, K. Griffith, and M.J. Fritzler. 2002. Associates with a Unique Population of Human mRNAs within Novel Cytoplasmic Speckles. 13:1338–1351. doi:10.1091/mbc.01.
- Fabian, M.R., N. Sonenberg, and W. Filipowicz. 2010. Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. *Annu. Rev. Biochem.* 79:351–79. doi:10.1146/annurev-biochem-060308-103103.
- Farazi, T. a, S. a Juraneck, and T. Tuschl. 2008. The growing catalog of small RNAs and their association with distinct Argonaute/Piwi family members. *Development.* 135:1201–14. doi:10.1242/dev.005629.
- Filbin, M.T., F.S. Walsh, B.D. Trapp, J. a Pizzey, and G.I. Tennekoon. 1990. Role of myelin P0 protein as a homophilic adhesion molecule. *Nature.* 344:871–872. doi:10.1038/344871a0.
- Flores, A.I., B.S. Mallon, T. Matsui, W. Ogawa, A. Rosenzweig, T. Okamoto, and W.B. Macklin. 2000. Akt-Mediated Survival of Oligodendrocytes Induced by Neuregulins. 20:7622–7630.
- Fogarty, M., W.D. Richardson, and N. Kessaris. 2005. A subset of oligodendrocytes generated from radial glia in the dorsal spinal cord. *Development.* 132:1951–9. doi:10.1242/dev.01777.
- Förstemann, K., M.D. Horwich, L. Wee, Y. Tomari, and P.D. Zamore. 2009. Drosophila microRNAs are sorted into functionally distinct argonaute complexes after production by dicer-1. 130:287–297. doi:10.1016/j.cell.2007.05.056.Drosophila.
- Frederick, T.J., and T.L. Wood. 2004. IGF-I and FGF-2 coordinately enhance cyclin D1 and cyclin E-cdk2 association and activity to promote G1 progression in oligodendrocyte progenitor cells. *Mol. Cell. Neurosci.* 25:480–92. doi:10.1016/j.mcn.2003.11.015.
- Friedman, R.C., K.K. Farh, C.B. Burge, and D.P. Bartel. 2009. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. 92–105. doi:10.1101/gr.082701.108.
- Fröhlich, D., W.P. Kuo, C. Frühbeis, J. Sun, C.M. Zehendner, H.J. Luhmann, S. Pinto, J. Toedling, J. Trotter, and E.-M. Krämer-Albers. 2014. Multifaceted effects of oligodendroglial exosomes on neurons : impact on neuronal firing rate , signal transduction and gene regulation. *Philos. Trans. R. Soc. B.* 369.
- Frühbeis, C., D. Fröhlich, W.P. Kuo, J. Amphornrat, S. Thilemann, A.S. Saab, F. Kirchhoff, W. Möbius, S. Goebbels, K.-A. Nave, A. Schneider, M. Simons, M. Klugmann, J. Trotter, and E.-M. Krämer-Albers. 2013. Neurotransmitter-triggered transfer of exosomes mediates oligodendrocyte-neuron communication. *PLoS Biol.* 11:e1001604. doi:10.1371/journal.pbio.1001604.
- Fulton, D., P.M. Paez, and A.T. Campagnoni. 2010. The multiple roles of myelin protein genes during the development of the oligodendrocyte. *ASN Neuro.* 2:e00027. doi:10.1042/AN20090051.
- Funfschilling, U., L.M. Supplie, D. Mahad, S. Boretius, a. S. Saab, J. Edgar, B.G. Brinkmann, C.M. Kassman, I.D. Tzvetanova, W. Mobius, F. Diaz, D. Meijer, U. Suter, B. Hamprecht, M.W. Sereda,

- C.T. Moraes, J. Frahm, S. Goebbels, and K. a. Nave. 2012. Glycolytic oligodendrocytes maintain myelin and long-term axonal integrity. 0–5. doi:10.1038/nature11007.
- Gagnon, K., L. Li, Y. Chu, B. Janowski, and D. Corey. 2014. RNAi factors are present and active in human cell nuclei. *Cell Rep.* 6:211–221. doi:10.1016/j.celrep.2013.12.013.
- Gao, Y., V. Tatavarty, G. Korza, M.K. Levin, and J.H. Carson. 2008. Multiplexed Dendritic Targeting of \square Calcium Calmodulin-dependent Protein Kinase II , Neurogranin , and Activity-regulated Cytoskeleton-associated Protein RNAs by the A2 Pathway. 19:2311–2327. doi:10.1091/mbc.E07.
- Garcion, E., and A. Faissner. 2001. Knockout mice reveal a contribution of the extracellular matrix molecule tenascin-C to neural precursor proliferation and migration. 2496:2485–2496.
- Garratt, A.N., S. Britsch, and C. Birchmeier. 2000. Neuregulin, a factor with many functions in the life of a Schwann cell. *BioEssays.* 22:987–996. doi:10.1002/1521-1878(200011)22:11<987::AID-BIES5>3.3.CO;2-X.
- Gibson, E.M., D. Purger, C.W. Mount, A.K. Goldstein, G.L. Lin, L.S. Wood, I. Inema, S.E. Miller, G. Bieri, J.B. Zuchero, B. a Barres, P.J. Woo, H. Vogel, and M. Monje. 2014. Neuronal activity promotes oligodendrogenesis and adaptive myelination in the mammalian brain. *Science.* 344:1252304. doi:10.1126/science.1252304.
- Goebbels, S., J.H. Oltrogge, R. Kemper, I. Heilmann, I. Bormuth, S. Wolfer, S.P. Wichert, W. Möbius, X. Liu, C. Lappe-Siefke, M.J. Rossner, M. Groszer, U. Suter, J. Frahm, S. Boretius, and K.-A. Nave. 2010. Elevated phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in glia triggers cell-autonomous membrane wrapping and myelination. *J. Neurosci.* 30:8953–64. doi:10.1523/JNEUROSCI.0219-10.2010.
- Gonzalez, S., R.N. Fernando, C. Perrin-Tricaud, and N. Tricaud. 2014. In vivo introduction of transgenes into mouse sciatic nerve cells in situ using viral vectors. *Nat. Protoc.* 9:1160–9. doi:10.1038/nprot.2014.073.
- Gould, M., A.L. Byrd, and E. Barbarese. 1995. The number of Schmidt-Lanterman incisures is more than doubled in shiverer PNS myelin sheaths. 98:85–98.
- Greenfield, S., S. Brostoff, E.H. Eylar, and P. Morell. 1973. Protein composition of myelin of the peripheral nervous system. *J. Neurochem.* 20:1207–1216. doi:10.1111/j.1471-4159.1973.tb00089.x.
- Greenfield, S., S.W. Brostoff, and E.L. Hogan. 1980. Characterization of the basic proteins from rodent peripheral nervous system myelin. *J. Neurochem.* 34:453–455.
- Griffiths, I. 1998. Axonal Swellings and Degeneration in Mice Lacking the Major Proteolipid of Myelin. *Science (80-)*. 280:1610–1613. doi:10.1126/science.280.5369.1610.
- Griffiths, I.R., L.S. Mitchell, K. Mcphilemy, S. Morrison, E. Kyriakides, and J.A. Barrie. 1989. Expression of myelin protein genes in Schwann cells. 352:345–352.

- Han, S.P., L.R. Friend, J.H. Carson, G. Korza, E. Barbarese, M. Maggipinto, J.T. Hatfield, J. a Rothnagel, and R. Smith. 2010. Differential subcellular distributions and trafficking functions of hnRNP A2/B1 spliceoforms. *Traffic*. 11:886–98. doi:10.1111/j.1600-0854.2010.01072.x.
- Harauz, G., and J.M. Boggs. 2013. Myelin management by the 18.5-kDa and 21.5-kDa classic myelin basic protein isoforms. *J. Neurochem*. 125:334–61. doi:10.1111/jnc.12195.
- Harauz, G., V. Ladizhansky, and J.M. Boggs. 2009. Structural polymorphism and multifunctionality of myelin basic protein. *Biochemistry*. 48:8094–104. doi:10.1021/bi901005f.
- Hartline, D.K., and D.R. Colman. 2007. Rapid conduction and the evolution of giant axons and myelinated fibers. *Curr. Biol*. 17:R29–35. doi:10.1016/j.cub.2006.11.042.
- Hatfield, J.T., J. a Rothnagel, and R. Smith. 2002. Characterization of the mouse hnRNP A2/B1/B0 gene and identification of processed pseudogenes. *Gene*. 295:33–42. doi:10.1016/S0378-1119(02)00800-4.
- He, L., and G.J. Hannon. 2004. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat. Rev. Genet*. 5:522–531. doi:10.1038/nrg1415.
- He, Y., J.Y. Kim, J. Dupree, A. Tewari, C. Melendez-Vasquez, J. Svaren, and P. Casaccia. 2010. Yy1 as a molecular link between neuregulin and transcriptional modulation of peripheral myelination. *Nat. Neurosci*. 13:1472–1480. doi:10.1038/nn.2686.
- Hildebrand, C., S. Remahl, C. Bjartmar, and K. Hospital. 1993. Myelinated nerve fibres in the CNS. 40.
- Hilgetag, C.C., and H. Barbas. 2009. Are there ten times more glia than neurons in the brain? *Brain Struct. Funct*. 213:365–6. doi:10.1007/s00429-009-0202-z.
- Hines, J.H., A.M. Ravanelli, R. Schwindt, E.K. Scott, and B. Appel. 2015. Neuronal activity biases axon selection for myelination in vivo. *Nat. Neurosci*. 18:1–9. doi:10.1038/nn.3992.
- Horman, S.R., M.M. Janas, C. Litterst, B. Wang, I.J. MacRae, M.J. Sever, D. V. Morrissey, P. Graves, B. Luo, S. Umesalma, H.H. Qi, L.J. Miraglia, C.D. Novina, and A.P. Orth. 2013. Akt-mediated phosphorylation of argonaute 2 downregulates cleavage and upregulates translational repression of MicroRNA targets. *Mol. Cell*. 50:356–367. doi:10.1016/j.molcel.2013.03.015.
- Hu, J., L. Deng, X. Wang, and X.-M. Xu. 2009. Effects of extracellular matrix molecules on the growth properties of oligodendrocyte progenitor cells in vitro. *J. Neurosci. Res*. 87:2854–62. doi:10.1002/jnr.22111.
- Hu, Q., B. Ang, M. Karsak, W. Hu, X. Cui, T. Duka, Y. Takeda, W. Chia, N. Sankar, Y. Ng, E. Ling, T. Maciag, D. Small, R. Trifonova, R. Kopan, H. Okano, M. Nakafuku, S. Chiba, H. Hirai, J.C. Aster, M. Schachner, C.J. Pallen, K. Watanabe, Z. Xiao, and S. Louis. 2003. F3 / Contactin Acts as a Functional Ligand for Notch during Oligodendrocyte Maturation. 115:163–175.
- Huang, J., Z. Liang, B. Yang, H. Tian, J. Ma, and H. Zhang. 2007. Derepression of microRNA-mediated protein translation inhibition by apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide-like 3G (APOBEC3G) and its family members. *J. Biol. Chem*. 282:33632–40. doi:10.1074/jbc.M705116200.

- Huang, Y., J.L. Zhang, X.L. Yu, T.S. Xu, Z. Bin Wang, and X.C. Cheng. 2013. Molecular functions of small regulatory noncoding RNA. *Biochem. Biokhimiia*. 78:221–30. doi:10.1134/S0006297913030024.
- Iki, T., M. Yoshikawa, M. Nishikiori, M.C. Jaudal, E. Matsumoto-Yokoyama, I. Mitsuhara, T. Meshi, and M. Ishikawa. 2010. In vitro assembly of plant RNA-induced silencing complexes facilitated by molecular chaperone HSP90. *Mol. Cell*. 39:282–291. doi:10.1016/j.molcel.2010.05.014.
- Iosue, I., R. Quaranta, S. Masciarelli, G. Fontemaggi, E.M. Batassa, C. Bertolami, T. Ottone, M. Divona, B. Salvatori, F. Padula, a Fatica, F. Lo-Coco, C. Nervi, and F. Fazi. 2013. Argonaute 2 sustains the gene expression program driving human monocytic differentiation of acute myeloid leukemia cells. *Cell Death Dis*. 4:e926. doi:10.1038/cddis.2013.452.
- Iwasaki, S., M. Kobayashi, M. Yoda, Y. Sakaguchi, S. Katsuma, T. Suzuki, and Y. Tomari. 2010. Hsc70/Hsp90 chaperone machinery mediates ATP-dependent RISC loading of small RNA duplexes. *Mol. Cell*. 39:292–299. doi:10.1016/j.molcel.2010.05.015.
- Jagalur, N.B., M. Ghazvini, W. Mandemakers, S. Driegen, A. Maas, E. a Jones, M. Jaegle, F. Grosveld, J. Svaren, and D. Meijer. 2011. Functional dissection of the Oct6 Schwann cell enhancer reveals an essential role for dimeric Sox10 binding. *J. Neurosci*. 31:8585–8594. doi:10.1523/JNEUROSCI.0659-11.2011.
- Jahn, O., S. Tenzer, and H.B. Werner. 2009. Myelin proteomics: molecular anatomy of an insulating sheath. *Mol. Neurobiol*. 40:55–72. doi:10.1007/s12035-009-8071-2.
- Jakymiw, A., S. Lian, T. Eystathioy, S. Li, M. Satoh, J.C. Hamel, M.J. Fritzler, and E.K.L. Chan. 2005. Disruption of GW bodies impairs mammalian RNA interference. *Nat. Cell Biol*. 7:1267–74. doi:10.1038/ncb1334.
- Jeffrey M. Perkel. 2013. Visiting “Noncodarnia.” *Biotechniques*. 301–304.
- Jepson, S., B. Vought, C.H. Gross, L. Gan, D. Austen, J.D. Frantz, J. Zwahlen, D. Lowe, W. Markland, and R. Krauss. 2012. LINGO-1, a transmembrane signaling protein, inhibits oligodendrocyte differentiation and myelination through intercellular self-interactions. *J. Biol. Chem*. 287:22184–95. doi:10.1074/jbc.M112.366179.
- Jessen, K.R. 2004. Glial cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol*. 36:1861–7. doi:10.1016/j.biocel.2004.02.023.
- Jessen, K.R., A. Brennan, L. Morgan, R. Mirsky, A. Kent, Y. Hashimoto, and J. Gavrilovic. 1994. The Schwann Cell Precursor and Its Fate: A Study of Cell Death and Differentiation during Gliogenesis in Rat Embryonic Nerves. 12:509–527.
- Jessen, K.R., and R. Mirsky. 1999. Schwann cells and their precursors emerge as major regulators of nerve development. *Trends Neurosci*. 22:402–410. doi:10.1016/S0166-2236(98)01391-5.
- Jessen, K.R., and R. Mirsky. 2005. The origin and development of glial cells in peripheral nerves. *Nat. Rev. Neurosci*. 6:671–82. doi:10.1038/nrn1746.
- Jiang, Q., Y. Wang, Y. Hao, L. Juan, M. Teng, X. Zhang, M. Li, G. Wang, and Y. Liu. 2009. miR2Disease: A manually curated database for microRNA deregulation in human disease. *Nucleic Acids Res*. 37:98–104. doi:10.1093/nar/gkn714.

- Jinek, M., and J. a Doudna. 2009. A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference. *Nature*. 457:405–412. doi:10.1038/nature07755.
- Johnston, M., M.-C. Geoffroy, A. Sobala, R. Hay, and G. Hutvagner. 2010. HSP90 Protein Stabilizes Unloaded Argonaute Complexes and Microscopic P-bodies in Human Cells. *Mol. Biol. Cell*. 21:1462–1469. doi:10.1091/mbc.E09.
- Jung, M., E. Kramer, M. Grzenkowski, K. Tang, W. Blakemore, A. Aguzzi, K. Khazaie, K. Chlichlia, G. Von Blankenfeld, H. Kettenmann, and J. Trotter. 1995. Lines of murine oligodendroglial precursor cells immortalized by an activated neu tyrosine kinase show distinct degrees of interaction with axons in vitro and in vivo. *Eur. J. Neurosci*. 7:1245–1265.
- Kamholz, J., J. Toffenetti, and R. a Lazzarini. 1988. Organization and expression of the human myelin basic protein gene. *J. Neurosci. Res*. 21:62–70. doi:10.1002/jnr.490210110.
- Kao, S.-C., H. Wu, J. Xie, C.-P. Chang, J.A. Ranish, I.A. Graef, and G.R. Crabtree. 2009. Calcineurin/NFAT Signaling Is Required for Neuregulin-Regulated Schwann Cell Differentiation. 323:651–654. doi:10.1126/science.1166562.
- Kassmann, C.M., C. Lappe-Siefke, M. Baes, B. Brügger, A. Mildner, H.B. Werner, O. Natt, T. Michaelis, M. Prinz, J. Frahm, and K.-A. Nave. 2007. Axonal loss and neuroinflammation caused by peroxisome-deficient oligodendrocytes. *Nat. Genet*. 39:969–76. doi:10.1038/ng2070.
- Kedde, M., M.J. Strasser, B. Boldajipour, J. a F. Oude Vrielink, K. Slanchev, C. le Sage, R. Nagel, P.M. Voorhoeve, J. van Duijse, U.A. Ørom, A.H.H. Lund, A. Perrakis, E. Raz, R. Agami, J. a F.O. Vrielink, K. Slanchev, C. le Sage, R. Nagel, P.M. Voorhoeve, J. van Duijse, U.A. Ørom, A.H.H. Lund, A. Perrakis, E. Raz, and R. Agami. 2007. RNA-Binding Protein Dnd1 Inhibits MicroRNA Access to Target mRNA. *Cell*. 131:1273–1286. doi:10.1016/j.cell.2007.11.034.
- Kent, T., Y.R. Lapik, and D.G. Pestov. 2009. The 5' external transcribed spacer in mouse ribosomal RNA contains two cleavage sites. 14–20. doi:10.1261/rna.1384709.component.
- Kessarlis, N., M. Fogarty, P. Iannarelli, M. Grist, M. Wegner, and W.D. Richardson. 2006. Competing waves of oligodendrocytes in the forebrain and postnatal elimination of an embryonic lineage. *Nat. Neurosci*. 9:173–9. doi:10.1038/nn1620.
- Kettenmann, H., and B.R. Ransom. 2013. Neuroglia. 3rd ed. Oxford University Press.
- Kim, J., A. Krichevsky, Y. Grad, G.D. Hayes, K.S. Kosik, G.M. Church, and G. Ruvkun. 2004. Identification of many microRNAs that copurify with polyribosomes in mammalian neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 101:360–365. doi:10.1073/pnas.2333854100.
- Kioussi, C., M.K. Gross, and P. Gruss. 1995. Pax3: a paired domain gene as a regulator in PNS myelination. *Neuron*. 15:553–562. doi:10.1016/0896-6273(95)90144-2.
- Klein, C., E. Kra, A. Cardine, B. Schraven, R. Brandt, and J. Trotter. 2002. Process Outgrowth of Oligodendrocytes Is Promoted by Interaction of Fyn Kinase with the Cytoskeletal Protein Tau. 22:698–707.

- Kleitman, N., P. Wood, M.I. Johnson, and R.P. Bunge. 1988. Schwann cell surfaces but not extracellular matrix organized by Schwann cells support neurite outgrowth from embryonic rat retina. *J. Neurosci.* 8:653–663.
- Kondo, T., and M. Raff. 2000. Basic helix-loop-helix proteins and the timing of oligodendrocyte differentiation. 2998:2989–2998.
- Kosturko, L.D., M.J. Maggipinto, G. Korza, J.W. Lee, J.H. Carson, and E. Barbarese. 2006. Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein (hnRNP) E1 Binds to hnRNP A2 and Inhibits Translation of A2 Response Element mRNAs. 17:3521–3533. doi:10.1091/mbc.E05.
- Kosturko, L.D., M.J. Maggipinto, C.D. Sa, J.H. Carson, and E. Barbarese. 2005. The Microtubule-associated Protein Tumor Overexpressed Gene Binds to the RNA Trafficking Protein Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein A2 □. 16:1938–1947. doi:10.1091/mbc.E04.
- Krämer, E.M., C. Klein, T. Koch, M. Boytinck, and J. Trotter. 1999. Compartmentation of Fyn kinase with glycosylphosphatidylinositol- anchored molecules in oligodendrocytes facilitates kinase activation during myelination. *J. Biol. Chem.* 274:29042–29049. doi:10.1074/jbc.274.41.29042.
- Krämer-Albers, E.-M., R. White, E.M. Kramer-Albers, and R. White. 2011. From axon-glia signalling to myelination: the integrating role of oligodendroglial Fyn kinase. *Cell. Mol. Life Sci.* 68:2003–12. doi:10.1007/s00018-010-0616-z.
- Krichevsky, A.M., K.S. King, C.P. Donahue, K. Khrapko, and K.S. Kosik. 2004. A microRNA array reveals extensive regulation of microRNAs during brain development A microRNA array reveals extensive regulation of microRNAs during brain development. 1274–1281. doi:10.1261/rna.5980303.regulation.
- Krichevsky, A.M., and K.S. Kosik. 2001. Neuronal RNA granules: A link between RNA localization and stimulation-dependent translation. *Neuron.* 32:683–696. doi:10.1016/S0896-6273(01)00508-6.
- Kusky, J.O., and M. Colonnier. 1982. A Laminar Analysis of the Number of Neurons , Glia , and Synapses in the Visual Cortex (Area 17) of Adult Macaque Monkeys. 290:278–290.
- Lappe-Siefke, C., S. Goebbels, M. Gravel, E. Nicksch, J. Lee, P.E. Braun, I.R. Griffiths, and K.-A. Nave. 2003. Disruption of Cnp1 uncouples oligodendroglial functions in axonal support and myelination. *Nat. Genet.* 33:366–74. doi:10.1038/ng1095.
- Lau, P., J.D. Verrier, J. a Nielsen, K.R. Johnson, L. Notterpek, and L.D. Hudson. 2008. Identification of dynamically regulated microRNA and mRNA networks in developing oligodendrocytes. *J. Neurosci.* 28:11720–30. doi:10.1523/JNEUROSCI.1932-08.2008.
- Laursen, L.S., C.W. Chan, and C. ffrench-Constant. 2009. An integrin-contactin complex regulates CNS myelination by differential Fyn phosphorylation. *J. Neurosci.* 29:9174–85. doi:10.1523/JNEUROSCI.5942-08.2009.
- Laursen, L.S., C.W. Chan, and C. Ffrench-Constant. 2011. Translation of myelin basic protein mRNA in oligodendrocytes is regulated by integrin activation and hnRNP-K. *J. Cell Biol.* 192:797–811. doi:10.1083/jcb.201007014.

- Le, N., R. Nagarajan, J.Y.T. Wang, T. Araki, R.E. Schmidt, and J. Milbrandt. 2005. Analysis of congenital hypomyelinating Egr2Lo/Lo nerves identifies Sox2 as an inhibitor of Schwann cell differentiation and myelination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102:2596–2601. doi:10.1073/pnas.0407836102.
- 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.* 487:443–448. doi:10.1038/nature11314.
- Leung, A.K.L., J.M. Calabrese, and P.A. Sharp. 2006. Quantitative analysis of Argonaute protein reveals microRNA-dependent localization to stress granules. 103:18125–18130.
- Lewkowicz, P., H. Cwikli ska, M.P. Mycko, M. Cichalewska, M. Domowicz, N. Lewkowicz, a. Jurewicz, and K.W. Selmaj. 2015. Dysregulated RNA-Induced Silencing Complex (RISC) Assembly within CNS Corresponds with Abnormal miRNA Expression during Autoimmune Demyelination. *J. Neurosci.* 35:7521–7537. doi:10.1523/JNEUROSCI.4794-14.2015.
- Liang, X., N. a Draghi, and M.D. Resh. 2004. Signaling from integrins to Fyn to Rho family GTPases regulates morphologic differentiation of oligodendrocytes. *J. Neurosci.* 24:7140–9. doi:10.1523/JNEUROSCI.5319-03.2004.
- Lidow, M.S., and Z. Song. 2001. Primates Exposed to Cocaine In Utero Display Reduced Density and Number of. 275:263–275.
- Lin, S., Y. Huang, L. Zhang, M.Y. Heng, and L.J. Ptá. 2013. MicroRNA-23a promotes myelination in the central nervous system. doi:10.1073/pnas.1317182110/-/DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1317182110.
- Liu, J., F. V Rivas, J. Wohlschlegel, J.R. Yates, R. Parker, and G.J. Hannon. 2005a. A role for the P-body component GW182 in microRNA function. *Nat. Cell Biol.* 7:1261–6. doi:10.1038/ncb1333.
- Liu, J., M.A. Valencia-Sanchez, G.J. Hannon, and R. Parker. 2005b. MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nat. Cell Biol.* 7:719–723. doi:10.1038/ncb1274.
- Lu, Q.R., T. Sun, Z. Zhu, N. Ma, M. Garcia, C.D. Stiles, and D.H. Rowitch. 2002. for Olig Function Indicates a Motor Neuron / Oligodendrocyte Connection. 109:75–86.
- Lu, Q.R., D. Yuk, J. a Alberta, Z. Zhu, I. Pawlitzky, J. Chan, A.P. McMahon, C.D. Stiles, and D.H. Rowitch. 2000. Sonic Hedgehog–Regulated Oligodendrocyte Lineage Genes Encoding bHLH Proteins in the Mammalian Central Nervous System. *Neuron.* 25:317–329. doi:10.1016/S0896-6273(00)80897-1.
- Lyons, D. a, S.G. Naylor, A. Scholze, and W.S. Talbot. 2009. Kif1b is essential for mRNA localization in oligodendrocytes and development of myelinated axons. *Nat. Genet.* 41:854–8. doi:10.1038/ng.376.
- Ma, X., J. Zhou, Y. Zhong, L. Jiang, P. Mu, Y. Li, N. Singh, M. Nagarkatti, and P. Nagarkatti. 2014. Expression, regulation and function of MicroRNAs in multiple sclerosis. *Int. J. Med. Sci.* 11:810–818. doi:10.7150/ijms.8647.

- Manders, E.M.M., F.J. Verbeek, and J.A. Aten. 1993. Measurement of co-localization of objects in dual-colour confocal images. 375–382.
- Martin, G.S. 2001. The hunting of the Src. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2.
- Martini, R., M.H. Mohajeri, S. Kasper, K.P. Giese, and M. Schachner. 1995a. Mice doubly deficient in the genes for P0 and myelin basic protein show that both proteins contribute to the formation of the major dense line in peripheral nerve myelin. *J. Neurosci.* 15:4488–4495.
- Martini, R., J. Zielasek, K. V Toyka, K.P. Giese, and M. Schachner. 1995b. Protein zero (P0)-deficient mice show myelin degeneration in peripheral nerves characteristic of inherited human neuropathies. *Nat. Genet.* 11:281–286. doi:10.1038/ng1195-281.
- Mattick, J.S. 2001. Non-coding RNAs: The architects of eukaryotic complexity. *EMBO Rep.* 2:986–991. doi:10.1093/embo-reports/kve230.
- Mccarthy, D.P., M.H. Richards, and S.D. Miller. 2012. Mouse Models of Multiple Sclerosis: Experimental Autoimmune Encephalomyelitis and Theiler’s Virus-Induced Demyelinating Disease. 900:1–19. doi:10.1007/978-1-60761-720-4.
- McDonald, K.K., A. Aulas, L. Destroismaisons, S. Pickles, E. Beleac, W. Camu, G. a. Rouleau, and C. Vande Velde. 2011. TAR DNA-binding protein 43 (TDP-43) regulates stress granule dynamics via differential regulation of G3BP and TIA-1. *Hum. Mol. Genet.* 20:1400–1410. doi:10.1093/hmg/ddr021.
- Mehler, M.F., P.C. Mabie, G. Zhu, S. Gokhan, and J.A. Kessler. 2000. Developmental Changes in Progenitor Cell Responsiveness to Bone Morphogenetic Proteins Differentially Modulate Progressive CNS Lineage Fate. 10461:74–85.
- Mehler, M.F., and J.S. Mattick. 2006. Non-coding RNAs in the nervous system. *J. Physiol.* 575:333–341. doi:10.1113/jphysiol.2006.113191.
- Meier, C., E. Parmantier, A. Brennan, R. Mirsky, and K.R. Jessen. 1999. Developing Schwann Cells Acquire the Ability to Survive without Axons by Establishing an Autocrine Circuit Involving Insulin-Like Growth Factor , Neurotrophin-3 , and Platelet-Derived Growth Factor-BB. 19:3847–3859.
- Meister, G. 2013. Argonaute proteins: functional insights and emerging roles. *Nat. Rev. Genet.* 14:447–59. doi:10.1038/nrg3462.
- Meister, G., M. Landthaler, A. Patkaniowska, Y. Dorsett, G. Teng, and T. Tuschl. 2004. Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol. Cell.* 15:185–97. doi:10.1016/j.molcel.2004.07.007.
- Mentaberry, A., M. Adesnik, M. Atchison, E.M. Norgård, F. Alvarez, D.D. Sabatini, and D.R. Colman. 1986. Small basic proteins of myelin from central and peripheral nervous systems are encoded by the same gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83:1111–1114. doi:10.1073/pnas.83.4.1111.
- Miron, V.E., T. Kuhlmann, and J.P. Antel. 2011. Cells of the oligodendroglial lineage, myelination, and remyelination. *Biochim. Biophys. Acta.* 1812:184–93. doi:10.1016/j.bbadis.2010.09.010.

- Miska, E. a, E. Alvarez-Saavedra, M. Townsend, A. Yoshii, N. Sestan, P. Rakic, M. Constantine-Paton, and H.R. Horvitz. 2004. Microarray analysis of microRNA expression in the developing mammalian brain. *Genome Biol.* 5:R68. doi:10.1186/gb-2004-5-9-r68.
- Mitew, S., C.M. Hay, H. Peckham, J. Xiao, M. Koenning, and B. Emery. 2014. Mechanisms regulating the development of oligodendrocytes and central nervous system myelin. *Neuroscience.* 276:29–47. doi:10.1016/j.neuroscience.2013.11.029.
- Möbius, W. 2009. Cryopreparation of biological specimens for immunoelectron microscopy. *Ann. Anat.* 191:231–247. doi:10.1016/j.aanat.2008.11.004.
- Morrissey, T.K., A.D. Levi, A. Nuijenst, M.X. Sliwkowskit, and R.P. Bunge. 1995. Axon-induced mitogenesis of human Schwann cells involves heregulin and p185erbB2. 92:1431–1435.
- Moser, J.J., and M.J. Fritzler. 2010. Cytoplasmic ribonucleoprotein (RNP) bodies and their relationship to GW/P bodies. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 42:828–843. doi:10.1016/j.biocel.2009.11.018.
- Mouland, A.J., H. Xu, H. Cui, T.P. Munro, M. Prasol, J. Mercier, D. Rekosh, R. Smith, E. Barbarese, E.A. Cohen, J.H. Carson, and W. Krueger. 2001. RNA Trafficking Signals in Human Immunodeficiency Virus Type 1 RNA Trafficking Signals in Human Immunodeficiency Virus Type 1. doi:10.1128/MCB.21.6.2133.
- Müller, C., N.M. Bauer, I. Schäfer, and R. White. 2013. Making myelin basic protein -from mRNA transport to localized translation. *Front. Cell. Neurosci.* 7:169. doi:10.3389/fncel.2013.00169.
- Munro, T.P., R.J. Magee, G.J. Kidd, J.H. Carson, E. Barbarese, L.M. Smith, and R. Smith. 1999. Mutational analysis of a heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2 response element for RNA trafficking. *J. Biol. Chem.* 274:34389–95.
- Nada, S., T. Yagi, H. Takeda, T. Tokunaga, H. Nakagawa, Y. Ikawa, M. Okada, and S. Aizawa. 1993. Constitutive activation of Src family kinases in mouse embryos that lack Csk. *Cell.* 73:1125–1135. doi:10.1016/0092-8674(93)90642-4.
- Nave, K.-A. 1994. Neurological Mouse Mutants and the Genes of Myelin. *J. Neurosci. Res.* 612:607–612.
- Nave, K.-A. 2010. Myelination and support of axonal integrity by glia. *Nature.* 468:244–52. doi:10.1038/nature09614.
- Nave, K.-A., and H.B. Werner. 2014. Myelination of the nervous system: mechanisms and functions. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 30:503–33. doi:10.1146/annurev-cellbio-100913-013101.
- Nishiyama, A., M. Komitova, R. Suzuki, and X. Zhu. 2009. Polydendrocytes (NG2 cells): multifunctional cells with lineage plasticity. *Nat. Rev. Neurosci.* 10:9–22. doi:10.1038/nrn2495.
- Noble, M., K. Murray, P. Stroobant, M. Waterfield, and M. Riddle. 1988. Platelet-derived growth factor promotes division and motility and inhibits premature differentiation of the oligodendrocyte/type-2 astrocyte progenitor cell. *Nature.* 333:560–562.
- Obermeier, B., R. Daneman, and R.M. Ransohoff. 2013. Development, maintenance and disruption of the blood-brain barrier. *Nat. Med.* 19:1584–96. doi:10.1038/nm.3407.

- Olivier, C., I. Cobos, E. Maria, P. Villegas, N. Spassky, B. Zalc, S. Martinez, and J. Thomas. 2001. Monofocal origin of telencephalic oligodendrocytes in the anterior entopeduncular area of the chick embryo. *1769:1757–1769*.
- Orentas, D.M., J.E. Hayes, K.L. Dyer, and R.H. Miller. 1999. Sonic hedgehog signaling is required during the appearance of spinal cord oligodendrocyte precursors. *2429:2419–2429*.
- Orita, S., K. Henry, E. Mantuano, K. Yamauchi, a. De Corato, T. Ishikawa, M.L. Feltri, L. Wrabetz, a. Gaultier, M. Pollack, M. Ellisman, K. Takahashi, S.L. Gonias, and W.M. Campana. 2013. Schwann Cell LRP1 Regulates Remak Bundle Ultrastructure and Axonal Interactions to Prevent Neuropathic Pain. *J. Neurosci.* 33:5590–5602. doi:10.1523/JNEUROSCI.3342-12.2013.
- Paez, P.M., V. Spreuer, V. Handley, J.-M. Feng, C. Campagnoni, and A.T. Campagnoni. 2007. Increased expression of golli myelin basic proteins enhances calcium influx into oligodendroglial cells. *J. Neurosci.* 27:12690–12699. doi:10.1523/JNEUROSCI.2381-07.2007.
- Parkinson, D.B., A. Bhaskaran, P. Arthur-Farraj, L. a Noon, A. Woodhoo, A.C. Lloyd, M.L. Feltri, L. Wrabetz, A. Behrens, R. Mirsky, and K.R. Jessen. 2008. c-Jun is a negative regulator of myelination. *J. Cell Biol.* 181:625–37. doi:10.1083/jcb.200803013.
- 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.* 27:4233–42. doi:10.1523/JNEUROSCI.0126-07.2007.
- Patzig, J., O. Jahn, S. Tenzer, S.P. Wichert, P. de Monasterio-Schrader, S. Rosfa, J. Kuharev, K. Yan, I. Bormuth, J. Bremer, a. Aguzzi, F. Orfaniotou, D. Hesse, M.H. Schwab, W. Mobius, K. -a. Nave, and H.B. Werner. 2011. Quantitative and Integrative Proteome Analysis of Peripheral Nerve Myelin Identifies Novel Myelin Proteins and Candidate Neuropathy Loci. *J. Neurosci.* 31:16369–16386. doi:10.1523/JNEUROSCI.4016-11.2011.
- Pereira, G.B., A. Dobretsova, H. Hamdan, and P. a. Wight. 2011. Expression of myelin genes: Comparative analysis of Oli-neu and N20.1 oligodendroglial cell lines. *J. Neurosci. Res.* 89:1070–1078. doi:10.1002/jnr.22625.
- Pereira, J. a, R. Baumann, C. Norrmén, C. Somandin, M. Mieke, C. Jacob, T. Lühmann, H. Hall-Bozic, N. Mantei, D. Meijer, and U. Suter. 2010. Dicer in Schwann cells is required for myelination and axonal integrity. *J. Neurosci.* 30:6763–75. doi:10.1523/JNEUROSCI.0801-10.2010.
- Pereira, J. a., F. Lebrun-Julien, and U. Suter. 2012. Molecular mechanisms regulating myelination in the peripheral nervous system. *Trends Neurosci.* 35:123–134. doi:10.1016/j.tins.2011.11.006.
- Petri, S., A. Dueck, G. Lehmann, N. Putz, S. Rüdél, E. Kremmer, and G. Meister. 2011. Increased siRNA duplex stability correlates with reduced off-target and elevated on-target effects. *RNA.* 17:737–749. doi:10.1261/rna.2348111.
- Pfaffl, M.W., G.W. Horgan, and L. Dempfle. 2002. Relative expression software tool (REST ©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *30*.
- Pfeiffer, S., A. Warrington, and R. Bansal. 1993. The oligodendrocyte and its many cellular processes. *191–197*.

- Poliak, S., and E. Peles. 2003. The local differentiation of myelinated axons at nodes of Ranvier. *Nat. Rev. Neurosci.* 4:968–80. doi:10.1038/nrn1253.
- Pringle, N.P., W. Yu, S. Guthrie, H. Roelink, A. Lumsden, A.C. Peterson, and W.D. Richardson. 1996. Determination of Neuroepithelial Cell Fate : Induction of the Oligodendrocyte Lineage by Ventral Midline Cells and Sonic Hedgehog. 42:30–42.
- Quarles, R.H., W.B. Macklin, and P. Morell. 2006. Function, Structure and Biochemistry. 51–71.
- Raju, C.S., C. Go, Y. Nord, O. Hermanson, C. Lo, N. Visa, and G. Castelo-branco. 2008. In Cultured Oligodendrocytes the A / B-type hnRNP CBF-A Accompanies MBP mRNA Bound to mRNA Trafficking Sequences. 19:3008–3019. doi:10.1091/mbc.E07.
- Raphael, A.R., D. a. Lyons, and W.S. Talbot. 2011. ErbB signaling has a role in radial sorting independent of Schwann cell number. *Glia.* 59:1047–1055. doi:10.1002/glia.21175.
- Rawat, A., and R. Nagaraj. 2010. Determinants of membrane association in the SH4 domain of Fyn: roles of N-terminus myristoylation and side-chain thioacylation. *Biochim. Biophys. Acta.* 1798:1854–63. doi:10.1016/j.bbamem.2010.06.009.
- Readhead, C., and L. Hood. 1990. The Dysmyelinating Mouse Mutations Shiverer (shi) and Myelin Deficient (shi rata). 20:213–234.
- Rehwinkel, J.A.N., I. Behm-ansmant, D. Gatfield, and E. Izaurralde. 2005. A crucial role for GW182 and the DCP1 : DCP2 decapping complex in miRNA-mediated gene silencing. 1640–1647. doi:10.1261/rna.2191905.van.
- Relucio, J., M.J. Menezes, Y. Miyagoe-Suzuki, S. Takeda, and H. Colognato. 2012. Laminin regulates postnatal oligodendrocyte production by promoting oligodendrocyte progenitor survival in the subventricular zone. *Glia.* 60:1451–67. doi:10.1002/glia.22365.
- Resh, M.D. 1998. Fyn, a Src family tyrosine kinase. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 30:1159–1162. doi:10.1016/S1357-2725(98)00089-2.
- Robertson, C.P., M.M. Braun, and H. Roelink. 2004. Sonic hedgehog patterning in chick neural plate is antagonized by a Wnt3-like signal. *Dev. Dyn.* 229:510–9. doi:10.1002/dvdy.10501.
- Roskoski, R. 2004. Src protein-tyrosine kinase structure and regulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 324:1155–64. doi:10.1016/j.bbrc.2004.09.171.
- Rowitch, D.H., and A.R. Kriegstein. 2010. Developmental genetics of vertebrate glial-cell specification. *Nature.* 468:214–22. doi:10.1038/nature09611.
- Rüdel, S., Y. Wang, R. Lenobel, R. Körner, H.-H. Hsiao, H. Urlaub, D. Patel, and G. Meister. 2011. Phosphorylation of human Argonaute proteins affects small RNA binding. *Nucleic Acids Res.* 39:2330–43. doi:10.1093/nar/gkq1032.
- Sakry, D., K. Karram, and J. Trotter. 2011. Synapses between NG2 glia and neurons. *J. Anat.* 219:2–7. doi:10.1111/j.1469-7580.2011.01359.x.

- Sakry, D., A. Neitz, J. Singh, R. Frischknecht, D. Marongiu, F. Binamé, S.S. Perera, K. Endres, B. Lutz, K. Radyushkin, J. Trotter, and T. Mittmann. 2014. Oligodendrocyte Precursor Cells Modulate the Neuronal Network by Activity-Dependent Ectodomain Cleavage of Glial NG2. *PLoS Biol.* 12:e1001993. doi:10.1371/journal.pbio.1001993.
- Savas, J.N., B. Ma, K. Deinhardt, B.P. Culver, S. Restituto, L. Wu, J.G. Belasco, M. V Chao, and N. Tanese. 2010. A role for huntington disease protein in dendritic RNA granules. *J. Biol. Chem.* 285:13142–53. doi:10.1074/jbc.M110.114561.
- Scherer, S.S., Y.T. Xu, P.G. Bannerman, D.L. Sherman, and P.J. Brophy. 1995. Periaxin expression in myelinating Schwann cells: modulation by axon-glia interactions and polarized localization during development. *Development.* 121:4265–4273.
- Schmid, R.S., B. Mcgrath, B.E. Berechid, B. Boyles, M. Marchionni, S. Nenad, and E.S. Anton. 2003. Neuregulin 1 – erbB2 signaling is required for the establishment of radial glia and their transformation into astrocytes in cerebral cortex. 100:2–7.
- Scholz, J., M.C. Klein, T.E.J. Behrens, and H. Johansen-Berg. 2009. Training induces changes in white-matter architecture. *Nat. Neurosci.* 12:1370–1. doi:10.1038/nn.2412.
- Schraivogel, D., and G. Meister. 2014. Import routes and nuclear functions of Argonaute and other small RNA-silencing proteins. *Trends Biochem. Sci.* 39:420–431. doi:10.1016/j.tibs.2014.07.004.
- Schumacher, M., R. Hussain, N. Gago, J.-P. Oudinet, C. Mattern, and A.M. Ghomari. 2012. Progesterone synthesis in the nervous system: implications for myelination and myelin repair. *Front. Neurosci.* 6:10. doi:10.3389/fnins.2012.00010.
- Shah, N.M., A.K. Groves, and D.J. Anderson. 1996. Alternative Neural Crest Cell Fates Are Instructively Promoted by TGF β Superfamily Members. 85:331–343.
- Shah, N.M., M.A. Marchionni, P. Stroobant, and D.J. Anderson. 1994. Glial Growth Factor Restricts Mammalian Neural Crest Stem Cells to a Glial Fate. 77:349–360.
- Shen, J., W. Xia, Y.B. Khotskaya, L. Huo, K. Nakanishi, S.-O. Lim, Y. Du, Y. Wang, W.-C. Chang, C.-H. Chen, J.L. Hsu, Y. Wu, Y.C. Lam, B.P. James, X. Liu, C.-G. Liu, D.J. Patel, and M.-C. Hung. 2013. EGFR modulates microRNA maturation in response to hypoxia through phosphorylation of AGO2. *Nature.* 497:383–7. doi:10.1038/nature12080.
- Sheth, U., and R. Parker. 2003. Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies. *Science.* 300:805–808. doi:10.1126/science.1082320.
- Smirnova, L., A. Gräfe, A. Seiler, S. Schumacher, R. Nitsch, and F.G. Wulczyn. 2005. Regulation of miRNA expression during neural cell specification. *Eur. J. Neurosci.* 21:1469–1477. doi:10.1111/j.1460-9568.2005.03978.x.
- Smith-Slatas, C., and E. Barbarese. 2000. Myelin basic protein gene dosage effects in the PNS. *Mol. Cell. Neurosci.* 15:343–54. doi:10.1006/mcne.1999.0829.
- Snaidero, N., W. Möbius, T. Czopka, L.H.P. Hekking, C. Mathisen, D. Verkleij, S. Goebbels, J. Edgar, D. Merkler, D. a Lyons, K.-A. Nave, and M. Simons. 2014. Myelin membrane wrapping of CNS axons

- by PI(3,4,5)P3-dependent polarized growth at the inner tongue. *Cell*. 156:277–90. doi:10.1016/j.cell.2013.11.044.
- Sobko, A., A. Peretz, and B. Attali. 1998. Constitutive activation of delayed-rectifier potassium channels by a Src family tyrosine kinase in Schwann cells. *EMBO J.* 17:4723–4734. doi:10.1093/emboj/17.16.4723.
- Spassky, N., F. De Castro, B. Le Bras, K. Heydon, E. Bloch-gallego, A. Che, and B. Zalc. 2002. Directional Guidance of Oligodendroglial Migration by Class 3 Semaphorins and Netrin-1. 22:5992–6004.
- Staugaitis, S.M., P.R. Smith, and D.R. Colman. 1990. Expression of myelin basic protein isoforms in nonglial cells. *J Cell Biol.* 110:1719–1727.
- Stuchbury, G., and G. Münch. 2010. Optimizing the generation of stable neuronal cell lines via pre-transfection restriction enzyme digestion of plasmid DNA. *Cytotechnology*. 62:189–94. doi:10.1007/s10616-010-9273-1.
- Susuki, K., K.-J. Chang, D.R. Zollinger, Y. Liu, Y. Ogawa, Y. Eshed-Eisenbach, M.T. Dours-Zimmermann, J. a Osés-Prieto, A.L. Burlingame, C.I. Seidenbecher, D.R. Zimmermann, T. Oohashi, E. Peles, and M.N. Rasband. 2013. Three mechanisms assemble central nervous system nodes of Ranvier. *Neuron*. 78:469–82. doi:10.1016/j.neuron.2013.03.005.
- Syroid, D.E., P.J. Maycox, M. Soilu-Hänninen, S. Petratos, T. Bucci, P. Burrola, S. Murray, S. Cheema, K.F. Lee, G. Lemke, and T.J. Kilpatrick. 2000. Induction of postnatal schwann cell death by the low-affinity neurotrophin receptor in vitro and after axotomy. *J. Neurosci.* 20:5741–5747. doi:20/15/5741 [pii].
- Tasaki, I. 1939. The electro-saltatory transmission of the nerve impulse and the effect of narcosis upon the nerve fiber. *J. Physiol.* 127:211–227.
- Taveggia, C., M.L. Feltri, and L. Wrabetz. 2011. Signals to promote myelin formation and repair. 6:276–287. doi:10.1038/nrneurol.2010.37.Signals.
- Tekki-kessarlis, N., R. Woodruff, A.C. Hall, W. Gaffield, S. Kimura, C.D. Stiles, D.H. Rowitch, and W.D. Richardson. 2001. Hedgehog-dependent oligodendrocyte lineage specification in the telencephalon. 2554:2545–2554.
- Trapp, B.D., T. Moench, M. Pulley, E. Barbosa, G. Tennekoon, and J. Griffin. 1987. Spatial segregation of mRNA encoding myelin-specific proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84:7773–7.
- Trotter, J., D. Bitter-Suermann, and M. Schachner. 1989. Differentiation-regulated loss of the polysialylated embryonic form and expression of the different polypeptides of the neural cell adhesion molecule by cultured oligodendrocytes and myelin. *J. Neurosci. Res.* 22:369–383. doi:10.1002/jnr.490220402.
- Trotter, J., and M. Schachner. 1989. Cells positive for the O4 surface antigen isolated by cell sorting are able to differentiate into astrocytes or oligodendrocytes. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 46:115–122. doi:10.1016/0165-3806(89)90148-X.

- Vallstedt, A., J.M. Klos, and J. Ericson. 2005. Multiple dorsoventral origins of oligodendrocyte generation in the spinal cord and hindbrain. *Neuron*. 45:55–67. doi:10.1016/j.neuron.2004.12.026.
- Vasudevan, S., and J. a. Steitz. 2007. AU-Rich-Element-Mediated Upregulation of Translation by FXR1 and Argonaute 2. *Cell*. 128:1105–1118. doi:10.1016/j.cell.2007.01.038.
- Verrier, J.D., P. Lau, L. Hudson, A.K. Murashov, R. Renne, and L. Notterpek. 2009. Peripheral myelin protein 22 is regulated post-transcriptionally by miRNA-29a. *Glia*. 57:1265–79. doi:10.1002/glia.20846.
- Viader, A., L.-W. Chang, T. Fahrner, R. Nagarajan, and J. Milbrandt. 2011. MicroRNAs Modulate Schwann Cell Response to Nerve Injury by Reinforcing Transcriptional Silencing of Dedifferentiation-Related Genes. *J. Neurosci*. 31:17358–17369. doi:10.1523/JNEUROSCI.3931-11.2011.
- Voyvodic, J.T. 1989. Target size regulates calibre and myelination of sympathetic axons. *Nature*.
- Wake, H., P.R. Lee, and R.D. Fields. 2011. Control of local protein synthesis and initial events in myelination by action potentials. *Science*. 333:1647–51. doi:10.1126/science.1206998.
- Wang, D., Z. Zhang, E.O. Loughlin, T. Lee, S. Houel, O. Carroll, A. Tarakhovsky, N.G. Ahn, and R. Yi. 2012. Quantitative functions of Argonaute proteins in mammalian development. 693–704. doi:10.1101/gad.182758.111.and.
- Wang, Y., G. Lacroix, J. Haines, E. Doukhanine, G. Almazan, and S. Richard. 2010. The QKI-6 RNA binding protein localizes with the MBP mRNAs in stress granules of glial cells. *PLoS One*. 5. doi:10.1371/journal.pone.0012824.
- Wang, Z., H. Colognato, and C. Ffrench-constant. 2007. Contrasting Effects of Mitogenic Growth Factors on Myelination in Neuron – Oligodendrocyte Co-cultures. 545:537–545. doi:10.1002/glia.
- Watabe, K., T. Fukuda, J. Tanaka, H. Honda, K. Toyohara, and O. Sakai. 1995. Spontaneously immortalized adult mouse Schwann cells secrete autocrine and paracrine growth-promoting activities. *J. Neurosci. Res*. 41:279–290. doi:10.1002/jnr.490410215.
- Wei, H., B. Zhou, F. Zhang, Y. Tu, Y. Hu, B. Zhang, and Q. Zhai. 2013. Profiling and identification of small rDNA-derived RNAs and their potential biological functions. *PLoS One*. 8:e56842. doi:10.1371/journal.pone.0056842.
- White, R., C. Gonsior, N.M. Bauer, E.-M. Krämer-Albers, H.J. Luhmann, and J. Trotter. 2012. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) F is a novel component of oligodendroglial RNA transport granules contributing to regulation of myelin basic protein (MBP) synthesis. *J. Biol. Chem*. 287:1742–54. doi:10.1074/jbc.M111.235010.
- White, R., C. Gonsior, E.-M. Krämer-Albers, N. Stöhr, S. Hüttelmaier, and J. Trotter. 2008. Activation of oligodendroglial Fyn kinase enhances translation of mRNAs transported in hnRNP A2-dependent RNA granules. *J. Cell Biol*. 181:579–86. doi:10.1083/jcb.200706164.

- White, R., and E.-M. Krämer-Albers. 2014. Axon-glia interaction and membrane traffic in myelin formation. *Front. Cell. Neurosci.* 7:284. doi:10.3389/fncel.2013.00284.
- Wood, D.D., G.J. Vella, and M. a. Moscarello. 1984. Interaction between human myelin basic protein and lipophilin. *Neurochem. Res.* 9:1523–1531. doi:10.1007/BF00964678.
- Woodhoo, A., M.B.D. Alonso, A. Droggiti, M. Turmaine, M. D’Antonio, D.B. Parkinson, D.K. Wilton, R. Al-Shawi, P. Simons, J. Shen, F. Guillemot, F. Radtke, D. Meijer, M.L. Feltri, L. Wrabetz, R. Mirsky, and K.R. Jessen. 2009. Notch controls embryonic Schwann cell differentiation, postnatal myelination and adult plasticity. *Nat. Neurosci.* 12:839–847. doi:10.1038/nn.2323.
- Wrabetz, L., M.L. Feltri, A. Quattrini, D. Imperiale, S. Previtali, M. D’Antonio, R. Martini, X. Yin, B.D. Trapp, L. Zhou, S.Y. Chiu, and A. Messing. 2000. P0 glycoprotein overexpression causes congenital hypomyelination of peripheral nerves. *J. Cell Biol.* 148:1021–1033. doi:10.1083/jcb.148.5.1021.
- Wu, P.H., M. Isaji, and R.W. Carthew. 2013. Functionally diverse MicroRNA effector complexes are regulated by extracellular signaling. *Mol. Cell.* 52:113–123. doi:10.1016/j.molcel.2013.08.023.
- Yang, M., A.D.D. Haase, F.-K. Huang, G. Coulis, K.D.D. Rivera, B.C.C. Dickinson, C.J.J. Chang, D.J.J. Pappin, T.A.A. Neubert, G.J.J. Hannon, B. Boivin, and N.K.K. Tonks. 2014. Dephosphorylation of Tyrosine 393 in Argonaute 2 by Protein Tyrosine Phosphatase 1B Regulates Gene Silencing in Oncogenic RAS-Induced Senescence. *Mol. Cell.* 55:782–790. doi:10.1016/j.molcel.2014.07.018.
- Yeung, M.S.Y., S. Zdunek, O. Bergmann, S. Bernard, M. Salehpour, K. Alkass, S. Perl, J. Tisdale, G. Possnert, L. Brundin, H. Druid, and J. Frisé. 2014. Dynamics of Oligodendrocyte Generation and Myelination in the Human Brain. *Cell.* 159:766–774. doi:10.1016/j.cell.2014.10.011.
- Yu, W.-M., M.L. Feltri, L. Wrabetz, S. Strickland, and Z.-L. Chen. 2005. Schwann cell-specific ablation of laminin gamma1 causes apoptosis and prevents proliferation. *J. Neurosci.* 25:4463–4472. doi:10.1523/JNEUROSCI.5032-04.2005.
- Yu, Y., Y. Chen, B. Kim, H. Wang, C. Zhao, X. He, L. Liu, W. Liu, L.M.N. Wu, M. Mao, J.R. Chan, J. Wu, and Q.R. Lu. 2013. Olig2 targets chromatin remodelers to enhancers to initiate oligodendrocyte differentiation. *Cell.* 152:248–61. doi:10.1016/j.cell.2012.12.006.
- Yun, B., A. Andereg, D. Menichella, L. Wrabetz, M.L. Feltri, and R. Awatramani. 2010. MicroRNA-deficient Schwann cells display congenital hypomyelination. *J. Neurosci.* 30:7722–7728. doi:10.1523/JNEUROSCI.0876-10.2010.MicroRNA.
- Zeng, Y., H. Sankala, X. Zhang, and P.R. Graves. 2008. Phosphorylation of Argonaute 2 at serine-387 facilitates its localization to processing bodies. *Biochem. J.* 413:429–436. doi:10.1042/BJ20080599.
- Zhao, X., X. He, X. Han, Y. Yu, F. Ye, Y. Chen, T. Hoang, X. Xu, H. Li, M. Xin, F. Wang, B. Appel, and Q.R. Lu. 2011. MicroRNA-Mediated Control of Oligodendrocyte Differentiation. 65:612–626. doi:10.1016/j.neuron.2010.02.018.MicroRNA-Mediated.
- Zheng, K., H. Li, H. Huang, and M. Qiu. 2012. MicroRNAs and glial cell development. *Neuroscientist.* 18:114–8. doi:10.1177/1073858411398322.

- Zheng, K., H. Li, Y. Zhu, Q. Zhu, and M. Qiu. 2010. MicroRNAs are essential for the developmental switch from neurogenesis to gliogenesis in the developing spinal cord. *J. Neurosci.* 30:8245–50. doi:10.1523/JNEUROSCI.1169-10.2010.
- Zuchero, J.B., M. Fu, S.A. Sloan, A. Ibrahim, A. Olson, A. Zaremba, J.C. Dugas, S. Wienbar, A.V. Caprariello, C. Kantor, D. Leonoudakus, K. Lariosa-Willingham, G. Kronenberg, K. Gertz, S.H. Soderling, R.H. Miller, and B.A. Barres. 2015. CNS Myelin Wrapping Is Driven by Actin Disassembly. *Dev. Cell.* 34:152–167. doi:10.1016/j.devcel.2015.06.011.



10 Anhang

10.1 Quantifizierung der Colokalisation von Ago2 mit hnRNP A2 bzw. Fyn-Kinase

Es wurde die Colokalisation innerhalb der Cofärbung von Ago2 mit hnRNP A2 bzw. Fyn-Kinase in primären Oligodendrozyten quantifiziert (vergleiche Abbildung 28 und Abbildung 31). Hierzu wurde der Mander's Korrelations-Koeffizient (MCC) und der Pearson's Korrelations-Koeffizient (PCC) berechnet, sowie ein Coste's Test durchgeführt. Es wurden sechs voneinander unabhängige Experimente durchgeführt.

Quantifizierung der Colokalisation Ago2 und hnRNP A2

A Tabelle des Mander's Korrelations-Koeffizienten

Primäre Oligodendrozyten 5DIV
Fraktion von A2 überlagert mit Ago2

	n1	n2	n3	n4	n5	n6	Mittelwert	SEM
MCC (M2)	0.465	0.637	0.930	0.918	0.967	0.894	0.802	0.083

80,18% Colokalisation

B Tabelle des Pearson's Korrelations-Koeffizienten und Coste's test

	Costes' randomization based colocalization				
	MCC (M1)	PCC	r (original)	r (randomized)	P-value
n1	0.601	0.74	0.74	0.0±0.0050	100%
n2	0.472	0.636	0.636	0.0±0.0050	100%
n3	0.653	0.857	0.857	0.0±0.0030	100%
n4	0.786	0.927	0.927	0.0±0.0040	100%
n5	0.453	0.823	0.823	0.0±0.0040	100%
n6	0.554	0.74	0.74	0.0±0.0030	100%

C Beispiel-Ausschnitte für die Quantifizierung

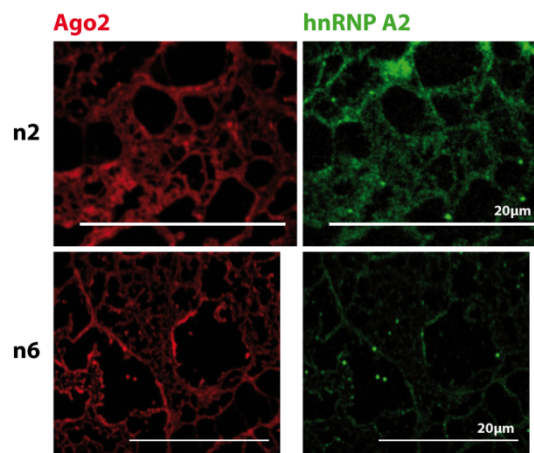


Abbildung 43: Auswertung der Quantifizierung der Colokalisation von Ago2 und hnRNP A2

A: Zusammenfassung der Auswertung mittels Mander's Korrelations-Koeffizienten (MCC) M2.

B: Zusammenfassung der Auswertung mittels Mander's Korrelations-Koeffizienten (MCC) M1, Pearson's Korrelations-Koeffizienten (PCC) und Coste's Test (*Coste's randomization based colocalization*).

C: Zwei Beispiele der Bildausschnitte, welche für die Quantifizierung der Colokalisation verwendet wurden.

Quantifizierung der Colocalization Ago2 und Fyn kinase

A Tabelle des Mander's Korrelations-Koeffizienten

Primäre Oligodendrozyten 3DIV
Fraktion von Fyn überlagert mit Ago2

	n1	n2	n3	n4	n5	n6	Mittelwert	SEM
Manders coefficient (M2)	0.689	0.632	0.963	0.802	0.793	0.708	0.765	0.048

76,45% Colocalisation

B Tabelle des Pearson's Korrelations-Koeffizienten und Coste's test

	MCC (M1)	PCC	Costes' randomization based colocalization		
			r (original)	r (randomized)	P-value
n1	0.6305	0.717	0.716	0.0±0.0185	100%
n2	0.66	0.748	0.748	0.0±0.0050	100%
n3	0.581	0.770	0.770	0.0±0.0050	100%
n4	0.718	0.890	0.890	0.0±0.0040	100%
n5	0.862	0.902	0.902	0.0±0.0040	100%
n6	0.649	0.820	0.820	0.0±0.0040	100%

C Beispiel-Ausschnitte für die Quantifizierung

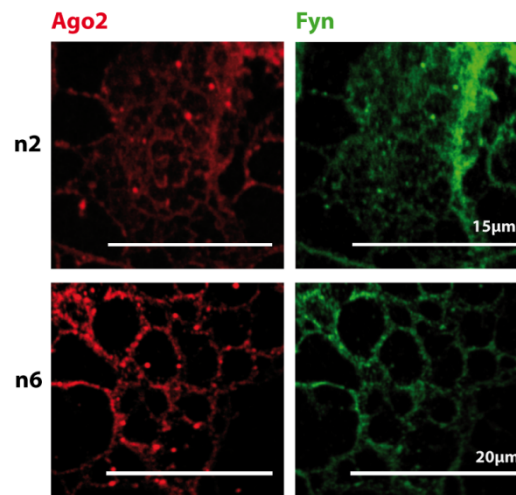


Abbildung 44: Auswertung der Quantifizierung der Colocalisation von Ago2 und Fyn-Kinase

A: Zusammenfassung der Auswertung mittels Mander's Korrelations-Koeffizienten (MCC) M2.

B: Zusammenfassung der Auswertung mittels Mander's Korrelations-Koeffizienten (MCC) M1, Pearson's Korrelations-Koeffizienten (PCC) und Coste's Test (*Coste's randomization based colocalization*).

C: Zwei Beispiele der Bildausschnitte, welche für die Quantifizierung der Colocalisation verwendet wurden.





