

Aus der Abteilung Neurologie
(Prof. Dr. med. M. Bähr)
im Zentrum Neurologische Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Charakterisierung der subzellulären Lokalisation von
Myelinproteinen in der Shiverer-Maus.

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Christine Elisabeth Winter
aus
Bad Soden am Taunus

Göttingen 2009

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	3
1.1	Kontext dieser Arbeit	3
1.2	Die myelinisierende Zelle des zentralen Nervensystems	5
1.2.1	Embryonale Herkunft	5
1.2.2	Vorstufen und Differenzierung der Oligodendrozyten	6
1.3	Zusammensetzung des Myelins	9
1.3.1	Struktur und allgemeine Zusammensetzung	9
1.3.2	Myelinproteine	11
1.3.3	Myelinlipide	15
1.4	Der Prozess der Myelinisierung im Detail	16
1.4.1	Allgemeine Transportmechanismen	16
1.4.2	Transport spezieller Myelinkomponenten	20
1.4.3	Polarisierung des Myelins	25
1.5	Gestörte Myelinisierung	27
1.5.1	Humane Erkrankungen mit Defekten der Myelinscheide	27
1.5.2	Murine Modelle dysmyelinisierender Erkrankungen	29
1.6	Ziele dieser Arbeit	32
2	Material und Methoden	33
2.1	Verwendete Materialien in alphabetischer Reihenfolge	33
2.2	Allgemeine Puffer und Lösungen	38
2.3	Verwendete Antikörper	40
2.3.1	Erstantikörper	40
2.3.2	Zweitantikörper	41
2.4	Tiere und Gehirnpräparation	41
2.4.1	Erstellen von Hirnhomogenisat	41
2.4.2	Erstellen von Gefrierschnitten	42
2.4.3	Gefrierschnitte der Squalen-Synthase-Knockout-Maus	42
2.5	Zellkulturen	43
2.5.1	Wachstumsbedingungen	43
2.5.2	Medien	43
2.6	Zelllinien	44
2.6.1	<i>Oli neu</i> -Zellen	44
2.6.2	Primäre Oligodendrozyten der Maus, Gewinnung und Kultur	44
2.7	Immunofluoreszenzfärbungen	45
2.7.1	Immunofluoreszenzfärbung von kultivierten Zellen	45

2.7.2	Immunofluoreszenzfärbung von Gefrierschnitten der Mäusegehirne	45
2.7.3	Immunofluoreszenzfärbung von Objektträger-fixierten Gehirnschnitten	46
2.8	Fluoreszenzmikroskopie	46
2.9	Extraktion von Myelinkomponenten mit <i>CHAPS</i>	47
2.10	SDS-PAGE-Gelelektrophorese und Western-Blot-Analyse	48
2.10.1	SDS-PAGE-Gelelektrophorese	48
2.10.2	Western-Blot-Analyse	48
2.10.3	Western-Blot-Analyse von Hirnhomogenisat	49
2.10.4	Western-Blot-Analyse von <i>CHAPS</i> -Extrakten	49
3	Ergebnisse	50
3.1	Grundlegende Beobachtungen und Arbeitshypothese	50
3.2	Vergleichende Immunofluoreszenzfärbung von Kryoschnitten der Shiverer-Mauslinie und Wildtyp-Mäusen	50
3.3	Immunofluoreszenzfärbungen für PLP und MAG an Wildtyp-Gehirnschnitten der Altersstufen P7, P14 und P21	55
3.4	Identifikation des Akkumulate-enthaltenden Zelltyps	59
3.5	Beobachtung an Squalen-Synthase-Knockout-Mäusen	63
3.6	<i>CHAPS</i> -Extraktion von Gehirnhomogenisat und Western-Blot-Analyse	64
4	Diskussion	74
4.1	Die Proteine PLP, MAG und MOG akkumulieren vesikulär in Shiverer-Oligodendrozyten	74
4.2	Vesikuläre Protein-Akkumulation ist ein altersabhängiges Charakteristikum	77
4.3	Das Shiverer-Gehirn weist eine moderate Vermehrung der Mikrogliazellen auf	78
4.4	Kaum Protein-Akkumulate in der Squalen-Synthase-Knockout-Maus	79
4.5	Die Proteinverteilung in <i>CHAPS</i> -Gradienten differiert zwischen Shiverern und Wildtyp-Mäusen	81
4.6	Perspektiven	82
5	Zusammenfassung	84
6	Anhang: Abkürzungen	86
7	Literaturverzeichnis	88

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Kontext dieser Arbeit

Die folgende Arbeit befasst sich mit Myelin, der Hüllscheide der Nervenfasern. Woraus besteht diese einzigartige Substanz? Welche Funktionen hat sie und was geschieht, wenn das Zusammenspiel der diversen Komponenten gestört wird? Seit Jahrzehnten stellen sich unzählige Wissenschaftler Fragen wie diese. Gibt man *Myelin* als Suchbegriff in Internetsuchmaschinen wie Google ein, so ergeben sich über eine Millionen Treffer. Die Anfänge der Myelinforschung waren ungleich bescheidener. Myelin wurde 1854 erstmals von dem Pathologen Rudolf Virchow (1821 - 1902) mittels Lichtmikroskopie an Gewebeschnitten beschrieben (Virchow 1854). Er prägte den Begriff Nerven kitt, der als Neuroglia bis heute überdauert hat (zusammenfassend in Baumann und Pham-Dinh 2001). Wegweisende strukturelle Analysen folgten durch den Pariser Pathologen Louis-Antoine Ranvier (1835-1922), nach dem der sog. Ranviersche Knoten (siehe 1.3.1) benannt wurde (Ranvier 1871).

Die wichtigsten Glia-Zellen wurden zudem mittels Gold- bzw. Silberimprägnationsmethoden von Ramon y Cajal (1852-1934) und Rio Hortega (1882-1945) beschrieben (Cajal 1913; Hortega 1928). Nachdem lange umstritten war, welcher Zelltyp das Myelin des zentralen Nervensystems bildet, gelang 1962 Mary Bartlett Bunge und Richard Bunge mittels elektronenmikroskopischer Aufnahmen der Nachweis, dass zelluläre Fortsätze der Oligodendrozyten die Markscheiden bilden (Bunge et al. 1962).

Ab einem Axondurchmesser von $1\mu\text{m}$ im peripheren Nervensystem (Rushton 1951) und $0,2\mu\text{m}$ im zentralen Nervensystem (Ritchie 1982) bewirkt die Ummantelung eine Erhöhung der Nervenleitgeschwindigkeit durch Herabsetzung des elektrischen Widerstandes. So leiten etwa die dicken, umhüllten Nervenfasern zwischen Rückenmark

und Muskulatur der Extremitäten, die so genannten A α -Fasern, mit einer durchschnittlichen Geschwindigkeit von 120m/s (Lüllmann-Rauch 2003). Es ist leicht nachvollziehbar, dass sich diese enorme Leistung phylogenetisch erst relativ spät durchsetzte. So gilt Myelin, insbesondere das kompakte Myelin (siehe 1.3.1) als spezifisch für Wirbeltiere (Baumann und Pham-Dinh 2001).

Der besonderen Funktion des Myelins entsprechend, unterscheidet sich die molekulare Zusammensetzung der Substanz deutlich von der anderer Zellmembranen. Myelin ist stark angereichert an Glykosphingolipiden und Cholesterin. Insgesamt machen Lipide 70% des Trockengewichtes aus, Proteine nur 30% (Norton und Poduslo 1973; Baumann und Pham-Dinh 2001). In Zellmembranen hingegen findet sich ein durchschnittliches Verhältnis im Trockengewicht von 35-40% Lipid und 60-65% Protein, wobei die Lipid- und Protein-Einzelkomponenten, etwa Sphingolipide und Cholesterin, wiederum anteilig anders vertreten sind als im Myelin.

Doch wer produziert diese einzigartige Isolierschicht? Seit dem deutschen Anatomen und Physiologen Theodor Schwann (1810-1882) ist bekannt, dass im peripheren Nervensystem die sog. Schwann-Zellen Myelin synthetisieren. Im zentralen Nervensystem, d.h. in Gehirn und Rückenmark, übernehmen Oligodendrozyten diese Funktion. Die Syntheseleistung ist dabei kaum zu überschätzen: Ein einzelner Oligodendrozyt der Ratte produziert in der aktiven Phase der Myelinisierung pro Tag $5000\mu\text{m}^2$ Myelin (Pfeiffer et al. 1993). Es ist daher evident, von welcher immensen Bedeutung effiziente und geregelte Transportmechanismen für die myelinisierende Zelle sind. Sowohl Schwann-Zellen als auch Oligodendrozyten werden der Gruppe der Glia-Zellen zugeordnet. Während man Glia lange Zeit als eine Population von Helferzellen ansah, die Neurone stützen und versorgen, zeigte die Forschung der letzten Jahre deutlich, dass Glia-Zellen in ihren Funktionen als ebenso komplex zu betrachten sind wie Neurone. Die Wechselwirkung zwischen Neuron und Glia-Zelle ist für Entstehung und Funktionalität der Myelinscheide unverzichtbar und ein komplexes Netz an Signaltransduktionskaskaden, welches bisher nur in Ansätzen bekannt ist, verbindet beide Zelltypen (vgl. Review von Boiko und Winckler 2006 sowie Review von Barres und Raff 1999).

Was geschieht, wenn einzelne Komponenten dieser komplexen Wechselwirkungen gestört sind, zeigen diverse Mausmutantenlinien, wie etwa die Shiverer- (Roach et al. 1985) oder Jimpy-Linie (Skoff und Knapp 1990). Während der ersteren ein Myelinprotein fehlt, so ist in der zweiten Linie ein anderes Protein in seiner Struktur und Funktion verändert. In beiden Fällen sind die Auswirkungen gravierend:

progressive neurologische Defizite und vorzeitiger Tod der Tiere. Doch auch beim Menschen sind Erkrankungen bekannt, deren pathologischer Prozess an der Myelinscheide stattfindet. Die Multiple Sklerose sei als wohl bekanntestes Beispiel einer die Nervenscheiden zerstörenden Erkrankung genannt. Doch auch seltenere Erkrankungen, wie etwa die Pelizaeus-Merzbacher-Erkrankung, welche in der Regel auf Duplikation des Gens eines Myelinproteins beruht, stehen im Fokus des klinischen Interesses der Myelinforschung. Die im Folgenden beschriebene Forschungsarbeit beschäftigt sich insbesondere mit Aspekten des Substanztransportes in Oligodendrozyten der Maus.

1.2 Die myelinisierende Zelle des zentralen Nervensystems

1.2.1 Embryonale Herkunft

Die Myelinogenese im ZNS des Menschen beginnt in der Fetalzeit und erstreckt sich über einen Zeitraum von zwei Dekaden. Zum Zeitpunkt der Geburt sind viele Faserzüge noch nicht myelinisiert, doch verläuft die Myelinbildung in den folgenden zwei Jahren rapide. Dabei beginnt die cerebrale Myelinisierung kaudal und schreitet nach einem festen Programm nach rostral fort (Lüllmann-Rauch 2003). Dieses Programm ist so spezifisch, dass das Alter menschlicher Feten allein durch Art und Lokalisation der bereits myelinisierten Trakte definiert werden kann (Friede 1973).

Bei der Maus beginnt die Myelinisierung zum Zeitpunkt der Geburt im Rückenmark und wird zwischen dem 45. und 60. Tag post partum (pp) abgeschlossen (Baumann und Pham-Dinh 2001). Die Vorläuferzellen von Oligodendrozyten des Gehirns wandern im Zuge der Embryonalentwicklung aus dem Neuralepithel des Neuralrohres, genauer gesagt aus der ventralen Subventrikularzone (SVZ), aus (Sadler 2003). Die Subventrikularzone der Maus entsteht am 11. Tag nach der Konzeption und persistiert in geringem Ausmaß bis ins Erwachsenenalter hinein (Sturrock und Smart 1980).

Beim menschlichen Embryo entsteht das Neuralrohr, das ektodermaler Herkunft ist, in der dritten Entwicklungswoche. Seine Wand wird vom mehrreihigen, noch undifferenzierten Neuralepithel gebildet. Nach einer Phase rascher mitotischer Aktivität entstehen die Neuroblasten als Vorläuferzellen der Neurone und etwas später die Glioblasten, welche den Großteil der primitiven Stützzellen des Neuralepithels ausmachen und von denen Astrozyten und Oligoden-

drozyten abstammen sollen (Sadler 2003).

Sie wandern, noch immer mitotisch aktiv, in die weiße Substanz des Gehirns ein, wobei die Interaktion mit der extrazellulären Matrix und die Expression von Metalloproteinasen von Bedeutung sind (Amberger et al. 1997). Erst wenn sie auf ein spezifisches Axon treffen, das sie im Zuge der Myelinisierung umhüllen, differenzieren sie zu reifen Oligodendrozyten. Dieser Differenzierungsprozess und auch der Beginn der Myelinproduktion lassen sich *in vitro* in Oligodendrozyten-Kulturen frei von Neuronen beobachten (Dubois-Dalcq et al. 1986). Lange Zeit herrschte daher die Meinung vor, neuronale Signale seien von sekundärer Bedeutung. In den vergangenen Jahren konnten jedoch Arbeiten wie etwa von Barres et al. (1993) demonstrieren, dass neuronale Signale für das Überleben und die zeitlich und örtlich geregelte Differenzierung der Oligodendrozyten entscheidend sind.

1.2.2 Vorstufen und Differenzierung der Oligodendrozyten

Die oben beschriebenen Migrations- und Differenzierungsprozesse vollziehen sich im Nagerorganismus im engen zeitlichen Rahmen bis etwa zum 10. postnatalen Tag. Es folgt bis etwa zum 45., maximal bis zum 60. postnatalen Tag die Periode der Myelinisierung (Baumann und Pham-Dinh 2001). In ihren Arbeiten konnten Bu et al. (2004) feststellen, dass in Wildtyp-Mäusen jedoch ab Tag 18 nach der Geburt keine erfassbare Proliferation von Oligodendrozyten mehr stattfindet.

Auch im Hinblick auf Erkrankungen wie Multiple Sklerose (siehe 1.5.1), in deren Verlauf Remyelinisierung, wenn auch in unzureichendem Maße, stattfindet, wäre es von großer Bedeutung, frühe Stufen der Oligodendrozyten-Linie sicher identifizieren zu können. Zahlreiche Arbeiten widmeten sich daher der Suche nach spezifischen Antigenen, welche nur in bestimmten Entwicklungsphasen exprimiert werden. 1997 definierten Trapp et al. drei Reifestufen von Oligodendrozyten im Nagergehirn. Sie benannten die Stufe der Vorläuferzelle, welche positiv sei für das sulfatierte Proteoglykan NG2 sowie den *platelet derived growth factor receptor* α , kurz PDGF α R. Im Reifungsprozess folge das Stadium der sog. prämyelinisierenden Zelle, welche positiv für das Myelinprotein DM20 sei, hingegen die Spleißvariante eben jenen Proteins, PLP, noch nicht exprimiere. Die Antigene des Vorläuferstadiums, NG2 und PDGF α R, seien bereits negativ. Der dritten und letzten Reifestufe entspricht laut Trapp et al. der myelinisierende Oligodendrozyt. Dieser exprimiere weiterhin

DM20, jedoch nun auch die längere Isoform PLP (vgl. Abb. 1.1). Zum Vorläuferstadium ist anzumerken, dass sich in der Literatur häufig die Bezeichnung O2A-Zelle als Synonym findet. In Kultur besitzt dieses Stadium die Fähigkeit, sich in Serum-freiem Medium in Oligodendrozyten zu differenzieren, während in Serum-haltigem Medium Astrozyten entstehen (Trapp et al. 1997).

Die Arbeit von Chang et al. (2002), durchgeführt an autoptischem menschlichen Material, unterstützt oben Genanntes hinsichtlich des Vorläuferstadiums, hält das prämyelinisierende Stadium jedoch bereits für PLP positiv und definiert es morphologisch: multiple Zellfortsätze seien vorhanden, Axonkontakt sei jedoch noch nicht hergestellt. Von Bu et al. (2004) wird NG2 ebenfalls als Marker für das O2A-Stadium eingesetzt, während Krämer und Armstrong Vorläufer als O4 positiv (Antikörper gegen Glykolipide, Canoll et al. 1996) und zugleich negativ für das Lipid Galaktosylceramid (GalC, u.a. erkannt durch den Antikörper O1) beschreiben. GalC sei ein Marker des reifen Stadiums (Armstrong et al. 1992).

Im Ratten-Cerebellum wird CNP als erstes Myelin-spezifisches Protein zur selben Zeit wie GalC erstmals exprimiert (Reynolds und Wilkin 1988). Im Abstand von 2 bis 3 Tagen folgen sequentiell die Myelinproteine MBP (Reynolds und Wilkin 1988) und PLP (Monge et al. 1986), während das Protein MOG als Marker für das späte Reifestadium angesehen wird (Solly et al. 1996).

Gogate et al. (1994), die sich auf menschliche Zellen beziehen, verwenden als weiteres Unterscheidungskriterium der Differenzierungsstufen die Spleißvarianten des Myelin Basischen Proteins, MBP: MBP einschließlich Exon 2 (exon2+MBP) fände sich vor allem im prämyelinisierenden Stadium, wohingegen MBP ohne Exon 2 (exon2-MBP) typisch für reife Oligodendrozyten sei.

Dieser kleine Ausschnitt eines weiten Forschungsfeldes mag zeigen, dass zwar gemeinsame Grundlagen bestehen, jedoch im Detail durchaus sehr heterogene Ergebnisse existieren.

Noch vielschichtiger wird das Bild, wenn man sich mit Differenzierungsfaktoren der Oligodendrozyten befasst. So ist z.B. seit über zehn Jahren bekannt, dass durch Zusatz von bovinem Fribroblasten-Wachstumsfaktor (bFGF, auch FGF2 genannt) ins Kulturmedium von Oligodendrozyten-Kulturen das Verhältnis von prämyelinisierenden zu reifen Zellen erhöht wird, wohingegen der Insulin-ähnliche Wachstumsfaktor 1 (IGF-1) das Verhältnis zur reifen Form hin verschiebt (Armstrong et al. 1992; Gogate et al. 1994).

Neben FGF-2 und IGF-1 sind *platelet derived growth factor* α (PDGF α), *Neurotrophin 3* (NT-3) und *ciliary neurotrophic factor* (CNTF) als weitere Faktoren mit Einfluss auf die Oligodendrozyten-

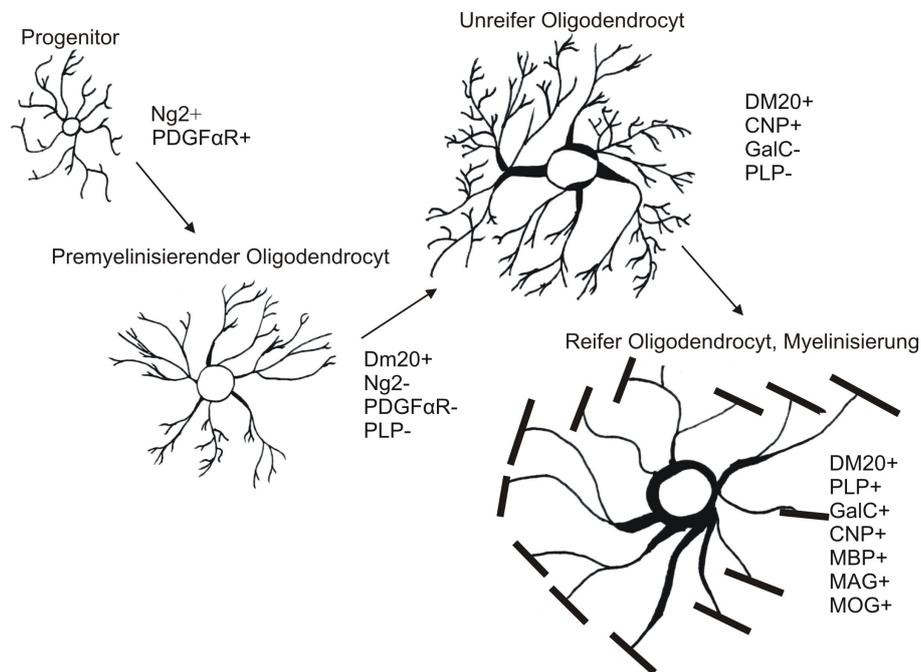


Abbildung 1.1: Reifestadien des sich entwickelnden Oligodendrozyten mit entsprechenden Markern. Modifiziert nach Trapp et al. 1997, S. 466; Baumann und Pham-Dinh 2001, S. 874

Entwicklung bekannt. Beschriebene Effekte wurden zusammengestellt von Barres und Raff (1994). Auch der großen Familie der Integrine kommt eine wichtige Rolle zu (Baron et al. 2005).

Als Beispiel seien die von Neuronen produzierten Neureguline genannt. Diese besitzen Struktur motive, die dem epidermalen Wachstumsfaktor EGF gleichen und binden an auf Oligodendrozyten exprimierte ErbB-Rezeptoren. Diese spezifische Wechselwirkung, z.B. der Substanz *glial growth factor 1*, welche dem Neuregulin 1 entspricht, bewirkt die Proliferation von Vorläuferzellen und verzögert deren Differenzierung (Canoll et al. 1996, 1999).

Neben den genannten pro-proliferativen Faktoren wurden auch Signalkaskaden aufgedeckt, welche einen Differenzierungsstopp oder gar eine Entdifferenzierung von Oligodendrozyten bewirken können. Paradoxe Weise sind es die oben beschriebenen Neureguline, welche in ausgereiften Oligodendrozyten den Verlust des Proteins MBP und des Lipides Galaktosylceramid sowie die Umorganisation des Aktin-Zytoskelettes bewirken und damit den Übergang in unreifere Stadien hervorrufen können (Canoll et al. 1999). Diese Tatsache verdeutlicht, dass je nach Differenzierungsstand und Molekülexpressionsmuster einer Zelle die Antwort auf ein und dieselbe Substanz

sehr unterschiedlich ausfallen kann.

Neurone sind des Weiteren in der Lage, Oligodendrozyten an ihrer Ausdifferenzierung zu hindern. Dies geschieht u.a. über die sog. Jagged-Notch-Interaktion. Das Molekül Jagged 1 befindet sich dabei auf der axonalen Zellmembran, während Notch 1 von Vorläuferzellen der Oligodendrozyten exprimiert wird. Es erscheint evident, dass Neurone auf diese oder ähnliche Art und Weise steuernd auf Ausmaß und Dauer des Myelinisierungsprozesses einwirken können, doch auch ein möglicher Mechanismus zum Erhalt einer undifferenzierten Reserve in adulten Organismen ist plausibel (Wang et al. 1998).

Abgesehen von den genannten Wachstumsfaktoren und trophischen Faktoren spielt elektrische Aktivität in der Neuron-Glia-Interaktion eine wichtige Rolle. Es ist bekannt, dass elektrische Impulse des Neurons zur Freisetzung von Substanzen wie Adenosin führen, welches die Proliferation von Vorläuferzellen verhindern, Differenzierung zu reifen Stadien und Myelinisierung aber fördern soll (Stevens et al. 2002). Elektrische Aktivität scheint zudem die Freisetzung des Zytokins *leukemia inhibitory factor* (LIF) aus Astrozyten zu bewirken. Dieser Faktor soll ebenfalls promyelinisierend wirken (Ishibashi et al. 2006).

1.3 Zusammensetzung des Myelins

1.3.1 Struktur und allgemeine Zusammensetzung

Myelin als Isolierscheide der Nervenfasern ist aus vielen Lamellen zusammengesetzt. Dabei ist die Lamellenzahl abhängig vom Durchmesser des umhüllten Axons und der Länge des zugehörigen Internodiums (s.u.) (Friede und Bischhausen 1982). Die Myelin-Lamellen entstehen durch spiralisches Umwickeln des Axons mit Plasmamembranfortsätzen der Glia-Zellen. Darauf folgt die Entfernung von zwischen den Lamellen verbliebenem Zytoplasma und schließlich die Kompaktierung der Membranstapel (zusammenfassend dargestellt in Simons M und Trajkovic 2006). Zytoplasma verbleibt jedoch in einer inneren Zytoplasmazone, den sog. paranodalen Zungen oder Loops, den Schmidt-Lantermann-Einkerbungen des PNS sowie der äußeren Zytoplasmazone, in welcher der Zellkern und die meisten Zellorganellen lokalisiert sind. Zwischen der Glia-Zelle und der Axonoberfläche verbleibt der sog. periaxonale Spalt (Lüllmann-Rauch 2003).

Entlang der umhüllten Nervenfaser finden sich in regelmäßigen Abständen von 200-2000 μ m Einschnürungen, welche man als Ranvier-Schnürringe oder Ranvier-Knoten bezeichnet. Diese wurden von Ran-

vier erstmals im Jahr 1871 beschrieben. Sie entsprechen den Grenzen zweier aufeinander folgender Myelinsegmente und zeichnen sich durch einen besonders hohen Gehalt an schnellen Natrium-Kanälen aus (zusammenfassend in Lüllmann-Rauch 2003, Salzer 2003). Heute weiß man, dass der Natrium-Kanal-Subtyp Na(v)1.6 die Hauptform im Ranvier-Knoten darstellt (Caldwell et al. 2000). Die hohe lokale Konzentration von Natrium-Kanälen ist Grundlage für die schnelle, saltatorische Erregungsleitung, da nur hier ein Aktionspotential aufgebaut werden muss und nicht die gesamte Länge der Nervenfasern entlang.

Der Bereich zwischen zwei Ranvier-Knoten wird als Internodium bezeichnet und wird von jeweils nur einer Myelin-bildenden Zelle umhüllt. Dabei ummantelt die Schwann-Zelle des PNS jeweils nur ein Axon, während der Oligodendrozyt des ZNS bis zu 40 verschiedene Axone myelinisieren kann, so im Bereich des optischen Nervens (Peters et al. 1991). Internodien wurden 1989 beschrieben von Butt und Ransom. Die Länge der Internodien entspricht in etwa dem 100-fachen Axondurchmesser (Hess und Young 1952).

Ein weiterer deutlicher Unterschied zwischen PNS und ZNS besteht darin, dass periphere Axone von einer durchgehenden Basallamina umhüllt werden, welche im ZNS vollständig fehlt. Neuere Experimente deuten darauf hin, dass Schwann-Zellen die Zusammensetzung der Basallamina dynamisch beeinflussen (zusammenfassend in Court et al. 2006).

Betrachtet man die Myelinschicht elektronenmikroskopisch, so findet sich im kompakten Myelin ein periodischer Wechsel von elektrodichten und helleren Banden (Sjöstrand 1949). Die breite Hauptlinie, als *major dense line* (MDL) bezeichnet, entspricht den zusammen gelagerten zytoplasmatisch orientierten Lipidschichten der Oligodendrozyten-Zellmembran. Entsprechend entsteht die hellere Zwischenlinie, die *intraproduct line* (IPL), aus den vormals extrazellulär orientierten Membranblättern (Lüllmann-Rauch 2003).

Die Anzahl der Umhüllungen kann bis zu mehrere Hundert betragen und ist sowohl mit dem Axondurchmesser als auch der Internodienlänge korreliert (Friede und Bischhausen 1982). Wie oben bereits erwähnt, unterscheidet sich die biochemische Zusammensetzung des Myelins deutlich von jener anderer Zellmembranen: Ein Lipidanteil von 70% des Trockengewichtes im Myelin anstatt 35-40% Lipidanteil in anderen Zellmembranen (Norton und Poduslo 1973). Dabei ist Myelin besonders reich an Glykosphingolipiden, insbesondere Galaktosylceramid und seinem sulfatierten Derivat Galaktosulfatid, die in der Summe fast ein Drittel des Gesamtlipidanteils des Myelins ausmachen. Auch Cholesterin ist im Myelin deutlich ange-

reichert (Morell und Jurevics 1996), während die Hauptkomponente der meisten Zellmembranen, Phosphatidylcholin, nur zu geringen Anteilen vertreten ist.

Myelin enthält eine begrenzte Anzahl von Proteinen, welche größtenteils nicht in den Zellmembranen des Körpers zu finden sind. Die Hauptkomponenten, die gemeinsam bereits 80% des Proteinanteils decken, sind Myelin Basisches Protein (MBP) mit 30% und Proteolipid Protein (PLP) sowie seine Isoform DM20 mit 50% (Greer und Lees 2002). Es handelt sich um Moleküle mit geringem Molekulargewicht, die vornehmlich im kompakten Anteil des Myelins vorkommen.

1.3.2 Myelinproteine

PLP und DM20 (*proteolipid protein*)

PLP und seine Isoform DM20 machen etwa 50% des Proteinanteils von Myelin aus (Greer und Lees 2002).

Bei PLP und seiner Isoform DM20 handelt es sich um acylierte integrale Membranproteine, welche die Membran mit jeweils vier α -Helices durchspannen. Der N- und C-Terminus der stark hydrophoben Moleküle ist zytoplasmatisch ausgerichtet (Weimbs und Stoffel 1992) und das Molekulargewicht beträgt ohne Modifikationen 25kDa für PLP sowie 20kDa für DM20 (Baumann und Pham-Dinh 2001). Auf dem Weg vom Syntheseort zur Plasmamembran werden den Molekülen mehrere Acylketten hinzugefügt, was den hydrophoben Charakter verstärkt (Weimbs und Stoffel 1992) und zu einem Gesamtanteil hydrophober Aminosäuren von fast 50% führt. Die Interaktion mit Cholesterol ist beschrieben (Simons M et al. 2000). Das PLP-Gen ist phylogenetisch hoch konserviert, liegt auf dem X-Chromosom und codiert für 276 Aminosäuren. Insgesamt besteht das Gen aus sieben Exons (Stoffel et al. 1983). Durch alternatives Spleißen von Exon 3 und die Deletion von 35 Aminosäuren (Aminosäure 116 bis 150) entsteht die Isoform DM20 (Nave et al. 1986). Als Strukturprotein ist PLP am Erhalt der Integrität der *intraperiod line* (IPL) im kompakten Myelin beteiligt (Boison et al. 1995). Die Funktion von DM20 ist deutlich weniger gut untersucht.

Während in Vorläuferzellen das Gen in geringem Maße transkribiert wird, steigt die Transkriptionsrate im Laufe der Reifung des Oligodendrozyten an. Dabei verschiebt sich das Verhältnis vom Überwiegen der DM20-mRNA zur mRNA von PLP (Thomson et al. 2005).

MBP (*myelin basic protein*)

MBP, codiert auf Chromosom 18 der Maus (Roach et al. 1985), ist nach PLP/DM20 mit ca. 30% das zweithäufigste Protein im Myelin des zentralen Nervensystems (Baumann und Pham-Dinh 2001).

In Nagern kommt MBP in vier Isoformen vor (14, 17, 18.5 und 21.5kDa), welche durch alternatives Spleißen des mRNA-Gentranskripts entstehen. Der 14kDa und der 18.5kDa schweren Isoform fehlt jeweils die Aminosäuresequenz für die Exon 2 codiert (exon2-MBP). Beide Moleküle finden sich vornehmlich im kompakten Myelin (Krämer et al. 2001) und überwiegen im adulten Nager (Barbarese et al. 1978). Die Isoformen mit der Aminosäuresequenz des Exons 2 (exon2+MBP), 17kDa und 21.5kDa schwer, verteilen sich in transfizierten Oligodendrozyten diffus in Zytoplasma und Nukleus (Allinquant et al. 1991; Staugaitis et al. 1990; Pedraza et al. 1997). Bereits 1982 stellten Colman et al. fest, dass sich MBP-mRNA im Gegensatz zu PLP-mRNA aus Myelinfraktionen aufreinigen ließ und nahmen eine Synthese des Proteins an freien Ribosomen vor Ort, d.h. in den myelinisierenden Fortsätzen, an. Heute lässt sich genauer sagen, dass sich exon2-mRNA vor allem in den Zellfortsätzen befindet, wohingegen exon2+ mRNA vornehmlich im Zellkörper vorkommt (De Vries et al. 1997). In Folge der Reifung der Oligodendrozyten wird die exon2+mRNA weniger, die exon2-mRNA nimmt hingegen zu (De Vries et al. 1997).

Im Transkriptionsprozess von MBP scheint die Tyrosin-Kinase Fyn eine entscheidende Rolle zu spielen. In Fyn-Knockout-Mäusen fand sich ab Tag 14 eine deutliche Reduktion der MBP-Konzentration (Sperber et al. 2001). Zudem erhöht Fyn deutlich die Promotoraktivität des MBP-Genkomplexes (Umemori et al. 1999).

In humanem und bovinem Myelin ist die 18.5kDa-Isoform prozentual am stärksten vertreten und kommt in zahlreichen post-translationalen Modifikationen vor (DeBruin et al. 2005). Auch murines MBP wird auf verschiedenste Weisen post-translational modifiziert, so etwa die 14 und 18.5kDa-Isoformen durch N-terminale Acylierung, Methylierung, Deamidation und Phosphorylierung (Palma et al. 1997).

MBP findet sich im adulten Tier vor allem im kompakten Myelin, in den zytoplasmatischen Anteilen der Membranschichten. Es ist zur Zeit Konsens, von einer kompaktierenden Wirkung und Stabilisierung insbesondere der *major dense line* durch das Molekül auszugehen (Allinquant et al. 1991). Die Wechselwirkung mit Lipiden scheint vor allem elektrostatischer Natur zu sein, aber auch hydrophobe Wechselwirkungen, insbesondere der N-terminalen Mo-

lekülhälfte, kommen vor (Boggs et al. 1999). Wird im menschlichen MBP-Molekül an mehreren Stellen die Aminosäure Arginin durch Citrullin ersetzt, wie es bei Multiple-Sklerose-Patienten beobachtet wurde, so erscheinen die Wechselwirkungen mit Lipiden abgeschwächt (Beniac et al. 2000).

Auch eine Rolle in der Signaltransduktion wird diskutiert, insbesondere vor dem Hintergrund der strukturellen Ähnlichkeit mit MARCKS (*myristoylated alanine-rich C-kinase substrate*). MBP wechselwirkt beispielsweise mit Calcium-Calmodulin, Aktin und Proteinkinase C (Harauz et al. 2000).

Die morphogenetischen Eigenschaften von MBP konnten kürzlich genauer definiert werden. MBP wechselwirkt in einer Calcium/Calmodulin-abhängigen Weise mit dem Mikrotubulsystem des Oligodendrozyten und kann funktionell mit der Familie der STOP (*stable tubule only polypeptide*)-Moleküle verglichen werden (Galiano et al. 2006).

CNP (*2',3'-cyclic nucleotide 3'phosphodiesterase*)

CNP hat einen Anteil von ca. 4% am Gesamtprotein des Myelins (Baumann und Pham-Dinh 2001). Zwei durch alternatives Spleißen erzeugte Isoformen des Proteins mit einem Molekulargewicht von 46kDa bzw. 48kDa sind bekannt und werden als CNP1 und CNP2 bezeichnet (Sprinkle 1989).

Das CNP-Gen der Maus liegt auf Chromosom 11 (Bernier et al. 1988) und umfasst vier Exons. Post-translationale Modifikationen wie Acylierung und Phosphorylierung kommen vor allem bei CNP2 vor (Vogel und Thompson 1988).

Immunhistochemisch ließ sich das Protein in den paranodalen Schlingen des Myelins sowie im Zytoplasma der Oligodendrozyten-Fortsätze nachweisen (Trapp et al. 1988). Die Funktion von CNP ist nach wie vor ungeklärt. Die enzymatische Aktivität, die dem Protein den Namen gab, bezieht sich auf künstliche Substrate, die im Gehirn nicht nachgewiesen werden konnten (Vogel und Thompson 1988).

MAG (*myelin-associated glycoprotein*)

Das Molekül MAG wird allgemein als Bestandteil der Immunglobulin-Gen-Superfamilie angesehen (Salzer et al. 1987), welche ausschließlich in Myelin-produzierenden Zellen exprimiert wird und deren Gene ca. 1% des Gesamtproteingehalts des zentralen Myelins ausmachen (Quarles et al. 1973, Trapp 1990). Das MAG-kodierende Gen befindet sich bei der Maus auf Chromosom 7 (Barton et al.

1987) und umfasst 13 Exons.

Im zentralen Nervensystem entstehen durch alternatives Spleißen zwei Isoformen von MAG, ohne Glykosylierung 67kDa (S-MAG für *small*) und 72kDa (L-MAG für *large*) schwer. Dabei tritt die 72kDa schwere Isoform früher auf und bleibt die Hauptform während der aktiven Myelinisierungsphase. Nach deren Abschluss überwiegt die 67kDa-Isoform im Nagerhirn (Frail und Braun 1984). Beide MAG-Isoformen haben eine Transmembrandomäne und eine extrazelluläre Region, welche den Immunglobulindomänen ähnelt (Salzer et al. 1987). Darüber hinaus sind die MAG-Isoformen Sialinsäure bindende Proteine, wodurch eine Wechselwirkung mit Neuronen zustande kommt. Diese entspricht jedoch nicht der im Folgenden beschriebenen inhibitorischen Wirkung von MAG auf das Neuriten-Wachstum (Tang et al. 1997).

In den Oligodendrozyten des zentralen Nervensystems ist MAG in frühen Entwicklungsstufen granulär zytoplasmatisch verteilt und ist im Vergleich zu MBP in einer geringen Latenz detektabel. Ab der Phase starker Myelinisierung ist MAG in den Internodien periaxonal lokalisiert (Sternberger et al. 1979), weshalb eine Rolle im Zell-Zell-Kontakt und der Signaltransduktion diskutiert wird. Beispielsweise wechselwirken verschiedene axonale Proteine mit MAG zur Regulation von axonaler Regeneration, wobei MAG ebenso wie Nogo und Omgp (*oligodendrocyte myelin glycoprotein*) über den Nogorezeptor NgR das axonale Wachstum hemmen kann (zusammenfassend in Spencer et al. 2003; Giger et al. 2008). In Diskussion ist eine mögliche Rolle von MAG bei der Stabilisierung der paranodalen Axon-Glia-Wechselwirkung. Beobachtet wurde, dass insbesondere in der MAG-CGT-Doppelmutante, d.h. in Tieren, die weder MAG noch Galaktolipide bilden können, die paranodale Region im Vergleich zu den jeweiligen Einzelmutanten übermäßig verändert ist (Marcus et al. 2002).

MOG (*myelin oligodendrocyte glycoprotein*)

Das MOG-kodierende Gen ist auf Chromosom 17 der Maus lokalisiert. Es befindet sich am distalen Ende der MHC (*major histocompatibility complex*) Ib Region (Pham-Dinh et al. 1995). Das Protein hat ohne Glykosylierung ein Molekulargewicht von 25kDa, mit Glykosylierung 26-28kDa (Amiguet et al. 1992). MOG findet sich nur im Myelin von Säugetieren (Birling et al. 1993). Die N-terminale Region des Proteins ähnelt einer Immunglobulin-Domäne (Gardiner et al. 1992), so dass auch MOG als Teil der oben genannten Immunglobulin-Gen-Superfamilie gilt. Dieser Familie entsprechend

scheint MOG nur eine transmembranäre Domäne zu besitzen (De-la Gaspera et al. 1998). In vivo scheint das Protein vor allem in den äußersten Schichten des kompakten Myelins lokalisiert zu sein (Brunner et al. 1989). Wie oben erwähnt wird MOG als Marker für ein spätes Reifestadium von Oligodendrozyten verwendet (Solly et al. 1996).

Ganz besonderes Interesse wurde MOG zuteil, als beobachtet wurde, dass in einem Tiermodell demyelinisierender Erkrankungen, der sog. *Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis* (EAE, siehe 1.5.1), die Injektion von MOG in das ZNS sowohl eine T-Zell-vermittelte als auch eine Antikörper-vermittelte Immunantwort provozieren kann (Bernard et al. 1997).

1.3.3 Myelinlipide

Wie oben bereits erwähnt, hat die Myelinmembran eine besondere Lipid-

Zusammensetzung. Sie ist im Vergleich zu Zellmembranen stark angereichert an Glykosphingolipiden (Raff et al. 1978) und Cholesterin. Insgesamt machen Lipide 70% des Trockengewichtes aus, Proteine nur 30% (Norton und Poduslo 1973; Baumann und Pham-Dinh 2001).

Als Hauptkomponenten sind Cholesterin, Plasmalogene (vor allem Ethanolamin-Plasmalogene), Galaktosylceramid (GalC) und Galaktosulfatid (sGalC) zu nennen, mengenmäßig geringer vertreten sind Galaktodiglycerol und das Gangliosid GM1 (Stoffel und Bosio 1997; DeWille und Horrocks 1992). Während die Glykolipide im äußeren Membranblatt vorkommen, finden sich Phospholipide und Plasmalogene im inneren Membranblatt. Cholesterol kommt in beiden Membranblättern vor (Stoffel und Bosio 1997).

Galaktosylceramid (GalC) und Galaktosulfatid (sGalC) gehören zur Gruppe der Glykosphingolipide und machen zusammen 20% des Lipid-Trockengewichtes aus (vgl. Simons M und Trajkovic 2006). Sie tragen lange gesättigte Kohlenwasserstoffketten (O'Brien und Rouser 1964) und haben einen Schmelzpunkt, der oberhalb der Körpertemperatur liegt (Curatolo 1982). Dies bedeutet, dass sie im Säugerorganismus in parakristalliner Struktur vorliegen (Stoffel und Bosio 1997). Glykosphingolipide scheinen mit Cholesterol dynamische Lipiddomänen auszubilden, die als *rafts* bezeichnet werden (Brown und London 2000).

Die Synthese von GalC und sGalC ist abhängig von der Aktivität des Enzyms *UDP-Galactose-Ceramid-Galactosyltransferase*, kurz CGT (Schulte und Stoffel 1993). Der sog. CGT-Knockout-Maus fehlt die-

ses Enzym und damit die Fähigkeit, die genannten Lipide zu synthetisieren. Während Näheres unter 1.5.2 zu finden ist, sei hier bereits erwähnt, dass die Nervenleitgeschwindigkeit der myelinisierten Axone dieser Tiere stark herab gesetzt ist (Bosio et al. 1996). Dies spricht für eine Rolle der Glykosphingolipide in der Ausbildung einer Ionen-impermeablen Barriere, welche für die saltatorische Erregungsleitung unverzichtbar zu sein scheint (Stoffel und Bosio 1997).

1.4 Der Prozess der Myelinisierung im Detail

1.4.1 Allgemeine Transportmechanismen

Wie oben bereits erwähnt produziert ein einzelner Oligodendrozyt in der aktiven Phase der Myelinisierung pro Tag $5000\mu\text{m}^2$ an Myelin (Pfeiffer et al. 1993). Dass Transportprozesse in diesem Zelltyp ein Höchstmaß an Organisation und Effizienz aufweisen müssen, ist leicht nachvollziehbar. Im Folgenden sei eine Zusammenschau des aktuellen Wissens über Transportmechanismen gegeben.

Bei der Erforschung oligodendroglialer Transportaktivitäten ist es seit Jahren etabliert, vergleichend den Transport in polarisierten epithelialen Zellen zu betrachten. Die Membranzusammensetzung epithelialer Zellen differiert je nach apikaler oder basolateraler Ausrichtung deutlich, was als Ausdruck unterschiedlicher Funktionen aber auch unterschiedlicher Transportmechanismen angesehen wird (Simons K und Fuller 1985; Fuller et al. 1985; von Bonsdorff et al. 1985).

Der apikale Transportweg in Epithelzellen scheint vor allem durch Glykosphingolipid- und Cholesterol-reiche Mikrodomänen, sog. *rafts*, zu erfolgen (Simons K und Ikonen 1997), welche durch Assoziation von Glykolipiden und bestimmten apikalen Proteinen im Trans-Golgi-Netzwerk entstehen sollen. Die Lipid-Zusammensetzung der *rafts* ähnelt dabei stark der des Myelins (De Vries und Hoekstra 2000; Stoffel und Bosio 1997). Der basolaterale Transportweg in Epithelzellen scheint in Vesikeln des Trans-Golgi-Netzwerkes zu erfolgen, in welche die entsprechenden Moleküle durch ein Signal in ihrer zytoplasmatischen Domäne sortiert werden (Fölsch et al. 1999; Mellman und Nelson 2008).

Rafts bilden im exoplasmatischen Blatt der Zellmembran durch ihren hohen Gehalt an Glykosphingolipiden und Cholesterol Mikrodomänen mit hoher molekularer Ordnung in einer Umgebung höherer Fluidität. Als dynamische Plattformen und Transportvehikel können sie mit diversen Proteinen interagieren (Simons K und Ikonen 1997; Dupree P et al. 1993). Mit nicht-ionischen Lösungsmit-

teln können aus fast allen Zellen unlösliche Membranfragmente isoliert werden. Geläufige Bezeichnungen sind DRMs (*detergent resistant membranes*) sowie DIGs (*detergent insoluble, glycolipid enriched membranes*). Diese Fragmente sind reich an Glykosphingolipiden und Cholesterol und scheinen aus *rafts* zu stammen (Brown und London 2000).

Ein weiterer Transportmechanismus der Zelle ist das elaborierte System der Endosomen / Lysosomen, welches von großer Bedeutung für Transport und Recycling bestimmter Myelinkomponenten ist. Detailliert beschrieben wurden die vesikulären Organellen 1965 von Trump et al..

Lysosomen sind ca. $0,5\mu\text{m}$ große Zellorganellen mit saurem pH und über 40 hydrolytischen Enzymen, den sog. sauren Hydrolasen. Zelleigene oder von extern aufgenommene Makromoleküle können auf diese Weise im Lysosom gespalten und ihre über transmembranären Transport ins Zytosol abgegebenen Bausteine wieder verwendet werden. Die lysosomalen Enzyme stammen aus dem Trans-Golgi-Netzwerk (TGN), wo sie nach Synthese am rauen Endoplasmatischen Reticulum (rER) über einen Mannose-6-Phosphat-Rezeptor gebunden und in Vesikel verpackt werden. Diese Vesikel erreichen das Lysosom über die Zwischenstufe des bereits sauren Späten Endosoms, wo der Rezeptor-Enzym-Komplex dissoziiert (Lüllmann-Rauch 2003).

Der Weg von der Aufnahme eines extrazellulären Moleküls bis zu seiner Zerlegung im Lysosom ist komplex, so dass letztlich verschiedene Transportmechanismen zu differenzieren sind. Besonders gut untersucht ist die Rezeptor-vermittelte Clathrin-abhängige Endozytose. In der Zellmembran existieren spezielle Membranareale, welche angereichert sind mit den in Interaktion stehenden Proteinen Clathrin und AP-2, einem Adapterprotein (Owen et al. 2000). Die Größe dieser Membranareale ist abhängig vom Gewebe bzw. Zelltyp. Für das ZNS wurden Werte von 76nm ermittelt, für Fibroblasten 120nm (Heuser und Kirchhausen 1985).

Ein Ligand, z.B. typischerweise das Molekül Transferrin, bindet an einen spezifischen Rezeptor der Zellmembran. Der Rezeptor wiederum ist durch AP2 mit dem Protein Clathrin gekoppelt. Der Komplex überzieht rasenartig ein definiertes Membranfeld, welches sich in Reaktion auf die Liganden-Bindung einstülpt. Diese Formation wird als Stachelsaumgrübchen oder *clathrin coated pit* (CCP) beschrieben. Es folgt die Abschnürung eines Vesikels, der die Ligand-Rezeptor-Komplexe enthält (zusammenfassend beschrieben in Moussavi et al. 2004). Die Einstülpung des Membranfeldes ist abhängig von dem Molekül Dynamin, welches GTPase-Aktivität besitzt, und von Phosphatidylinositol(4,5)-Bisphosphat. Beide Moleküle stehen

in Wechselwirkung (Rohde et al. 2002).

Es werden zwei Formen der Kargo-Aufnahme differenziert: Zum einen die konstitutive Endozytose, welche Oberflächenrezeptoren betrifft, die ständig einen Recycling-Prozess von der Zellmembran ins Zellinnere und zurück beschreiben. Zum anderen kennt man die Signal-induzierte Endozytose, welche erst einsetzt, wenn ein Ligand an seinen spezifischen Rezeptor gebunden hat (zusammenfassend in Mousavi et al. 2004).

Nach Abfallen und Recycling des Clathrin-Mantels verschmilzt der Endozytosevesikel mit dem sog. Frühen Endosom, weiter zum Späten Endosom und schließlich ins Lysosom oder zum Trans-Golgi-Netzwerk. An unterschiedlichen Stellen des Weges kann eine Dissoziation des Ligand-Rezeptor-Komplexes und ein Recycling des Rezeptors zur Plasmamembran erfolgen (Lüllmann-Rauch 2003).

Wie genau die Umwandlung eines flachen Membranareals in einen Vesikel erfolgt, ist nach wie vor unklar. Es konnte gezeigt werden, dass rekombinant exprimierte Clathrin-Fragmente unter Vermittlung von Adapterproteinen mit weiteren Clathrin-Molekülen interagieren und geschlossene Korb-artige Gebilde zu formen vermögen. Dies warf die Frage auf, ob durch diese Interaktion die Membranınvagination erzwungen wird (Greene et al. 2000).

Ein Beispiel für Clathrin-unabhängige Endozytose ist die Stoffaufnahme über Caveolae. Hierbei handelt es sich um Invaginationen der Zellmembran, die je nach Zelltyp 50-100nm groß sind (Lisanti et al. 1994) und verschiedene Formen annehmen können (vgl. Severs 1988).

Caveolae sind gekennzeichnet durch eine spezifische Lipid-Zusammensetzung, welche den oben beschriebenen *rafts* entspricht (Cohen et al. 2004). Vor diesem Hintergrund ist verständlich, weshalb Cholesterol für den Formerhalt benötigt wird. Des Weiteren ist das Protein Caveolin angereichert (Rothberg et al. 1992).

Auch in Caveolae können verschiedene Rezeptormoleküle akkumuliert sein und es kann nach Ligandenbindung zur Abschnürung der Vesikel kommen. Sie scheinen eine wichtige Rolle in makromolekularer Transzytose in vivo zu spielen, so etwa im Lungengewebe (McIntosh et al. 2002). Die Analyse von Komponenten der Caveolae zeigte, dass sich hier viele Signalmoleküle befinden, so etwa Src-artige Kinasen oder heterotrimere G-Proteine (Lisanti et al. 1994). Daher erscheint eine Rolle in der Signaltransduktion wahrscheinlich. Genau wie für die Clathrin-abhängige Endozytose bleibt auch für Caveolae der genaue Mechanismus der Invagination unklar. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass auch hier das Molekül Dynamin und seine GTPase-Aktivität erforderlich sind (Oh et al. 1998).

Dies verdeutlicht, dass spezifische Proteine für kritische Schritte des sortings, also des gerichteten Transportes, erforderlich sind und ein Blick in die aktuelle Literatur zeigt, dass etliche der beteiligten Signalkaskaden inzwischen bekannt sind: Gruenberg und Stenmark (2004) nennen die sog. *multivesicular bodies* (MVBs) als Zwischenstufe im oben skizzierten Weg zwischen Frühen und Späten Endosomen (vgl. Abb. 1.2). Sie sind 400-500nm groß und werden entlang von Microtubuli transportiert. An der Direktion von Rezeptoren der Plasmamembran in die MVBs ist Phosphatidylinositol-3-Phosphat (PtdIns3P) entscheidend beteiligt. Dieses Protein interagiert mit HRS (Urbé et al. 2000), welches mit ESCRT-1 wechselwirkt (Bache et al. 2003) und ubiquitinierte Rezeptoren an die Folge der Proteine ESCRT-1, ESCRT-2 und ESCRT-3 weiterreicht (zusammenfassend in Gruenberg und Stenmark 2004). Werden nicht mehr benötigte Rezeptoren der Zelloberfläche über Ligasen mit einem einzelnen Ubiquitin-Rest verbunden, so ist dies das Startsignal für den Transport in Endosomen / Lysosomen. Polyubiquitin hingegen ist bekannt als Starter des Proteinabbaus im Proteasomkomplex (zusammenfassend in Raiborg et al. 2003).

Es gibt Hinweise darauf, dass Proteine, die in die inneren Membranen der MVBs eingebaut werden, dem lysosomalen Abbau zugeführt werden. Bei Einbau in die äußere Membran der MVBs soll hingegen ein Recycling stattfinden (Katzmann et al. 2002).

Die Differenzierung zwischen Frühen Endosomen, MVBs und Späten Endosomen gelingt morphologisch nur begrenzt. Hilfreich ist hierbei, dass sie sich in ihrer Lipid-Zusammensetzung deutlich unterscheiden. So entspricht die Membran der Frühen Endosomen weitgehend der Plasmamembran, während Späte Endosomen vor allem neutrale Phospholipide, Triglyceride und Cholesterolester enthalten. MVBs schließlich besitzen eine exklusive Komponente, Lysobisphosphatidsäure (LBPA) (Katzmann et al. 2002). Darüber hinaus sind histochemische Markermoleküle bekannt, wie z.B. Lamp-1 zur Erkennung Später Endosomen / Lysosomen (Boucrot und Kirchhausen 2007).

Von den Vorgängen der Endozytose nicht zu trennen sind jene der Exozytose, d.h. der Ausschleusung hydrophiler, nicht membrangängiger Moleküle aus der Zelle. Meist handelt es sich um Proteine, die an den Ribosomen des rER synthetisiert werden und über Vesikel das TGN erreichen. Von dort werden sie, wiederum vesikulär verpackt, zur Plasmamembran transportiert. Schließlich verschmilzt die Vesikelmembran mit der Plasmamembran, der Inhalt wird nach außen sezerniert. Die passagere Erweiterung der Plasmamembran um jene des Vesikels wird schließlich durch endozytotische Prozesse wieder

rückgängig gemacht (Lüllmann-Rauch 2003).

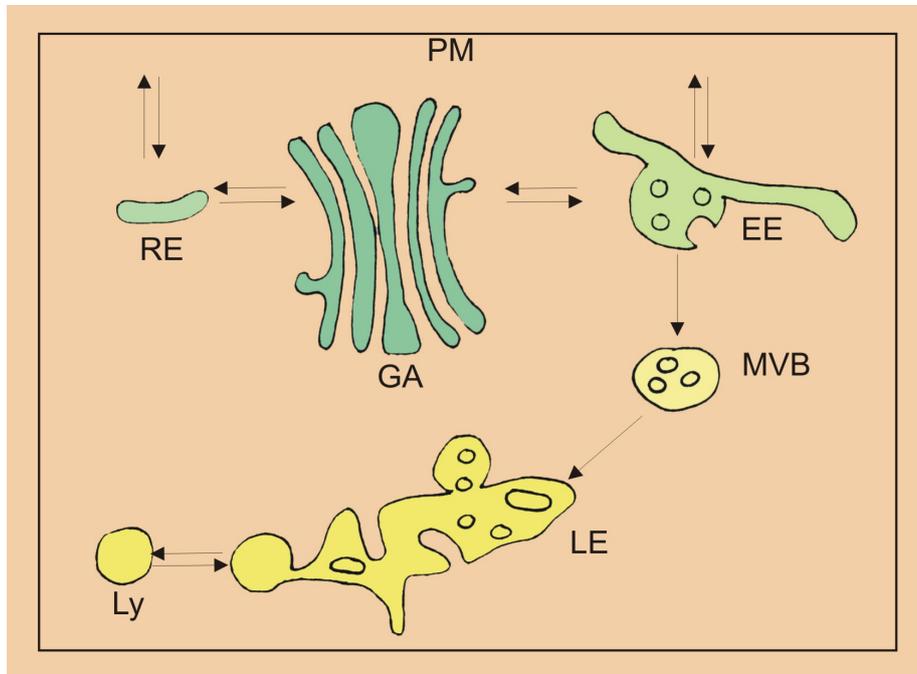


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der *multivesicular bodies* (MVB) als Zwischenstufe zwischen Golgi-Apparat (GA), Frühen Endosomen (EE) und Späten Endosomen (LE) sowie des Zusammenhangs mit der lysosomalen Degradation (Ly) und dem Recycling von Plasmamembran (PM) über Recycling-Endosomen (RE)

1.4.2 Transport spezieller Myelinkomponenten

Fragt man sich, welche Transportmechanismen im Allgemeinen zur Anlieferung von Myelin genutzt werden könnten, so lassen sich laut Krämer et al. (2001) vier prinzipielle Wege unterscheiden (siehe Abb. 1.3): Als erstes sei der direkte Transport genannt. Genau wie in polarisierten Epithelzellen ein gerichteter Transport zur apikalen Zellmembran stattfindet, so sei eine Vorsortierung im TGN und gezielte Anlieferung an myelinisierende Fortsätze denkbar.

Das zweite Modell, Transzytose, postuliert eine generelle Hauptflussrichtung des Transportes in der Zelle. Durch unterschiedlich starke lokale Endozytose und Recycling ließe sich die asymmetrische Membranvergrößerung im Zuge der Myelinisierung erreichen. Ebenso denkbar ist die dritte Variante der Exozytose präformierter Vesikel. Diese könnten sich bereits in den Fortsätzen befinden und auf spezifische neuronale Signale hin in die wachsende Myelinscheide

eingebaut werden. Die letzte diskutierte Möglichkeit bezieht sich auf die oben beschriebenen *rafts*. Diese Cholesterol- und Sphingolipidreichen Vehikel können im TGN mit weiteren Myelinbauteilen assoziieren und als Myelinbauteile zum Ort der Verwendung transportiert werden. Dort erfolgt möglicherweise das Verschmelzen der Bauteile zu einer zusammenhängenden Myelinschicht (Krämer et al. 2001).

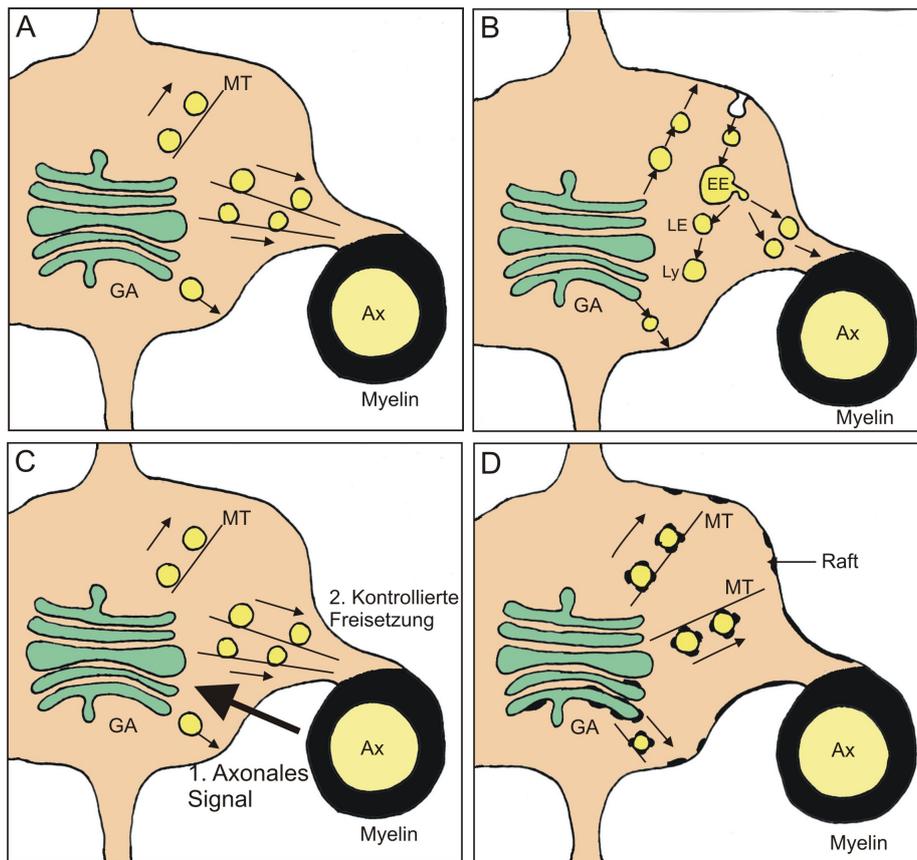


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung möglicher Transportprozesse im myelinisierenden Oligodendrozyten: direkter Transport (A), Transzytose (B), regulierte Exozytose (C) und *rafts* (D). Ax = Axon, EE = *early endosome* (Frühes Endosom), LE = *late endosome* (Spätes Endosom), Ly = Lysosom, MT = Mikrotubulus, Ncl = Nukleus; Modifiziert nach Krämer et al. 2001, S. 658

Tatsächlich sind die Transportwege der wichtigsten Myelinproteine inzwischen zumindest partiell bekannt. Es folgt eine kurze Zusammenstellung entsprechender Forschungsergebnisse:

Transport von PLP/DM20

Bereits in den 80er Jahren wurde für PLP/DM20 der folgende Pfad vom Syntheseort zur Membran beschrieben: Nach der Synthese an Membran-gebundenen Ribosomen des rER erfolgt der Einbau des Moleküls in Membranen des Endoplasmatischen Reticulums. Von dort wird es zum TGN transportiert und in Vesikeln weiter zur Plasmamembran (Schwob et al. 1985). Dabei zeigt sich keine Kolo-kalisation mit anderen Markerproteinen des Myelins (Krämer et al. 2001).

Es zeigte sich, dass die Isoform DM20 rascher als PLP die Plas-mamembran erreicht und ein diffuses Verteilungsmuster annimmt. PLP hingegen findet sich spezifisch im Bereich der Internodien, im kompakten Myelin (Trapp et al. 1997).

Für den gerichteten Transport zur Myelinmembran sind die 13 N-terminalen Aminosäuren von PLP entscheidend. So reichen diese aus, um das zytoplasmatische Fusionsprotein lacZ zur Membran zu dirigieren (Wight et al. 1993). Palmitoylierung dieser 13 N-terminalen Aminosäuren ist dabei unerlässlich für den Transport des Moleküls zu *myelin-like-membranes* (MLMs) (Schneider An et al. 2005).

Über Regulation der Endozytoserate scheint ein beachtlicher Teil der PLP-Verteilung bestimmt zu werden. So ließ sich zeigen, dass kultivierte Oligodendrozyten in der Abwesenheit von Neuronen einen Großteil des PLPs über Cholesterol-abhängige, Clathrin-unabhängige Endozytose in Späten Endosomen / Lysosomen einlagern (Kolo-kalisation mit dem Marker Lamp-1). Selbiges Bild zeigte sich für frühe Stadien *in vivo*. Durch Kokultur mit Neuronen wird über ein lösliches cAMP-abhängiges Signal die Endozytoserate herabreguliert. Die Konsequenz besteht in der Verlagerung der Moleküle aus Endosomen in die Plasmamembran (Trajkovic et al. 2006).

Abbildung 1.4: Schematische Darstellung der Herabregulation der Endozytose bei Zunahme der Exozytose durch Einwirken neuronaler Signale auf den Oligodendrozyten: Ein Modell für die PLP-Verteilung; LE = *late endosome* (Spätes Endosom), GA = Golgi-Apparat. Modifiziert nach Simons M und Trajkovic 2006, S. 4384

Bei der Analyse von *CHAPS*-unlöslichen Membranfragmenten (CIMFs, *CHAPS insoluble membrane fragments*) kultivierter Oligodendrozyten, welche *raft*-Komponenten entsprechen, ließ sich PLP nachweisen. Eine Cholesterol-abhängige *raft*-Assoziation des Moleküls im TGN ist anzunehmen (Simons M et al. 2000). Überexprimiert man PLP, wie dies bei der Pelizaeus-Merzbacher-Erkrankung des Menschen größtenteils der Fall ist, so lässt sich

durch Kolokalisation mit dem Marker Lamp-1 eine Anhäufung von PLP in Späten Endosomen / Lysosomen feststellen (Simons M et al. 2002; Karim et al. 2007). Erstaunlicherweise akkumuliert PLP dort Cholesterol und weitere *raft*-Komponenten, anstatt im TGN mit diesen zu assoziieren und die Plasmamembran zu erreichen (Simons M et al. 2002).

Für mutantes PLP (*jimpy*- bzw. *rumpshaker*-Mutation, siehe 1.5.2) wurde eine herabgesetzte Assoziationsfähigkeit mit Cholesterol und weiteren *raft*-Komponenten beschrieben. Es zeigte sich jedoch in diesem Fall keine Akkumulation des Proteins, sondern ein erhöhter Abbau über den Proteasom-Weg (Krämer-Albers et al. 2006). Für die PLP-Mutantenlinien *msd* und *rsh* liegen, konträr zu obiger Aussage, auch Daten einer perinukleären Ansammlung des defekten Proteins vor. Eine 2- bis 3-fach erhöhte Apoptoserate wurde beschrieben (Gow et al. 1998).

Es lässt sich allgemein ein Zusammenhang zwischen der phänotypischen Schwere einer PLP-Mutation und dem Ausmaß des gestörten Proteintransportes aufstellen, ohne dass andere Myelin-Proteine in ihrem Transport beeinträchtigt erscheinen (Thomson et al. 1997).

Transport von MBP

Wie oben bereits dargelegt erfolgt die Translation der MBP-mRNA am jeweiligen Bestimmungsort (Colman et al. 1982). Für *exon2*-mRNA bedeutet dies Translation im Bereich der Zellfortsätze, während *exon2+mRNA* diffus im Zytoplasma verteilt ist und abgelesen wird (De Vries et al. 1997).

Bereits in den 80er Jahren wurde in einer Oligodendrozyten-Kultur ohne Neurone beobachtet, dass das Protein am 5. bis 7. Tag post partum (pp) erstmals im Soma detektiert werden kann, dabei ist die Verteilung diffus. Ab Tag 15 pp lässt sich MBP auch in den Zellfortsätzen nachweisen (Dubois-Dalqç et al. 1986). Die Transkription des MBP-Gens scheint unter dem Einfluss der Src-Tyrosin-Kinase Fyn zu stehen (Umemori et al. 1999; Sperber et al. 2001).

Transport von CNP

Für das kationische Protein CNP ist für frühe ebenso wie für reife Stadien des bovinen Myelins eine DRM- und damit *raft*-Assoziation beschrieben. Genau wie bei MBP ist diese Interaktion bei hohen Salzkonzentrationen stabil, lässt sich aber durch Cholesterol-Deprivation lösen (DeBruin et al. 2005).

Transport von MAG

Das Protein MAG zeigt im Myelin eine distinkte Lokalisation im periaxonalen Spalt der Internodien, der mit 12 bis 14nm eine erstaunlich konstante Breite aufweist (Trapp 1990). Wie oben bereits erwähnt, existieren von MAG die beiden Isoformen L-MAG und S-MAG, wobei sich das Verhältnis im Laufe der Entwicklung zugunsten von S-MAG verschiebt (Trapp et al. 1989). Da L-MAG im Gegensatz zu S-MAG zwei Tyrosin-Internalisationssignale trägt, ist eine spezifische Endozytose des Proteins in reifen Zellen möglich (Bö et al. 1995).

Experimente an *Madin-Darby canine kidney* (MDCK) Epithelzellen ließen vermuten, dass L-MAG einem basolateralen Transportweg folgt (siehe 1.4.1), während der Transport von S-MAG von externen Faktoren abhängig zu sein scheint und entweder apikal oder basolateral erfolgen kann (Minuk und Braun 1996).

Transport von MOG

Über mögliche Transportwege des Moleküls MOG ist bisher sehr wenig bekannt. Kroepfl und Gardinier (2001a) beschrieben einen ausschließlich basolateralen Transportweg von MOG bei Expression in *Madin-Darby canine kidney* (MDCK) Zellen Typ II. Aufgrund des neuroepithelialen Ursprungs von Oligodendrozyten ist es weit verbreitet, Transportprozesse der Oligodendrozyten mit jenen in Epithelzellen zu vergleichen (siehe 1.4.1). Der basolaterale Transportweg in Epithelzellen scheint in Vesikeln des Trans-Golgi-Netzwerkes zu erfolgen, in welche die entsprechenden Moleküle durch ein Signal in ihrer zytoplasmatischen Domäne sortiert werden (Fölsch et al. 1999).

Kroepfl und Gardinier (2001a) konnten zudem für PLP einen apikalen Transport in MDCK-Zellen nachweisen und verglichen die apikalen Membrananteile mit kompaktem Myelin, die basolateralen Abschnitte hingegen mit nicht-kompaktem Myelin.

Selbige Autoren konnten in einer weiteren Arbeit zeigen, dass die Signale für den basolateralen Transport von MOG in MDCK-Zellen in der zweiten hydrophoben Domäne des Proteins liegen. Der Verlust dieser Aminosäuresequenz bewirkt einen fast ausschließlich apikalen Transport von MOG in MDCK-Zellen (Kroepfl und Gardinier 2001b).

1.4.3 Polarisierung des Myelins

Wie oben bereits kurz dargestellt, wird die Myelinscheide eines Axons in regelmäßigen Abschnitten durch die taillenförmigen Einziehungen der Ranvier-Knoten unterbrochen. An diesen ca. $1\mu\text{m}$ breiten Stellen sind schnelle Natrium-Kanäle hoch konzentriert und dienen der raschen, saltatorischen Erregungsleitung. Bereits 1925 wurde von Lillie die Hypothese der saltatorischen Erregungsleitung von Knoten zu Knoten formuliert (Lillie 1925).

Die Myelinscheide besitzt jedoch noch weitere spezifische Regionen, die als Domänen bezeichnet werden. Der Ranvier-Knoten wird zu beiden Seiten von den sog. Paranodien flankiert. Man kann sich diese als einen Zytoplasmagurt vorstellen, welcher spiralg um das Axon geschlungen wird. Im Longitudinalschnitt entsteht so das Bild von bis zu 40 Zytoplasma-haltigen Schlingen. In diesem Bereich ist der Kontakt zum Axon besonders eng, der periaxonale Spalt ist von 15nm im Bereich der Internodien auf ca. 3-5nm herabgesetzt (Salzer 2003). In Anlehnung an die Verhältnisse in Insekten bezeichnet man diese Kontaktregion als *septate-like junction*.

Zwischen dem Axon und jeder angrenzenden Schlinge existieren periodische Verdichtungen, die als *transverse bands* bezeichnet werden (Andres 1965). Interessanter Weise entstehen diese erst ein bis zwei Wochen nach Ausbildung der paranodalen Region und können als Reifezeichen eben jener gelten. Experimente mit CGT-MAG-Doppelmutanten zeigten die Bedeutung von Galaktolipiden und MAG für die normale Formation der paranodalen Schlingen und der *transverse bands* (Marcus et al. 2002).

Was die Funktion der Paranodien angeht, so gilt noch heute die Hypothese von Andres (1965) als wahrscheinlich: Als Barriere könnte diese Region den periaxonalen Spalt vom extrazellulären Fluss abschirmen, der sich sonst aus der Region des Ranvier-Knotens einstellen würde.

An die Paranodien grenzen wiederum die Juxtaparanodien an, welche direkt unter dem kompakten Myelin liegen. Es folgen die Internodien, welche fast 99% der Gesamtstrecke von Knoten zu Knoten ausmachen (Salzer 2003).

Höchst interessant ist die Beobachtung, dass vor Beginn der Myelinisierung alle Zelladhäsionsmoleküle, Ionenkanäle und zytoskeletalen Proteine gleichmäßig verteilt sind. Mit Beginn der Myelinisierung setzt jedoch ein Umverteilungsprozess ein, der schließlich zu einer sehr spezifischen Verteilung der Proteine auf die genannten Domänen führt (Salzer 2003). Grundprinzip ist dabei, dass Multiproteinkomplexe aus Adhäsionsmolekülen und Ionenkanälen auf

der Axonmembran an ihren Interaktionspartner auf der Glia-Zelle binden. Es folgt eine stabilisierende Verbindung der Komplexe mit Elementen des Zytoskeletts (Peles und Salzer 2000). Dieser Prozess vollzieht sich zuerst an den Ranvier-Knoten und schreitet dann auf Paranodien und Juxtapanodien fort (Simons M und Trajkovic 2006). Es erscheint plausibel, dass für diese Vorgänge eine intensive Kommunikation zwischen Glia- und Nervenzelle erforderlich ist. Im Folgenden sollen die wichtigsten Moleküle der jeweiligen Domänen in Kürze vorgestellt werden.

Zur Ausbildung der Ranvier-Knoten wird auf glialer Seite das Molekül Gliomedin exprimiert. Es fungiert als Ligand für die neuronalen Adhäsionsmoleküle NrCAM und Neurofascin, welche auf der Oberfläche des Axons liegen (Eshed et al. 2005). Diese Wechselwirkung bewirkt die Rekrutierung von Ankyrin G, welches als zytoskelettales Protein Bindestellen für Natrium-Kanäle besitzt und diese zu konzentrieren vermag. Erforderlich ist die zusätzliche Anhäufung von β IV-Spectrin durch Wechselwirkung mit Ankyrin G, was die Stabilität des Komplexes zudem erhöht (Komada und Soriano 2002). Die Formierung der Paranodien ist abhängig von der Interaktion von Glia-Zellen und Neuronen. Das Molekül Neurofascin-155 auf Seite der Glia-Zelle tritt in Wechselwirkung mit dem Komplex aus Contactin und *contactin-associated protein* (Caspr) auf Seite des Axons (Sherman et al. 2005). Dies bewirkt das Entstehen des paranodalen Komplexes, welcher durch spezielle zytoskelettale Proteine, z.B. Ankyrin B und bestimmte Spectrine, welche mit dem Protein 4.1B wechselwirken, weiter stabilisiert wird (Ogawa et al. 2006).

Schließlich bilden sich die Juxtapanodien aus. Hierbei spielt das GPI-verankerte Adhäsionsmolekül TAG-1 eine entscheidende Rolle. Es wird auf Glia-Zellen und Axonen exprimiert und interagiert in der trans-Konformation mit sich selbst, in der cis-Konformation mit Caspr-2, welches auf dem Axon lokalisiert ist (Traka et al. 2003). Caspr2 assoziiert nun zum einen mit den Kalium-Kanal-Typen Kv1.1 und Kv1.2 (Poliak et al. 1999), zum anderen mit dem zytoskelettalen Protein 4.1B (Denisenko-Nehrbass et al. 2003).

Die Internodien stellen allein aufgrund ihrer Länge einen wichtigen Ort der Axon-Glia-Interaktion dar. Sie sind jedoch relativ arm an spezialisierten Strukturen und spannungsabhängigen Natrium-Kanälen (Salzer 2003). Der periaxonale Spalt zeigt mit einer Breite von 12-14nm eine erstaunliche Konstanz, die unter anderem durch das hier lokalisierte Protein MAG zustande kommen soll (Trapp 1990).

1.5 Gestörte Myelinisierung

1.5.1 Humane Erkrankungen mit Defekten der Myelinscheide

Multiple Sklerose

Bei der Multiplen Sklerose handelt es sich um eine schubweise oder chronisch-progredient verlaufende Entmarkungskrankheit von Gehirn und Rückenmark unbekannter Ätiologie. Die Entmarkung, d.h. der Verlust von Myelin, betrifft die weiße Substanz des ZNS, schwerpunktmäßig das optische System, Rückenmark, Hirnstamm sowie die periventrikuläre weiße Substanz. Makroskopisch zeigen sich im Spätstadium zahlreiche rundliche, bis zu 2cm große, derbe Entmarkungsherde, die der Erkrankung den Namen gaben.

In der BRD beträgt die Prävalenz 70 auf 100.000 Menschen. Damit ist die Multiple Sklerose die häufigste demyelinisierende Erkrankung des Menschen. Das Haupterkrankungsalter liegt zwischen 20 und 40 Jahren, Frauen sind doppelt so häufig betroffen wie Männer. Bei einem Drittel der Patienten stellt die Optikus-Neuritis die Erstmanifestation dar. Im Krankheitsverlauf treten spastische Paresen, Sensibilitätsstörungen, Ataxie sowie Blasenentleerungsstörungen auf. Der Krankheitsverlauf ist bei 60% der Patienten schubförmig remittierend, bei 30% schubförmig progredient und bei 10% primär chronisch progredient (Masuhr und Neumann 2005).

Die Pathogenese dieser häufigen Erkrankung ist nach wie vor ungeklärt. Auffällig ist ein deutliches Nord-Süd-Gefälle des Erkrankungsrisikos. Eine genetische Disposition erscheint bei 33% Konkordanz unter eineiigen Zwillingen wahrscheinlich, doch auch die Exposition gegenüber einem unbekanntem Umweltfaktor vor dem 15. Lebensjahr scheint eine Rolle zu spielen (Masuhr und Neumann 2005). Das Modell einer T-Zell-vermittelten Autoimmunerkrankung wird aktuell favorisiert. Demnach soll es zur peripheren Aktivierung von T-Zellen durch ein unbekanntes Antigen kommen (Masuhr und Neumann 2005).

Die aktivierten Immunzellen wandern über eine gestörte Blut-Hirn-Schranke in das ZNS ein. Bei MS-Patienten konnte die Rolle des Moleküls $\alpha 4\beta 1$ -Integrin bei der Passage von mononukleären Zellen über die Blut-Hirn-Schranke nachgewiesen werden (Engelhardt 2008). Im ZNS reagieren die Immunzellen mit Autoantigenen des Myelins. Aktivierte T-Zell-Klone gegen die Myelinproteine MBP (Allegretta et al. 1990), PLP (Trotter JL et al. 1997) und MOG (Koehler et al. 2002) wurden beschrieben, eine eindeutige Identifikation antigener Substanzen war bisher jedoch nicht möglich. Es folgt eine conse-

kutive Entzündung mit humoralen und zellulären Komponenten infolge derer das Myelin geschädigt wird. Beobachtet werden konnte ein verschobenes Verhältnis von TH1- zu TH2-Zellen zugunsten der TH1-Zellen bei MS-Patienten. Auch die Zytokine IL-12 und IL-23 (Cua et al. 2003), welche vor allem in Mikroglia-Zellen produziert werden und T-Zellen zur Produktion der schädlichen Zytokine INF- γ und IL-17 anregen, rückten in den Fokus des Interesses (Frohman 2006; Lock et al. 2002).

Obwohl es im Laufe der Erkrankung zu Schäden und Verlust von Axonen (Trapp et al. 1998), Oligodendrozyten und Myelin kommt, findet in ca. 40% der Läsionen Remyelinisierung statt und es kommt zur Einwanderung von Oligodendrozyten-Vorläuferzellen (Chang et al. 2000). Auch prämyelinisierende Oligodendrozyten kommen in chronischen MS-Läsionen vor. Die spiralförmige Umwicklung des Axons bleibt jedoch aus (Chang et al. 2002). Ausmaß und Qualität der Remyelinisierung sind folglich nicht ausreichend, um den gesunden Status wiederherzustellen. Die Blockade des Axonwachstums erfolgt dabei unter anderem durch Aktivierung des axonalen Nogo (*neurite outgrowth inhibitor*)-Rezeptors durch Nogo, Omgp oder MAG (zusammenfassend in Spencer et al. 2003; Giger et al. 2008). Die Oligodendrozyten-Differenzierung wird durch die Interaktion von Jagged 1 (auf Astrozyten) und Notch (auf Oligodendrozyten) geblockt (John et al. 2002).

Ein weit verbreitetes Tiermodell zur Erforschung der Multiplen Sklerose ist die sog. *Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis*, kurz EAE. Durch die Injektion von Gewebe des ZNS, aufgereinigtem Myelin oder einzelner Myelin-Proteine, darunter alle oben genannten, wird beim Tier eine demyelinisierende Erkrankung hervorgerufen (Bradl und Linington 1996). Auf die besondere enzephalitogene Potenz von MOG wurde unter 1.3.2 bereits hingewiesen.

Pelizaeus-Merzbacher-Erkrankung (PMD)

Bei der Pelizaeus-Merzbacher-Erkrankung handelt es sich um eine seltene Erkrankung aus dem Formenkreis der Leukodystrophien, d.h. Erkrankungen mit progredienter Degeneration der weißen Substanz des zentralen Nervensystems infolge von Gendefekten. Der Erbgang ist X-chromosomal-rezessiv (Genlocus Xq22). Die infantile Form der Krankheit manifestiert sich im ersten Lebensjahr mit progressiver psycho-motorischer Retardierung und gemischt cerebellären und pyramidalen Schäden. Die Patienten versterben in der Regel im 2. bis 3. Lebensjahrzehnt (Pschyrembel Klinisches Wörterbuch, 2007, S.1413).

Es ist bekannt, dass PMD in der Mehrzahl der Fälle auf der Duplikation des PLP-1-Gens beruht, was zur Überexpression von PLP in Oligodendrozyten führt. Aber auch Missense- und Punkt-Mutationen sowie Deletionen im PLP-Gen führen zu PMD bzw. zu der schwächeren Ausprägung in Form von Spastischer Paraplegie Typ 2 (Krämer-Albers et al. 2006).

Die entsprechenden Mausmodelle, jimpy, msd und rumpshaker, werden unter 1.5.2 vorgestellt.

1.5.2 Murine Modelle dysmyelinisierender Erkrankungen

Die Shiverer-Mauslinie

Bei der Shiverer-Mauslinie (shi) handelt es sich um eine autosomal-rezessive Mutante mit Deletion von 5 der 7 Exons im MBP-Gen auf Chromosom 18. Dies hat zur Folge, dass kein funktionsfähiges MBP-Protein produziert wird (Roach et al. 1985).

Während die Myelinscheidenbildung im PNS unbeeinträchtigt bleibt, findet sich im ZNS kaum kompaktes Myelin (Rosenbluth 1980), typischerweise fehlt die *major dense line* bei Erhalt der *intraperiod line* (Privat et al. 1979). Im Gegensatz zur jimpy-Mauslinie (siehe 1.5.2) wurden keine axonalen Abnormalitäten beschrieben.

Phänotypisch entwickeln die Mäuse früh, etwa ab dem 12. postnatalen Tag, einen starken Tremor, später auch tonische Krampfanfälle. Die Tiere versterben vorzeitig im Alter von 50 bis 100 Tagen, in der Regel im Rahmen eines Krampfanfalles (Chernoff 1981).

Interessanter Weise zeigen die Oligodendrozyten der Doppel-Mutante MBP-/-PLP-/- im Vergleich zu Shiverern vermehrt die Fähigkeit, Axone zu umhüllen (Uschkureit et al. 2000). Zudem lebt die Doppelmutante mit sechs Monaten etwa doppelt so lang wie Shiverer (Klugmann et al. 1997).

Durch Expression des Wildtyp MBP-Gens in transgenen Tieren können die Shiverer-typischen Defizite überwunden werden (Readhead et al. 1987). Dabei reicht die Expression einer der vier MBP-Isoformen offenbar aus, nämlich der 14kDa-Isoform (Kimura et al. 1989). Anhand von Shiverern konnte die Bedeutung von MBP für den Transport von Myelin-Komponenten näher definiert werden. So ist das Neuronen-abhängige Konzentrieren von GalC an der Plasmamembran in Shiverern aufgehoben. Des Weiteren zeigten Extraktionsversuche mit dem Detergens *CHAPS*, dass sich die Distribution von PLP in der Membran zu verändern scheint: In Wildtyp-Zellen befand sich PLP in der unlöslichen, leichten Extraktionsfraktion, in Shiverer-Zellen jedoch in der schweren Fraktion (Fitzner et al. 2006).

Mauslinien mit mutantem PLP

Die sog. jimpy-Mauslinie ist gekennzeichnet durch schwere Hypomyelinisierung des ZNS und beruht auf einer Deletion des Exons 5 sowie einer Modifikation der C-terminalen Sequenz im Gen für PLP/DM20 (Nave et al. 1986).

Da das PLP-Gen auf dem X-Chromosom lokalisiert ist, sind männliche Tiere betroffen, worauf sich die hier gemachten Aussagen beziehen. Weibchen sind nur betroffen, sofern sie homozygot die Mutation tragen. Im heterozygoten Zustand entsprechen sie in der Regel phänotypisch dem Wildtyp.

Die Tiere entwickeln einen Tremor und tonische Krampfanfälle und versterben zum Zeitpunkt der stärksten Myelinisierung, in der vierten postnatalen Woche (Baumann und Pham-Dinh 2001).

In jimpy-Oligodendrozyten konnte ein gestörter PLP/DM20 Einbau in die Plasmamembran beobachtet werden, der Transport in die Zellfortsätze ist insuffizient (Ghandour et al. 2002). Zudem zeigte sich kein Effekt von cAMP auf jimpy-Oligodendrozyten. cAMP bewirkt in Wildtyp-Zellen Reifung und entsprechende morphologische Veränderungen (Ghandour et al. 2002). Mit dieser Beobachtung in Einklang konnte ein erhöhter Anteil an immaturren Oligodendrozyten festgestellt werden. Auch die Apoptoserate soll deutlich gesteigert sein (Klugmann et al. 1997). Bei den betroffenen Tieren soll die Oligodendrozyten-Zahl aufgrund verfrühten Zelltodes stark reduziert sein (Knapp et al. 1986).

Das produzierte Myelin ist häufig Schollen-artig an Blutgefäßen lokalisiert. Die Myelinscheiden sind in ihrer Dicke reduziert und bilden keine *intraperiod line* aus (Duncan et al. 1989).

Bei der sog. msd-Mauslinie (*myelin synthesis deficient*) liegt eine Missense-Mutation im PLP/DM20-Gen zugrunde, welche zum Austausch der Aminosäure Alanin gegen Valin an Position 242 (A242V) der Aminosäurekette führt (Gow et al. 1998). Phänotypisch ist die msd-Maus von der jimpy-Maus nicht zu unterscheiden. Allerdings hat die msd-Maus etwa doppelt soviel Myelin wie Tiere der jimpy-Linie (Billings-Gagliardi et al. 1980).

Eine Akkumulation des mutierten Genproduktes perinukleär wurde beschrieben und stellt wahrscheinlich die Anhäufung fehlgefalteten Proteins im Endoplasmatischen Reticulum dar. Die Apoptoserate wird als 2- bis 3-fach erhöht angegeben, wobei es sich um reife Oligodendrozyten handeln soll (Gow et al. 1998).

Bei der sog. rsh-Mauslinie (*rumpshaker*) handelt es sich ebenfalls um eine Missense-Mutation des PLP/DM20-Gens (I186T). Sie geht trotz reduzierter Myelin-Menge mit einem vergleichsweise milden

Phänotyp einher. Ein Verlust der morphologisch unauffälligen Oligodendrozyten scheint nicht vorzukommen und die Lebenserwartung der Tiere ist normal (Schneider Ar et al. 1992). Dennoch konnte auch für die rsh-Maus eine Akkumulation des mutierten Genproduktes perinukleär sowie eine erhöhte Apoptoserate reifer Oligodendrozyten beschrieben werden (Gow et al. 1998).

Neben mutierten PLP-Linien existiert auch eine PLP-Knockout-Linie. Die Tiere können weder PLP noch seine Isoform DM20 synthetisieren. Überraschender Weise ist die phänotypische Ausprägung deutlich milder als bei den oben beschriebenen Mutanten. Die Tiere bilden kompaktes Myelin und haben eine normale Lebensspanne. Allerdings bilden sie ab dem Alter von 6 bis 8 Wochen axonale Schwellungen aus und es kommt zu Axondegeneration (Griffiths et al. 1998). Auch ultrastrukturelle Veränderungen in der *intraperiod line* des Myelins und eine erhöhte Neigung zu Fixationsartefakten sind beschrieben worden (Klugmann et al. 1997).

Die CGT-Knockout-Maus

Der *Ceramid-Galactosyl-Transferase*- (CGT-) Knockout-Linie fehlt das Schlüsselenzym zur Galaktolipid-Biosynthese, die *UDP-Galactose-Ceramid-Galactosyltransferase* (Bosio et al. 1996). Dies hat zur Konsequenz, dass die Tiere weder im zentralen noch im peripheren Nervensystem Galaktosylceramid oder Galaktosulfatid bilden können (Bosio et al. 1996). Interessanter Weise erscheint die Struktur des Myelins normal, abgesehen von einer reduzierten Dicke der Myelinschicht. Ultrastrukturell zeigen sich Auffälligkeiten der nodalen und paranodalen Region, etwa zahlreiche Hemi-Nodes und das Fehlen von *transverse bands* (Dupree JL et al. 1998).

Die Nervenleitgeschwindigkeit ist deutlich herabgesetzt und ab dem zehnten postnatalen Tag treten Tremor und Paresen auf. Der Tod setzt ab Tag 20 pp ein. Die Mutation wirkt sich jedoch nicht auf die Anzahl von Oligodendrozyten, deren Differenzierungsgrad oder die Expression anderer Myelogene aus (Bosio et al. 1996).

Die Squalen-Synthase-Knockout-Maus

Bei dieser Mauslinie liegt eine konditionale Mutation des Squalen-Synthase (SQS)-Gens in Oligodendrozyten vor, was zum kompletten Verlust der Cholesterin-Synthese in der betroffenen Zelle führt. Die Tiere entwickeln ab dem Alter von zwei Wochen Tremor und Ataxie. Ein Drittel der Mutanten verstirbt 20 bis 30 Tage nach der Geburt. Der Großteil der Tiere, welche diese Schwelle überleben, erreicht das

Alter von Wildtyp-Mäusen. Im Alter von 100 postnatalen Tagen zeigen die Tiere einen deutlich gemilderten Phänotyp.

Interessanter Weise findet eine Cholesterin-Anreicherung bis über 70% des Normalwertes statt, obwohl ein Cholesterin-Import über die Blut-Hirn-Schranke ins ZNS nicht möglich ist. Dies bedeutet, dass von der Mutation betroffene Oligodendrozyten Cholesterin von benachbarten Zellen aus einer bisher unidentifizierten Quelle importiert haben müssen. Das gebildete Myelin ist zwar quantitativ geringer ausgeprägt, jedoch zeigt es normale Proteinzusammensetzung. Insbesondere kommt es nicht zu PLP-Transportstörungen, wie sie für die jimpy- und rsh-Linie beschrieben wurden (Saher et al. 2005).

1.6 Ziele dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit war die nähere Charakterisierung der Mausmutante Shiverer. Insbesondere sollte festgestellt werden, ob der Membrantransport und die zelluläre Lokalisation von Myelinproteinen durch das Fehlen von MBP beeinträchtigt werden.

Die Akkumulation der Myelinproteine PLP, MOG und MAG im Zytoplasma der Mausmutante konnte demonstriert werden. Kontrolltiere zeigten hingegen nur in den ersten beiden Lebenswochen vergleichbare Ergebnisse.

Um einen allgemeinen Effekt der gestörten Myelinisierung auf den Proteintransport, etwa im Sinne eines Aufstaus, auszuschließen, untersuchten wir Schnitte der oben beschriebenen Squalen-Synthase-Knockout-Maus. Schließlich konnten wir einen möglichen Effekt von MBP auf die Distribution von PLP, MOG und MAG anhand von Extraktionsexperimenten und Western-Blot-Analysen zeigen.

Kapitel 2

Material und Methoden

2.1 Verwendete Materialien in alphabetischer Reihenfolge

- Acrylamid-Lösung 30% (AppliChem; Darmstadt, Deutschland)
- Albumin Fraction V very low endotoxin (aus Rinderserum) (AppliChem; Darmstadt, Deutschland)
- Albumin, Bovine Serum, Fraction V, Fattyacid-Poor, Endotoxin-Free (Calbiochem; Darmstadt, Deutschland)
- Apo-Transferrin human, cell culture tested (Sigma-Aldrich Biochemie GmbH; Hamburg, Deutschland)
- B-27 Supplement (Gibco, Invitrogen GmbH; Karlsruhe, Deutschland)
- Bandelin Sonopuls HD 2070 (Bandelin electronic GmbH Co. KG; Berlin, Deutschland)
- Blotting Membrane Protran Nitrocellulose 100% pure (Whatman GmbH; Dassel, Deutschland)
- BME, Basal Medium Eagle (Gibco, Invitrogen GmbH; Karlsruhe, Deutschland)
- Bromophenol Blue (Sigma-Aldrich Biochemie GmbH; Hamburg, Deutschland)
- Brutschränke des Typs Heraeus HERAcell 150 tri-gas incubator (Heraeus Holding GmbH; Hanau, Deutschland)
- Cell culture dishes, 60mm x 15mm, BD BioCoat (Becton Dickinson; Heidelberg, Deutschland)

- Cell culture dishes, 100mm x 20mm (Becton Dickinson; Heidelberg, Deutschland)
- Cell culture flask, 750ml, BD Falcon™ (Becton Dickinson; Heidelberg, Deutschland)
- Cell culture flask, 70ml, BD Falcon™ (Becton Dickinson; Heidelberg, Deutschland)
- Cell culture flask, 50ml, BD Falcon™ (Becton Dickinson; Heidelberg, Deutschland)
- CHAPS für die Molekularbiologie (AppliChem; Darmstadt, Deutschland)
- Cholesterol, Highly Purified (Calbiochem; Darmstadt, Deutschland)
- Complete Protease Inhibitor, Cocktailltabletten (Roche Deutschland Holding GmbH; Mannheim, Deutschland)
- Conical Tube, 50ml, BD Falcon™ (Becton Dickinson; Heidelberg, Deutschland)
- Conical Tube, 15ml, BD Falcon™ (Becton Dickinson; Heidelberg, Deutschland)
- Dako Pen (Dako; Hamburg, Deutschland)
- D-MEM, Dulbecco´s Modified Eagle Medium (Gibco, Invitrogen GmbH; Karlsruhe, Deutschland)
- Dulbecco´s PBS without Ca and Mg (PAA Laboratories GmbH; Pasching, Österreich)
- EDTA-Lösung pH 8.0 (AppliChem; Darmstadt, Deutschland)
- Eppendorf Safe-Lock Reaktionsgefäße 1,5ml (Eppendorf AG; Hamburg, Deutschland)
- Eppendorf Safe-Lock Reaktionsgefäße 2,0ml (Eppendorf AG; Hamburg, Deutschland)
- EpT.I.P.S. Standard 1000µl (Eppendorf AG; Hamburg, Deutschland)
- EpT.I.P.S. Standard 200µl (Eppendorf AG; Hamburg, Deutschland)
- EpT.I.P.S. Standard 10µl (Eppendorf AG; Hamburg, Deutschland)

- Ethanol 70% vergällt mit MEK (neoLab Migge Laborbedarfs-Vertriebs GmbH; Heidelberg, Deutschland)
- Ethylene glycol 99% (Sigma-Aldrich Biochemie GmbH; Hamburg, Deutschland)
- Foetal Bovine Serum (PAA Laboratories GmbH; Pasching, Österreich)
- Formaldehyd-Lösung 37% für die Molekularbiologie, BioChemica (AppliChem; Darmstadt, Deutschland)
- Gentamycinsulfat BioChemica (AppliChem; Darmstadt, Deutschland)
- Gentamycin Sulfate (Calbiochem; Darmstadt, Deutschland)
- D(+)-Glucose wasserfrei für die Molekularbiologie (AppliChem; Darmstadt, Deutschland)
- GlutaMAX™-I Supplement 200mM (Molecular Probes, Invitrogen GmbH; Karlsruhe, Deutschland)
- L-Glutamine (200mM) (PromoCell; Heidelberg, Deutschland)
- Glycerin wasserfrei für die Molekularbiologie (AppliChem; Darmstadt, Deutschland)
- Glycin für die Molekularbiologie (AppliChem; Darmstadt, Deutschland)
- HBSS (Hank´s Balanced Salt Solution), liquid (Gibco, Invitrogen GmbH; Karlsruhe, Deutschland)
- Horse Serum (PAA Laboratories GmbH; Pasching, Österreich)
- Immun-Star HRP Chemiluminescent Substrate Kit (Bio-Rad Laboratories Inc.; München, Deutschland)
- Insulin from bovine pancreas, powder, cell culture tested (Sigma-Aldrich Biochemie GmbH; Hamburg, Deutschland)
- Insulin-Transferrin-Selenium A-Supplement (Gibco, Invitrogen GmbH; Karlsruhe, Deutschland)
- Kaliumchlorid für die Molekularbiologie (AppliChem; Darmstadt, Deutschland)
- 2-Mercapto-Ethanol, mind. 99% (Sigma-Aldrich Biochemie GmbH; Hamburg, Deutschland)

- Methanol BioChemica (AppliChem; Darmstadt, Deutschland)
- 2-Methyl-2-Butanol (Sigma-Aldrich Biochemie GmbH; Hamburg, Deutschland)
- Millipore Filtereinheiten mit Express® PLUS Membran 0,22µm (neoLab Migge Laborbedarfs-Vertriebs GmbH; Heidelberg, Deutschland)
- Mini Trans-Blot Cell (Bio-Rad Laboratories Inc.; München, Deutschland)
- Mowiol (Calbiochem; Darmstadt, Deutschland)
- Natriumcarbonat wasserfrei BioChemica (AppliChem; Darmstadt, Deutschland)
- Natriumchlorid zur Analyse (AppliChem; Darmstadt, Deutschland)
- Natriumpyruvat für die Zellkultur BioChemica (AppliChem; Darmstadt, Deutschland)
- Natriumselenit wasserfrei reinst (AppliChem; Darmstadt, Deutschland)
- Objektträger 26 x 76mm, unbekantet, mit Mattrand einseitig, 50 Stück (OmniLab; Mettmenstetten, Deutschland)
- OptiMEM ® (Invitrogen GmbH; Karlsruhe, Deutschland)
- Penicillin-Streptomycin, liquid (Invitrogen GmbH; Karlsruhe, Deutschland)
- Peressigsäure 15% reinst (AppliChem; Darmstadt, Deutschland)
- Poly-L-Lysine hydrobromide mol wt 3000 (Sigma-Aldrich Biochemie GmbH; Hamburg, Deutschland)
- Poly-L-Lysine hydrobromide mol wt 30000 (Sigma-Aldrich Biochemie GmbH; Hamburg, Deutschland)
- Ponceau S (Sigma-Aldrich Biochemie GmbH; Hamburg, Deutschland)
- Potassium phosphate monobasic, ACS reagent, more than 99% (Sigma-Aldrich Biochemie GmbH; Hamburg, Deutschland)
- Prestained Protein Molecular Weight Marker (Fermentas International GmbH; St. Leon-Rot, Deutschland)

- Progesterone (Sigma-Aldrich Biochemie GmbH; Hamburg, Deutschland)
- Putrescine (Tetramethylethylenediamin) Dihydrochloride (Sigma-Aldrich Biochemie GmbH; Hamburg, Deutschland)
- Röntgenfilme CL-XPosure Film (Thermo Fisher Scientific; Bonn, Deutschland)
- Runde Deckgläser, 15mm Durchmesser (R. Langenbrinck Labor- und Medizintechnik; Teningen, Deutschland)
- Salzsäure Maßlösung (1M) (AppliChem; Darmstadt, Deutschland)
- SDS BioChemica (Puder) (AppliChem; Darmstadt, Deutschland)
- Slim-Fast Pulver Vanille (Allpharm Vertriebs GmbH; Messel, Deutschland)
- Natrium phosphate monobasic (Sigma-Aldrich Biochemie GmbH; Hamburg, Deutschland)
- Sterilbänke des Typs LaminAir HBB 2448 (Heraeus Holding GmbH; Hanau, Deutschland)
- L-Thyroxine, Natrium Salt (Calbiochem; Darmstadt, Deutschland)
- 2-2-2 Tribromoethanol (Sigma-Aldrich Biochemie GmbH; Hamburg, Deutschland)
- Tris Pufferqualität (AppliChem; Darmstadt, Deutschland)
- Triton X-100 (AppliChem, Darmstadt, Deutschland)
- L-3,3',5-Triiodothyronine, Natrium Salt (Calbiochem; Darmstadt, Deutschland)
- Trypsin, 0.25% (1X) with EDTA 4Na, liquid (Gibco, Invitrogen GmbH; Karlsruhe, Deutschland)
- Tween 20 Lösung 10% (AppliChem; Darmstadt, Deutschland)
- Unstained Protein Molecular Weight Marker (Fermentas International GmbH; St. Leon-Rot, Deutschland)
- Vortex-Genie 2 (Scientific Industries, Inc.; New York, USA)

- Zellkultur-Platte, 12 Vertiefungen, Flachboden mit Deckel (OmniLab; Mettmenstetten, Deutschland)
- Zellkultur-Platte, 24 Vertiefungen, Flachboden mit Deckel (OmniLab; Mettmenstetten, Deutschland)
- Konische Zentrifugenröhrchen 50ml (OmniLab Nalgene; Kleinfeld, Deutschland)
- Konische Zentrifugenröhrchen 15ml (OmniLab Nalgene; Kleinfeld, Deutschland)
- Kryostat (Thermo Shandon GmbH; Frankfurt, Deutschland)
- Zentrifuge vom Typ Eppendorf Centrifuge 5702 R (Eppendorf AG; Hamburg, Deutschland)
- Zentrifuge vom Typ Heraeus Biofuge Pico (Heraeus Holding GmbH; Hanau, Deutschland)

Sämtliche Materialangaben im Folgenden entsprechen obiger Liste und den genannten Herstellern.

2.2 Allgemeine Puffer und Lösungen

- Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS):
 - NaCl 150mM
 - Na₂HPO₄ x 2 H₂O 80mM
 - NaH₂PO₄ x 2 H₂O 17mM
 - in aqua dest.
 - pH 7,4
- PBS-Tween (PBT):
 - PBS
 - Tween 20 0,05% (v/v)
- Tris-EDTA (TE):
 - Tris HCl 50mM
 - EDTA 5mM
 - pH 7,4
- SDS-PAGE Probenpuffer (Synonym Lämmli-Puffer):
 - Tris-HCl 62,5mM

- Glycerin 10%
- SDS 10%
- 2-Mercapto-Ethanol 3,3%
- Bromphenolblau 1 Spatelspitze
- pH 6,8
- SDS-PAGE Laufpuffer:
 - Tris-HCl 25mM
 - Glycin 190mM
 - SDS 1%
 - pH 8,8
- Transferpuffer:
 - Tris-HCl 25mM
 - Glycin 190mM
 - Methanol 20% (v/v)
 - in aqua dest.
- SDS-PAGE Trenngel-Puffer:
 - Tris-HCl 1,5M
 - pH 8,8
- SDS-PAGE Sammelgelpuffer:
 - Tris-HCl 0,5M
 - pH 6,8
- Ponceau S:
 - Ponceau S 0,1% (w/v) in
 - Essigsäure 5% (w/v)
- Mowiol:
 - Über Nacht werden 2,4g Mowiol in 6ml Glycerin und 6ml Wasser gelöst. Anschließend wird der Lösung 0,2M Tris-HCl, pH 8,5, zugesetzt und für 10min auf 50 °C erwärmt. Zentrifugation bei 1000 g für 15min soll das Mowiol klären. Lagerung bei –20 °C.

2.3 Verwendete Antikörper

2.3.1 Erstantikörper

- Anti-CNPase (Clon 11-5B, Sigma-Aldrich Biochemie GmbH; Hamburg, Deutschland)
 - monoklonal aus Maus, IgG1
 - verwendete Verdünnung 1:200 (Immunofluoreszenz) bzw. 1:2000 (Western Blot)
- Anti-Iba1 (Wako Pure Chemical Industries; Neuss, Deutschland)
 - polyklonal aus Kaninchen
 - verwendete Verdünnung 1:1000 (Immunofluoreszenz)
- Anti-Lamp1 (CD 107a) (Clon H5G11, Santa Cruz Biotechnology; Heidelberg, Deutschland)
 - monoklonal aus Maus, IgG1
 - verwendete Verdünnung 1:50 bis 1:200 (Immunofluoreszenz)
- Anti-MAG (Clon 513, Millipore GmbH; Schwalbach, Deutschland)
 - monoklonal aus Maus, IgG
 - verwendete Verdünnung 1:100 (Immunofluoreszenz) bzw. 1:500 (Western Blot, nicht reduzierende Bedingungen erforderlich)
- Anti-MOG (Clon 8-18-C5, freundlich überlassen von C Linington, Max-Planck-Institut für Neurobiologie, Martinsried)
 - monoklonal, IgG1
 - verwendete Verdünnung 1:50 (Immunofluoreszenz) bzw. 1:2000 (Western Blot)
- Olig-2 (freundlich überlassen von KA Nave, Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin, Göttingen)
 - monoklonal aus Kaninchen, IgG
 - verwendete Verdünnung 1:200 (Immunofluoreszenz)
- Anti-PLP (3F4, freundlich überlassen von KA Nave, Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin, Göttingen)
 - monoklonal, IgG1

- verwendete Verdünnung 1:200 (Immunofluoreszenz) bzw. 1:50 (Western Blot)
- Anti-PLP (431A, freundlich überlassen von KA Nave, Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin, Göttingen)
 - polyklonal aus Kaninchen
 - verwendete Verdünnung 1:1000 (Immunofluoreszenz)

2.3.2 Zweitantikörper

Alle Zweitantikörper wurden von Jackson ImmunoResearch Laboratories Europe Ltd. (Suffolk, Großbritannien) erworben, sofern nicht anders vermerkt.

- Anti-Maus-Antikörper, Cy3-konjugiert
 - Goat anti-mouse IgG (H+L), Cy3 conjugated
 - Goat anti-mouse IgM (μ -chain specific), Cy3 conjugated
- Anti-Maus-Antikörper, Wellenlänge 488
 - Alexa Fluor® 488 goat anti-mouse IgG1 (von Invitrogen GmbH; Karlsruhe, Deutschland)
- Anti-Kaninchen-Antikörper, Cy3 konjugiert
 - Goat anti-rabbit IgG (H+L), Cy3 conjugated
- Anti-Kaninchen-Antikörper, Wellenlänge 488
 - Goat anti-rabbit IgG Dylight 488 (von Pierce, Thermo Fisher Scientific; Bonn, Deutschland)
- Anti-HRP-Antikörper
 - Goat anti-mouse IgG (H+L), HRP conjugated
 - Goat anti-rabbit IgG (H+L), HRP conjugated

2.4 Tiere und Gehirnpräparation

2.4.1 Erstellen von Hirnhomogenisat

Für alle im Folgenden beschriebenen Experimente mit Gehirnhomogenisat wurden die Gehirne von drei 21 Tage alten Shiverer-Mäusen (zwei Männchen, ein Weibchen) sowie von drei 21 Tage alten Wildtyp-Mäusen (zwei Männchen, ein Weibchen) verwendet.

Die Zucht der Tiere erfolgte nach den Bestimmungen der Landesregierung und der Europäischen Union im Tierhaus des Max-Planck-Institutes für experimentelle Medizin, Göttingen. Der Genotyp der Shiverer-Zuchtpaare wurde durch PCR gesichert.

Die Tiere wurden mit *Diethylether* narkotisiert und decapitiert. Die Gehirne wurden direkt nach Entnahme bei -80°C eingefroren. Zur Weiterverarbeitung wurden sie vorsichtig aufgetaut und jeweils mit 1ml PBS in ein Probenröhrchen überführt. Der Protease-Inhibitor *Complete* wurde 1:25 (v/v) zugesetzt. Anschließend erfolgte die Ultraschall-Homogenisierung mittels *Bandelin Sonopuls HD 2070*. Sämtliche Arbeitsschritte erfolgten bei 4°C .

Von einer Zentrifugation des Homogenisates wurde aufgrund zu hohen Materialverlustes abgesehen. Spätere Experimente zeigten, dass der erreichte Zerkleinerungsgrad vollends ausreichend war.

2.4.2 Erstellen von Gefrierschnitten

Für die im Folgenden beschriebenen Experimente mit Gefrierschnitten wurden die Gehirne von sechs Wildtyp-Mäusen der NMRI-Linie (bei Präparation P7, P14, P21, je 2 Tiere) sowie von zwei Shiverer-Mäusen (bei Präparation P21) verwendet.

Die Zucht der Tiere erfolgte nach den Bestimmungen der Landesregierung und der Europäischen Union im Tierhaus des Max-Planck-Institutes für experimentelle Medizin, Göttingen.

Die Tiere wurden durch intraperitoneale *Avertin*-Applikation (1,25mg/dl *2-2-2 Tribromoethanol*, 2,5ml/dl *2-Methyl-2-Butanol* in aqua dest., 0,2ml auf 10g Mausekörpergewicht) tief betäubt. Anschließend wurde der rechte Vorhof des Herzens durch einen kleinen Schnitt eröffnet und das Gefäßsystem über eine Kanüle in der linken Herzkammer erst mit *HBSS* für 5min und dann für 15min mit 4% *PFA* in *PBS* gespült. Das isolierte Hirngewebe wurde für eine Nacht in 4% *PFA* in *PBS* nachfixiert und anschließend bis zur Erstellung von Gefrierschnitten bei -80°C eingefroren.

Die Erstellung von Gefrierschnitten, ausschließlich transversal orientiert, erfolgte mittels *Kryostat*. Die $30\mu\text{m}$ dicken Schnitte wurden sofort in 24-Loch-Platten mit einem vorgelegten Puffer aus *PBS* mit 25% *Ethylenglykol* und 25% *Glycerin* überführt und anschließend bei -20°C eingefroren.

2.4.3 Gefrierschnitte der Squalen-Synthase-Knockout-Maus

Sechs Objektträger mit insgesamt 12 Gefrierschnitten der Squalen-Synthase-Knockout-Maus bzw. entsprechender Kontrolltiere der Al-

tersstufen P9, P17 und P20 wurden freundlich zur Verfügung gestellt von Gesine Saher, Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin, Göttingen. Die Zucht der Tiere erfolgte nach den Bestimmungen der Landesregierung und der Europäischen Union im dortigen Tierhaus.

2.5 Zellkulturen

2.5.1 Wachstumsbedingungen

Sämtliche Zellen wurden in Brutschränken des Typs *Heraeus HERA-cell 150 tri-gas incubator* bei 37 °C und 7,5% CO₂ kultiviert. Dabei wuchsen die Zellen in Plastikschaalen, sog. *dishes*, oder auf Deckgläsern, den sog. *coverslips*, welche in die Vertiefungen von 12-Loch-Platten eingebracht wurden.

Sowohl *dishes* als auch *coverslips* wurden zwecks besserer Zelladhäsion vor Aussaat der Zellen mit *Poly-L-Lysin* beschichtet. Die ausgebrachte Zelldichte betrug für Schalen mit 10cm Durchmesser 0,7 - 1 x 10⁷ Zellen pro Schale sowie für Glasplättchen mit 11mm Durchmesser 1 x 10⁵ Zellen.

2.5.2 Medien

- Sato-Medium (modifiziert nach Bottenstein und Sato 1979)
 - DMEM (13,4g/l)
 - NaHCO₃ (0,2%)
 - Insulin (0,01mg/ml)
 - Transferrin (0,01mg/ml)
 - Progesteron (200nM)
 - Putrescin (100μM)
 - Natriumselenit (220nM)
 - 3,3',5-Triiodo-L-Thyronin (500nM)
 - L-Thyroxin (500nM)
 - Gentamycin (25μg/ml)

Nach Steril-Filtration Zusatz von 5% *Pferdeserum* (v/v).

- Super-Sato für primäre Kulturen
 - B-27 Supplement (20μg/ml)
 - Pferdeserum (1% v/v)
 - L-Thyroxin (500nM)

- 3,3',5-Triiodo-L-Thyronin (500nM)
- GlutaMAX (10 μ g/ml)
- Penicillin-Streptomycin (10 μ g/ml)
- Pyruvat-acid Lösung 1,1% (1% v/v)

in *DMEM*, Steril-Filtration

2.6 Zelllinien

2.6.1 *Oli neu*-Zellen

Die Zelllinie *Oli neu* wurde gewonnen durch retrovirale Infektion von Oligodendrozyten-Vorläuferzellen der Maus mit dem *t-neu* Onkogen (Jung et al.1995). Die Kultur der Zelllinie erfolgt unter oben genannten Bedingungen in modifiziertem Sato-Medium mit 5% *Pferdeserum*.

2.6.2 Primäre Oligodendrozyten der Maus, Gewinnung und Kultur

Die beschriebene Gewinnung primärer Oligodendrozyten orientiert sich an der von Trotter J et al. (1989) beschriebenen Methode. Das Mittelhirn und die Hemisphären von sechs neugeborenen Mäusen (P0) wurden frei präpariert und in *HBSS*, 37 °C, abgelegt. Anschließend wurden unter dem Mikroskop die Meningen entfernt und das Material für 5min in 0,25%-iges *Trypsin-EDTA*, 37 °C, gegeben. Anschließend wurde einmal mit *HBSS* gewaschen und 10ml Medium (*BME* mit 10% *Pferdeserum*, 1% *GlutaMAX* und 1% *Penicillin-Streptomycin*) auf das Material gegeben. Mit einer 10ml-Pipette erfolgte die grobe Zerkleinerung. Anschließend wurde die Zellsuspension zu gleichen Teilen auf zwei Zellkulturflaschen von je 75cm³ verteilt und mit je 10ml Medium aufgefüllt (*BME* mit 10% *Pferdeserum*, 1% *GlutaMAX* und 1% *Penicillin-Streptomycin*). Zwei Mal pro Woche erfolgte ein Mediumwechsel, am Tag 14 wurden die Oligodendrozyten von der Kultur abgeschüttelt. Zu diesem Zeitpunkt ist bereits ein dichter Astrozyten-Rasen entstanden, welchem Oligodendrozyten fester sowie Makrophagen und Mikroglia-Zellen lockerer aufgelagert sind. Zuerst wurden unter mikroskopischer Kontrolle die locker aufsitzenden Makrophagen durch Klopfen an die Zellkulturflaschenwand gelöst. Es folgte ein einmaliger Waschschrift mit Medium, anschließend wurde neues Medium in die Flasche gefüllt. Die Flaschen wurden dann ca. zwanzigmal in der Horizontalen kräftig geschüttelt, das geschüttelte Medium in

ein 50ml Probenröhrchen gefüllt. Anschließend wurde für 10min bei 900U zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und der Bodensatz in 1ml Super-Sato-Medium resuspendiert.

Die Zellen wurden schließlich gezählt, wofür eine Verdünnung von 1:10 hergestellt wurde. 500.000 bis 700.000 Zellen wurden auf eine vorbereitete Zellkulturpetrischale von 6cm Durchmesser und / oder 100.000 bis 150.000 Zellen auf ein Deckglas von 15mm Durchmesser gegeben.

2.7 Immunofluoreszenzfärbungen

2.7.1 Immunofluoreszenzfärbung von kultivierten Zellen

Nach Absaugen des Kulturmediums unter der Sterilbank des Typs *LaminAir HBB 2448* wurden die auf Deckgläsern in einer 12-Loch-Platte befindlichen Zellen mit *PBS* gewaschen und anschließend für 15 bis 30min in 4% *PFA* in *PBS* fixiert. Außerhalb der Sterilbank folgten drei 5-minütige Waschschrte in *PBS* und anschließende Permeabilisierung für 60sec in *PBS* mit 0,1% *Triton*. Die folgende Inkubation in *PBS* mit 1% *BSA* (*Albumin, Bovine Serum, Fraction V, Fattyacid-Poor, Endotoxin-Free*) und 1% *Tween* für 15 bis 60min diente der Absättigung unspezifischer Protein-Bindestellen.

Der jeweilige Erstantikörper wurde in *PBS* mit 1% *BSA* und 1% *Tween* für 1 Stunde bei Raumtemperatur aufgebracht und nachfolgend drei Mal für je 5min in *PBS* gewaschen. Aufbringen des jeweiligen Zweitantikörpers erfolgte analog zum Erstantikörper. Erneut wurden die Zellen drei Mal für je 5min in *PBS* gewaschen. Die Deckgläser mit den an ihnen haftenden Zellen wurden zur Beseitigung der *PBS*-Lösung kurz in destilliertes Wasser getaucht, dann mittels *Mowiol* auf Objektträgern fixiert und vor Auswertung mindestens für eine Nacht bei Raumtemperatur getrocknet.

2.7.2 Immunofluoreszenzfärbung von Gefrierschnitten der Mäusegehirne

Die Erstellung von Gefrierschnitten der Mäusegehirne erfolgte wie unter 2.4.2 beschrieben. Die aufgetauten Schnitte wurden in 24-Loch-Platten überführt und unter sanftem Rütteln fünfmal für je 5min in *PBS* gewaschen. Anschließende Inkubation für 1 Stunde bei Raumtemperatur in *PBS* mit 5% *Pferdeserum* und 0,5% *Triton-X100* (gilt für alle vor dem 28.02.07 gefärbten Schnitte) bzw. in *PBS* mit 1% *BSA* und 1% *Tween* (gilt für alle ab dem 28.02.07

gefärbten Schnitte) diene der Absättigung unspezifischer Protein-Bindestellen.

Anschließend wurde der jeweilige Erstantikörper in *PBS* mit 3% *Pferdeserum* und 0,5% *Triton* (vor dem 28.02.07) bzw. in *PBS* mit 1% *BSA* und 1% *Tween* (ab dem 28.02.07) bei 4°C für ein bis zwei Nächte bzw. bei Raumtemperatur für 3 Stunden unter leichtem Rütteln mit den Schnitten inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen für je 5min in *PBS* wurden die Schnitte analog mit dem Zweitantikörper gefärbt. Nach abermaligem Waschen in *PBS* wurden die Schnitte auf Objektträger überführt und nach Trocknen bei Raumtemperatur mittels *Mowiol* unter einem Deckglas fixiert. Vor Auswertung härtete *Mowiol* mindestens eine Nacht bei Raumtemperatur aus.

2.7.3 Immunofluoreszenzfärbung von Objektträger-fixierten Gehirnschnitten

Die beschriebene Methode gilt ausschließlich für Schnitte der Squalen-Synthase-Knockout-Maus und entsprechender Kontrolltiere (freundlich überlassen von Gesine Saher, Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin, Göttingen).

Die auf Objektträgern fixierten Schnitte wurden mit einem Fettstift (*Dako Pen*) umrundet. Nun wurde innerhalb des Fettkreises analog zu dem unter 2.6.2 beschriebenen Protokoll gewaschen und mit Erst- und Zweitantikörpern inkubiert.

Diese Inkubation mit Antikörpern erfolgte in einer feuchten Kammer, welche durch Auslegen eines geschlossenen Plastikgefäßes mit nassen Tüchern erzeugt wurde. Eindeckeln erfolgte analog zu der unter 2.6.2 beschriebenen Methode.

2.8 Fluoreszenzmikroskopie

Die Auszählung aller Immunofluoreszenz-gefärbter Gefrierschnitte erfolgte an einem Fluoreszenzmikroskop des Typs *Zeiss Axiophot* (Carl Zeiss MicroImaging GmbH; Jena, Deutschland).

Sämtliche in dieser Arbeit gezeigten Bilder wurden an einem konfokalen Laserscan-Mikroskop des Typs *LSM 510 Meta* (Carl Zeiss MicroImaging GmbH; Jena, Deutschland) hergestellt unter Verwendung des folgenden Objektivs: plan-Neofluar 40x/1.3 Oil DIC (Carl Zeiss MicroImaging GmbH; Jena, Deutschland). Zur Anregung wurde die 488nm-Linie eines Argon-Lasers in Verbindung mit einem Bandpass-Filter von 500-530nm sowie ein 543nm-HeNe-Laser mit einem Kurzpassfilter von 685nm eingesetzt.

2.9 Extraktion von Myelinkomponenten mit *CHAPS*

Bei der Substanz *CHAPS* (3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat) handelt es sich um ein nicht-ionisches Detergens. Die Anwendung von *CHAPS* zur Extraktion von Glykosphingolipid- und Cholesterol-reichen Membrananteilen, wie sie in *rafts* und im Myelin zu finden sind, ist wiederholt beschrieben worden (Simons M et al. 2000; Krämer-Albers et al. 2006).

Bis zum 05.09.07 erfolgte die *CHAPS*-Extraktion nach folgendem Protokoll: $1\mu\text{l}$ Gehirnhomogenisat wurde mit $4\mu\text{l}$ *PBS* und $5\mu\text{l}$ 40mM *CHAPS* in TE (*Tris-EDTA*) gemischt, wodurch eine finale *CHAPS*-Konzentration von 20mM erzielt wurde. Alternativ wurden Proben mit $5\mu\text{l}$ Gehirnhomogenisat in $5\mu\text{l}$ *PBS* und $10\mu\text{l}$ 40mM *CHAPS* in TE hergestellt.

Es folgten 30min Inkubation auf Eis und 30min Zentrifugation bei 13.000rpm und 4°C . Vom so erhaltenen Probenüberstand, welcher der *CHAPS*-löslichen Fraktion entspricht, wurden $9\mu\text{l}$ in ein *Eppendorf-Cup* gefüllt und mit $2\mu\text{l}$ eines 2-fachen Probenpuffers gemischt. Das Sediment, der *CHAPS*-unlöslichen Fraktion entsprechend, wurde in $9\mu\text{l}$ *PBS* resuspendiert und ebenfalls mit $2\mu\text{l}$ eines 2-fachen Probenpuffers gemischt. Anschließend wurde eine Western-Blot-Analyse der Fraktionen wie unter 2.10.2 beschrieben durchgeführt.

Ab dem 05.09.07 erfolgte die *CHAPS*-Extraktion nach folgendem modifizierten Protokoll: Vor Verwendung wurde das Gehirnhomogenisat mittels *Vortex-Genie 2* gemixt, um den Verlust schwerer Komponenten als Bodensediment zu verhindern.

Dann wurden $5\mu\text{l}$ Homogenisat mit $45\mu\text{l}$ TE und $50\mu\text{l}$ 2-fach *CHAPS* (40mM) gemischt, wodurch eine finale *CHAPS*-Konzentration von 20mM erzielt wurde. Das die Probe enthaltende *Eppendorf-Cup* wurde in einem Probenröhrchen unter Rollen für 30min bei 4°C bzw. bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend erfolgte die Zentrifugation bei 13.000rpm für 30min bei 4°C . Vom so erhaltenen Überstand, welcher der *CHAPS*-löslichen Fraktion entspricht, wurden $18\mu\text{l}$ mit $6\mu\text{l}$ 4-fachen Probenpuffers gemischt. Das Sediment, der *CHAPS*-unlöslichen Fraktion entsprechend, wurde in $75\mu\text{l}$ 20 μM -*CHAPS* und $25\mu\text{l}$ 4-fachen Probenpuffers resuspendiert.

Sämtliche Proben wurden dann für 10min bei 55°C erwärmt und anschließend $20\mu\text{l}$ jeder einzelnen Probe zur Western-Blot-Analyse wie unter 2.10.2 beschrieben aufgetragen.

2.10 SDS-PAGE-Gelelektrophorese und Western-Blot-Analyse

2.10.1 SDS-PAGE-Gelelektrophorese

Ziel der SDS-PAGE-Gelelektrophorese ist es, Proteingemische nach ihrem Molekulargewicht aufzutrennen. Es ist dabei möglich, Gele mit variierendem *Acrylamid*-Gehalt zu gießen, die sich durch unterschiedliche Porengröße in ihren Auftrennungseigenschaften unterscheiden. Verwendet wurden für diese Arbeit 12%-ige Gele.

2.10.2 Western-Blot-Analyse

Nach Durchführung der SDS-PAGE-Gelelektrophorese sind die Proteine nach Molekulargewicht getrennt im Gel enthalten. Für die Western-Blot-Analyse wurden sie anschließend mittels *Semi-Dry*-Methode auf Nitrocellulose-Membranen geblottet.

Nach Abschluss des Blotting-Prozesses wurden die Membranen zwecks Darstellung der nach Molekulargewicht getrennten Proteinbanden mit der Substanz *Ponceau S* gefärbt, die mitgelaufenen Protein-Markergewichte (*Unstained Protein Molecular Weight Marker*) wurden eingezeichnet.

Anschließend erfolgte die Inkubation der Membranen in einer Milchpulver-Lösung (2g *Slim-Fast*-Pulver wurden in 50ml *PBS-Tween* gelöst) für 30min bis 60min unter Rollen bei Raumtemperatur. Dieser Schritt diente der Sättigung unspezifischer Proteinbindestellen. Die Blots wurden anschließend über Nacht unter Rollen bei 4°C mit dem Erstantikörper in *PBS-Tween* inkubiert, dann mit *PBS-Tween* gewaschen und schließlich analog mit dem Zweitantikörper inkubiert. Dieser war an *Meerrettich-Peroxidase (HRP)* gekoppelt und wurde mittels *Immun-Star HRP Chemiluminescent Substrate Kit* gemäß den Vorschriften des Herstellers entwickelt. Die Chemilumineszenz schwärzte schließlich einen Röntgenfilm (*CL-XPosure Film*), von dem das Molekulargewicht des Antikörper-markierten Proteins nach Übertragen der Markergewichte abzulesen war.

2.10.3 Western-Blot-Analyse von Hirnhomogenisat

1 μ l Hirnhomogenisat wurde mit 10 μ l 2-fachen Lämmli-puffers (enthält *2-Mercapto-Ethanol*) und 9 μ l *PBS* gemischt. Alternativ werden 5 μ l Homogenisat mit 10 μ l 2-fachen Lämmli-puffers (enthält *2-Mercapto-Ethanol*) und 5 μ l *PBS* gemischt. Die so vorbereiteten Proben wurden für 10min bei 55 °C erwärmt und anschließend zur Western-Blot-Analyse aufgetragen.

2.10.4 Western-Blot-Analyse von *CHAPS*-Extrakten

siehe 2.9 und 2.10.3

Kapitel 3

Ergebnisse

3.1 Grundlegende Beobachtungen und Arbeitshypothese

Ziel dieser Arbeit war die nähere Charakterisierung der Mausmutante Shiverer. Insbesondere sollte festgestellt werden, ob die zelluläre Lokalisation und der Membrantransport von Myelinproteinen durch das Fehlen von MBP im ZNS der Mutante beeinträchtigt werden. Anhand von Immunofluoreszenzfärbungen an Gefrierschnitten von Shiverer-Gehirn konnte im Vergleich zum gleichaltrigen Wildtyp eine vesikuläre perinukleäre Akkumulation der Myelinproteine PLP, MOG und MAG nachgewiesen werden. Die Akkumulate konnten für PLP dem Kompartiment der Späten Endosomen / Lysosomen (LEs / Lys) zugeordnet werden. Es entstand die Arbeitshypothese, dass dem Protein MBP, welches Shiverern fehlt, eine regulatorische Funktion endozytotischer Prozesse zukommt.

Auszuschließen galt, dass die Beobachtung unspezifische Folge der schwerwiegenden Dysmyelinisierung der Shiverer-Mutante ist, was anhand vergleichender Färbungen von Gehirnschnitten der Squalen-Synthase-Knockout-Maus gelang.

3.2 Vergleichende Immunofluoreszenzfärbung von Kryoschnitten der Shiverer-Mauslinie und Wildtyp-Mäusen

Nachdem die vesikuläre perinukleäre Akkumulation des Proteolipid Proteins in Kryoschnitten der Shiverer-Mauslinie aufgefallen war, erfolgten systematische Immunofluoreszenzfärbungen für die wichtigsten Myelinproteine an $30\mu\text{m}$ dicken Gefrierschnitten. Dabei wurden

die Gehirne von zwei 21 Tage alten Shiverer-Mäusen eines Wurfes verwendet und mit den Gehirnen von zwei 21 Tage alten Wildtyp-Mäusen der NMRI-Linie verglichen.

Für das Protein PLP wurden Kofärbungen der Antikörper 431A und Lamp-1 (Clon H5G11) bzw. 3F4 und Lamp-1 an Schnitten aller vier Tiere durchgeführt. Lamp-1 ist ein Marker für Späte Endosomen / Lysosomen.

Die initiale Beobachtung einer vesikulären Akkumulation von PLP bestätigte sich für Schnitte beider Shiverer und es zeigte sich eine starke Kolokalisation mit Lamp-1 (vgl. Abb. 3.2). Dies legt nahe, dass sich die Protein-Akkumulate spezifisch im Zellorganell der Späten Endosomen / Lysosomen befinden.

Für die beiden gleichaltrigen Wildtyp-Tiere konnte eine Akkumulation von PLP im Zellkörper nur vereinzelt festgestellt werden, ebenfalls größtenteils mit Lamp-1 kolokalisierend. Beide PLP-Antikörper färbten kräftig die myelinisierenden Zellfortsätze sowie die zum Zeitpunkt P21 stark entwickelten Fasertrakte.

Anschließend wurde durch Immunofluoreszenzfärbungen für die Myelinproteine MAG (Clon 513), MOG (Clon 8-18-C5) und CNP (Clon 11-5B) überprüft, ob ähnliche Unterschiede zwischen Shiverern und Wildtyp-Mäusen feststellbar sind. Es zeigten sich für MAG und MOG in Shiverer-Schnitten deutliche vesikuläre Akkumulate im Zellkörper, welche bei den entsprechenden Wildtyp-Mäusen wiederum nur vereinzelt vorkamen (vgl. Abb. 3.1). Die Kombination mit Lamp-1 war für keinen der verwendeten Antikörper möglich, so dass über die genaue Lokalisation der akkumulierten Proteine nur gemutmaßt werden kann. Das vesikuläre Muster und die Lokalisation im Zellkörper entsprachen jedoch der Verteilung des in Späten Endosomen / Lysosomen befindlichen PLPs.

Für CNP war interessanter Weise die Zahl der Akkumulate tragenden Zellen in Wildtyp-Schnitten moderat aber signifikant höher als in Shiverer-Schnitten (p -Wert = 0,0044, vgl. Abb. 3.1).

Im folgenden Schritt erfolgte die Quantifizierung sämtlicher Immunofluoreszenzfärbungen. Dazu wurde die Anzahl der Zellkörper mit vesikulärer Färbung für das jeweilige Protein bei 40-facher Vergrößerung an einem Fluoreszenzmikroskop des Typs *Zeiss Axiophot* (Carl Zeiss MicroImaging GmbH; Jena, Deutschland) Gesichtsfeld für Gesichtsfeld ausgezählt und anschließend die mittlere Anzahl gefärbter Zellkörper pro Gesichtsfeld ermittelt. Dabei erfolgte die Auszählung schwerpunktmäßig in der periventrikulären und in der subkortikalen weißen Substanz sowie im Corpus callosum.

Wie initial vermutet, ergab sich für PLP die stärkste Abweichung zwischen Shiverern und Wildtyp-Mäusen: In Shiverer-Schnitten war

die Zahl der Zellkörper mit vesikulären Protein-Akkumulaten durchschnittlich 25,3-fach erhöht. Für Färbungen mit MOG ergab sich ein Faktor von 10,6 und für MAG ein Faktor von 2,8. Für das Protein CNP konnte keine erhöhte Akkumulation im Zellkörper bei Shiverer-Schnitten festgestellt werden. Tatsächlich ergab sich ein leichter Überhang vesikulär gefärbter Somata in Wildtyp-Mäusen mit durchschnittlich der 1,4-fachen Anzahl von vesikulär gefärbten Zellkörpern (vgl. Abb. 3.3).

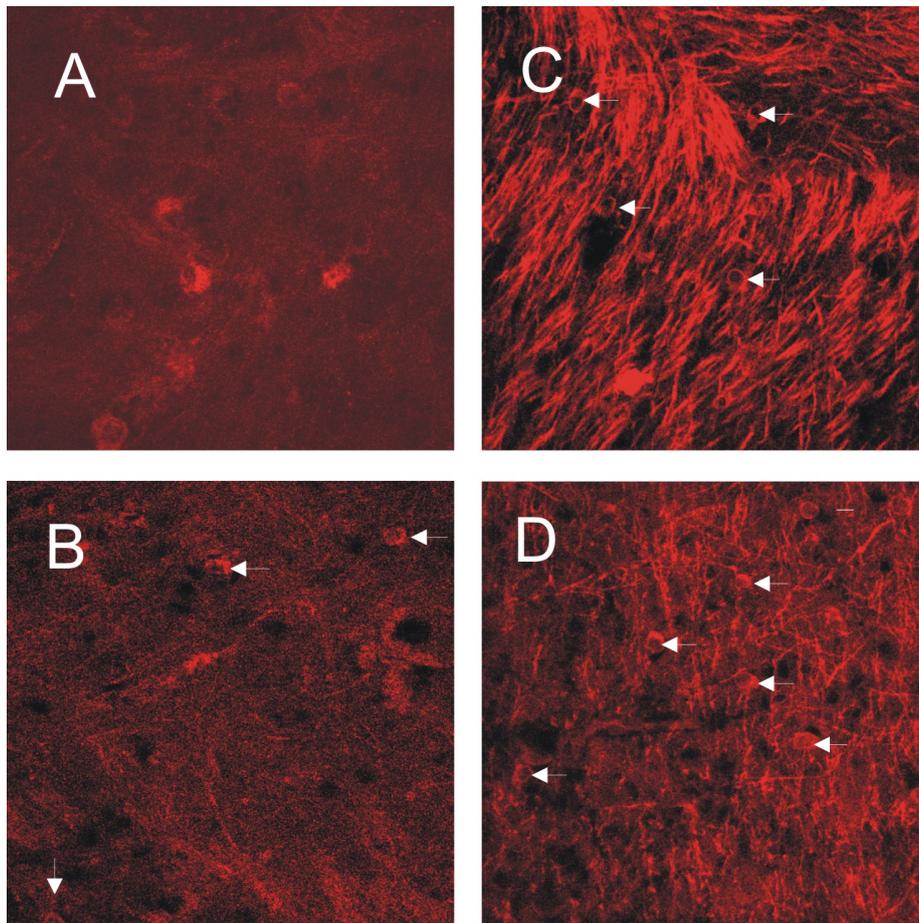


Abbildung 3.1: Konfokale Immunofluoreszenz-Mikroskopie von Kryoschnitten für MAG (A = Shiverer, B = Wildtyp) und CNP (C = Shiverer, D = Wildtyp). Während Shiverer deutlich mehr MAG-positive Zellkörper zeigen als der entsprechende Wildtyp, lässt sich für CNP kein entsprechender Unterschied feststellen.

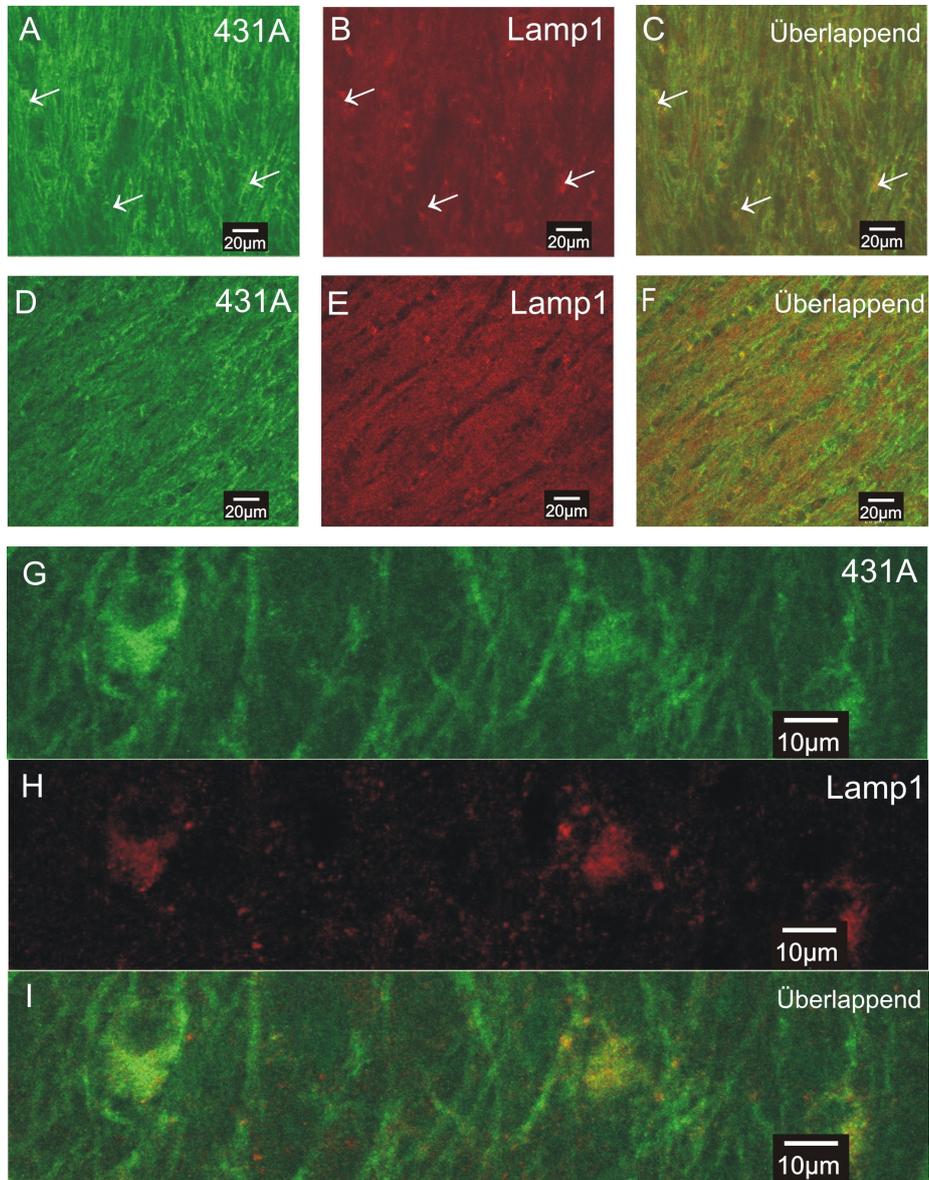


Abbildung 3.2: Konfokale Immunofluoreszenz-Mikroskopie von Kryoschnitten für PLP (431A) und Lamp-1 an Shiverern (A-C,) und Wildtypen (D-F) sowie Detail-Aufnahme des Shiverer-Schnittes (G-I). Shiverer zeigen mehr vesikulär perinukleär gefärbte Zellen als Wildtypen. Vesikuläres 431A und Lamp-1 kolokalisieren (C, F, I), was auf die Lokalisation der Akkumulate in Späten Endosomen / Lysosomen schließen lässt.

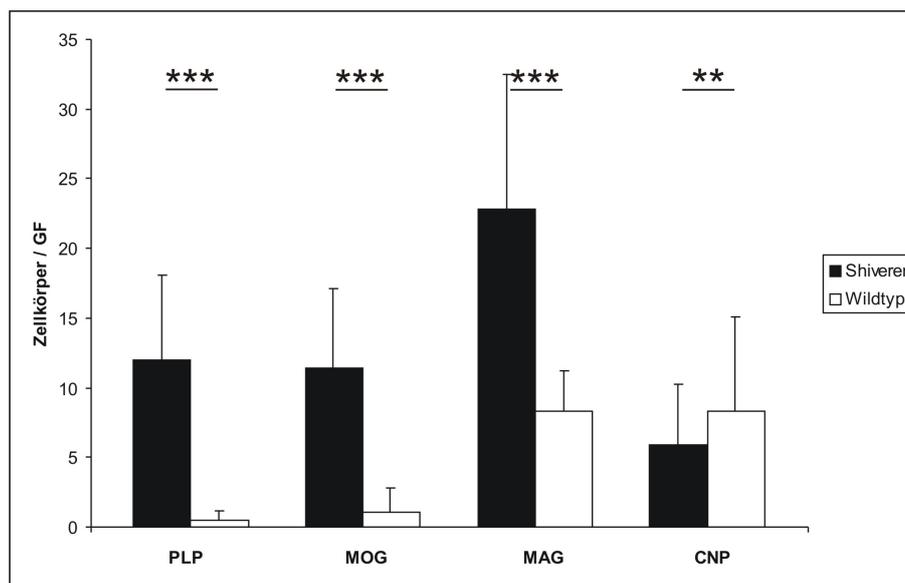


Abbildung 3.3: Zusammenschau der Mittelwerte vesikulär gefärbter Zellkörper pro Gesichtsfeld (GF, 40-fache Vergrößerung) für Färbungen der Myelinproteine PLP (Shiverer: $n = 160$, Wildtyp: $n = 150$, p-Wert = $2,835 \cdot 10^{-26}$), MOG (Shiverer: $n = 164$, Wildtyp: $n = 165$, p-Wert = $1,497 \cdot 10^{-28}$), MAG (Shiverer: $n = 40$, Wildtyp: $n = 40$, p-Wert = $1,985 \cdot 10^{-5}$) und CNP (Shiverer: $n = 130$, Wildtyp: $n = 58$, p-Wert = $0,0044$). Verglichen werden Shiverer (schwarz) und Wildtyp-Mäuse (weiß). Höchste Anzahl vesikulärer Akkumulate weisen Shiverer-Schnitte bei Färbungen mit MAG auf, wobei der größte Unterschied zwischen Shiverer-Maus und Wildtyp für PLP zu verzeichnen ist.

3.3 Immunofluoreszenzfärbungen für PLP und MAG an Wildtyp-Gehirnschnitten der Altersstufen P7, P14 und P21

Im nächsten Schritt stellte sich die Frage nach einer möglichen Altersabhängigkeit der beobachteten vesikulären Protein-Akkumulate. Es ist durchaus denkbar, dass Shiverer-Oligodendrozyten in ihrer zeitlichen Entwicklung von Wildtyp-Oligodendrozyten abweichen. Aus diesem Grund wurden Immunofluoreszenzfärbungen für PLP und MAG an Wildtyp-Gehirnschnitten der Altersstufen P7, P14 und P21 durchgeführt und die Ergebnisse zu jenen der P21-Shiverer-Schnitte in Beziehung gesetzt. Die Quantifizierung erfolgte wie oben beschrieben durch Auszählung bei 40-facher Vergrößerung an einem Fluoreszenzmikroskop des Typs *Zeiss Axiophot* (Carl Zeiss MicroImaging GmbH; Jena, Deutschland).

Für die sieben Tage alten Tiere (P7) ergaben sich bei Färbung mit MAG bzw. PLP sehr ähnliche Mittelwerte für Zellen mit vesikulären Akkulaten pro Gesichtsfeld (11,2 für PLP; 12,6 für MAG). Interessanter Weise fanden sich bei 14 Tage alten Tieren (P14) jedoch deutliche Unterschiede. Für PLP ließ sich eine 3,7-fache Steigerung des Ausgangswertes von P7 zu P14 verzeichnen, für MAG hingegen nur eine 1,4-fache Steigerung. In dieser frühen Phase der Myelinisierung zeigten folglich mehr Zellen vesikuläre PLP-Akkumulate als dies für MAG der Fall war.

Der Vergleich mit entsprechenden Daten von 21 Tage alten Wildtyp-Gehirnen zeigte nun, dass von P14 zu P21 wieder eine Verringerung der Anzahl Akkulate tragender Zellen stattfand, und zwar für PLP ebenso wie für MAG. Das Ausmaß der Reduktion übertraf bei PLP jedoch sehr deutlich jenes von MAG: Während zum Zeitpunkt P21 für PLP die Anzahl entsprechender Zellen nur noch 1,2% des Wertes von P14 betragen, ließen sich für MAG noch 48,3% des Wertes von P14 verzeichnen (vgl. Abb. 3.7). Dies hatte zur Folge, dass auch in Absolutwerten die Zahl der vesikulär gefärbten Zellen pro Gesichtsfeld zum Zeitpunkt P21 für MAG deutlich über jener von PLP lag (MAG: 8,28 Zellen / GF, PLP: 0,47 Zellen / GF).

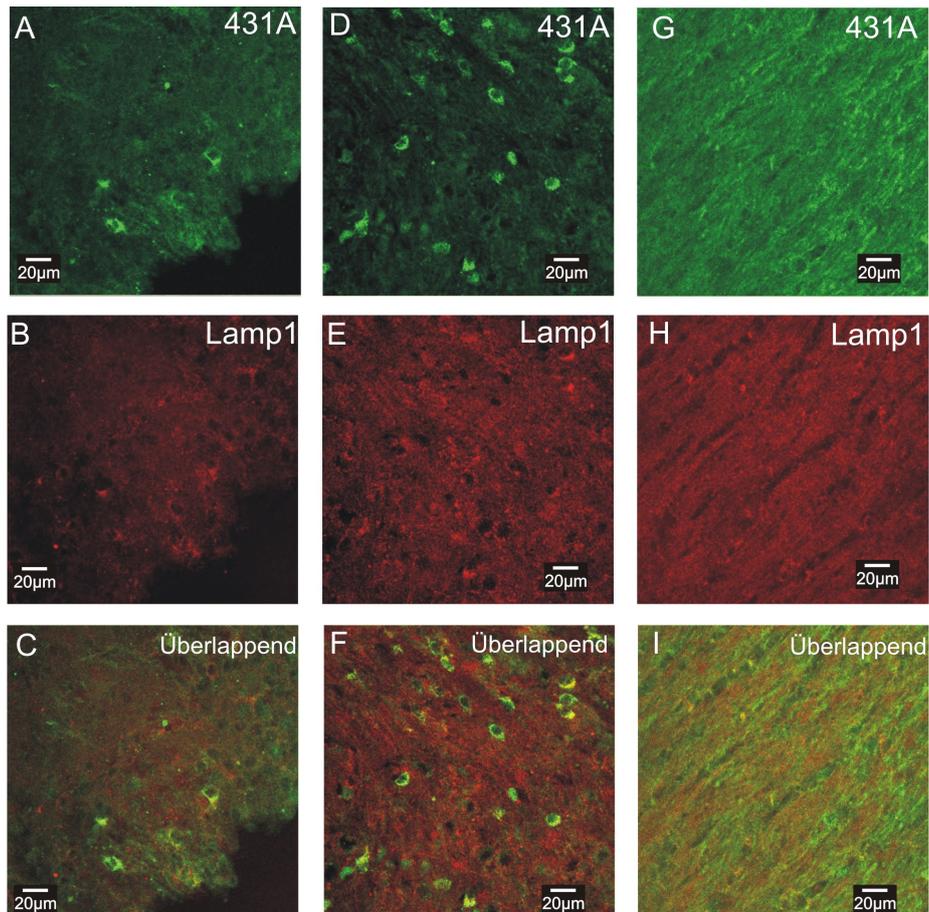


Abbildung 3.4: Konfokale Immunofluoreszenz-Mikroskopie von PLP (431A) und Lamp-1 an Kryoschnitten von Wildtyp-Mäusen der Altersstufen P7 (A-C), P14 (D-F) und P21 (G-I). Im Alter P14 sind die meisten Akkumulate tragenden Zellkörper zu beobachten, zum Zeitpunkt P21 nur noch vereinzelt. Vesikuläres 431A und Lamp-1 kolokalisieren (C, F, I), was auf die Lokalisation der Akkumulate in Späten Endosomen / Lysosomen schließen lässt.

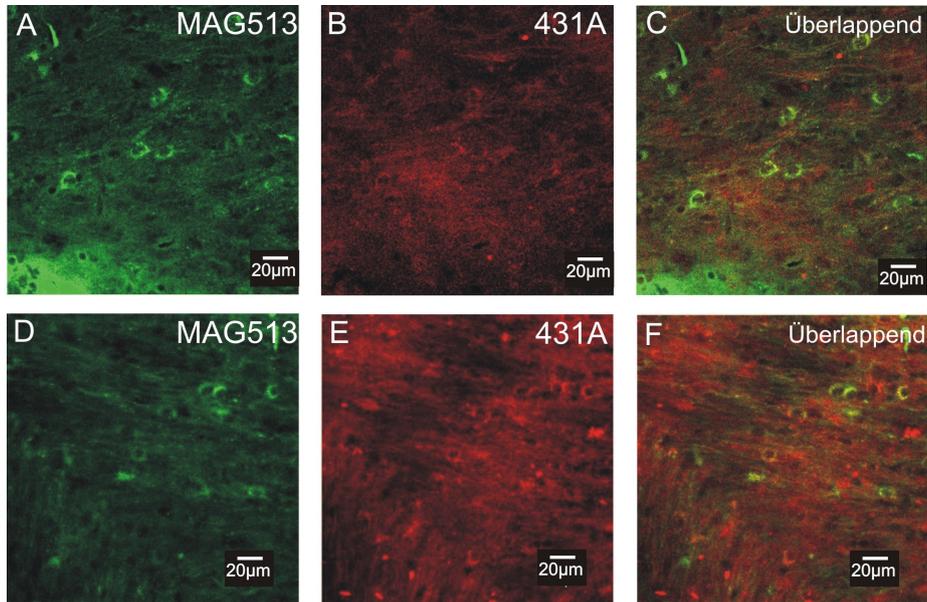


Abbildung 3.5: Konfokale Immunofluoreszenz-Mikroskopie von MAG und PLP (431A) an Kryoschnitten von Wildtyp-Mäusen der Altersstufen P7 (A-C) und P14 (D-F). Deutliche Kolokalisation der vesikulären Akkumulate (C, F) lässt schließen, dass sich auch MAG-positive Akkumulate in Späten Endosomen / Lysosomen befinden.

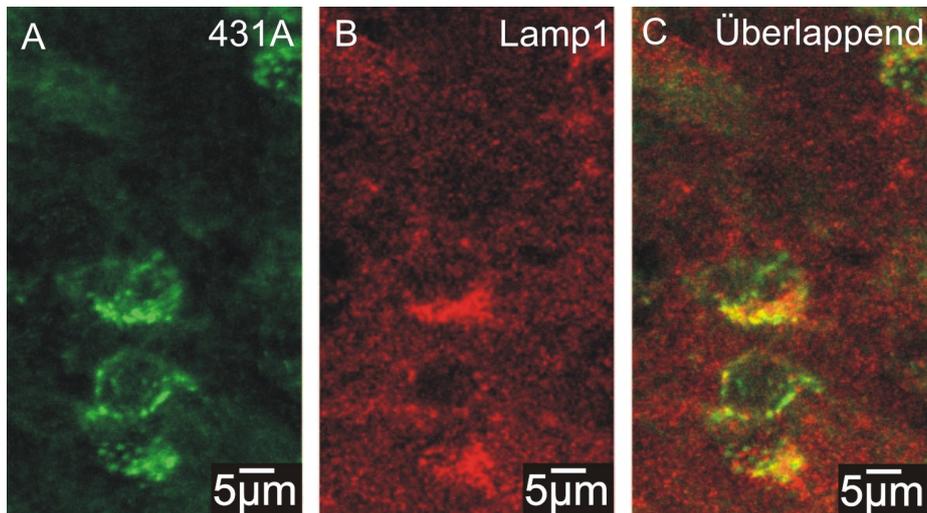


Abbildung 3.6: Detail-Aufnahme der PLP (431A)- und Lamp1-positiven Akkumulate in Zellen einer 14 Tage alten Wildtyp-Maus. Deutliche Kolokalisation der Marker.

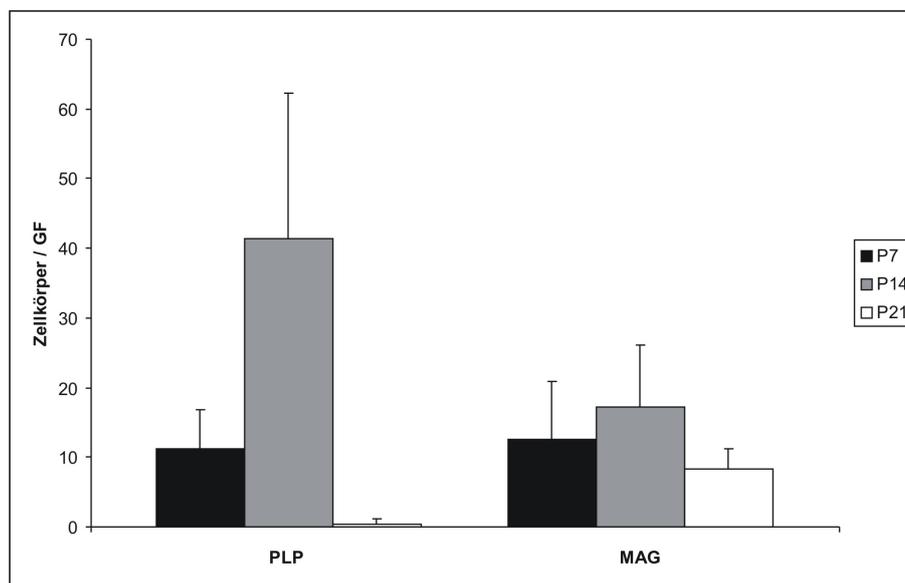


Abbildung 3.7: Zusammenschau der Mittelwerte vesikulär gefärbter Zellkörper pro Gesichtsfeld (GF, 40-fache Vergrößerung) für Färbungen der Myelinproteine PLP (431A) und MAG. Verglichen werden Wildtypen der Altersstufen P7, P14 und P21. Die Zahl der vesikuläre Akkumulate tragenden Zellen erreicht ihr jeweiliges Maximum bei P14 und fällt bis P21 wieder deutlich ab. (PLP, P7: n = 5, P14: n = 20, P21: n = 150; MAG, P7: n = 5, P14: n = 20, P21: n = 40).

3.4 Identifikation des Akkumulate-enthaltenden Zelltyps

Die Identifikation des vesikuläre Akkumulate tragenden Zelltyps wurde in zwei Schritten durchgeführt. Vorerst wurde durch Immunofluoreszenz-Färbung mit dem Antikörper Iba-1 ausgeschlossen, dass die beobachteten Protein-Akkumulate in Shiverer-Gehirnschnitten in Mikroglia-Zellen liegen. Der Antikörper Iba-1 (*ionized calcium-binding adaptor molecule 1*), auch als AIF1 (*allograft inflammatory factor 1*) bekannt, erkennt ein Calcium-Bindeprotein, welches von aktivierten Monozyten und Mikroglia-Zellen expremiert wird.

Verwendet wurden Kryoschnitte der Gehirne von drei Wochen alten Tieren.

Auszählen der Gesamtzahl der Iba-1 positiven Zellen pro Gesichtsfeld bei 40-facher Vergrößerung zeigte eine moderate aber auf dem 5%-Niveau signifikante Erhöhung der Mikroglia-Zahl in Shiverern im Vergleich zum Wildtyp: 74,8 Zellen pro Gesichtsfeld bei Shiverern gegen 49,9 Zellen pro Gesichtsfeld beim Wildtyp, was einer Erhöhung um den Faktor 1,5 entspricht (p-Wert = 0,009, vgl. Abb. 3.9).

Kofärbung von 3F4 und Iba-1 ergab Kolokalisation von 4% in Gehirnschnitten der Shiverer-Mäuse und 20% in Gehirnschnitten der Wildtypen (vgl. Abb. 3.8, 3.10 A,B), d.h. ein Unterschied um den Faktor 5. Kofärbung von MOG und Iba-1 ergab Kolokalisation von 2,8% in Shiverern und 11,1% in Wildtypen, d.h. auch hier lag ein um den Faktor 5 höherer Wert in Wildtyp-Gehirnen vor (vgl. Abb. 3.10 C,D).

Die vesikulären Protein-Akkumulationen waren also insbesondere bei Shiverern nicht durch Phagozytose und vesikuläre Degradation durch Mikroglia-Zellen erklärbar.

Diese Beobachtung wurde im Folgeschritt erhärtet durch die immunhistochemische Identifikation der oligodendroglialen Zelllinie. Hierfür wurde der Antikörper Olig-2 (*oligodendrocyte transcription factor 2*) in Kofärbungen mit MAG eingesetzt. Olig-2 erkennt spezifisch Zellen der oligodendroglialen Reihe.

Auszählen bei 40-facher Vergrößerung an einem Fluoreszenzmikroskop des Typs *Zeiss Axiophot* (Carl Zeiss MicroImaging GmbH; Jena, Deutschland) zeigte, dass die überwiegende Mehrzahl der Zellen, welche MAG-positive Vesikel zeigten, auch für Olig-2 positiv waren und damit zur oligodendroglialen Zellreihe gehörten. Dies galt für

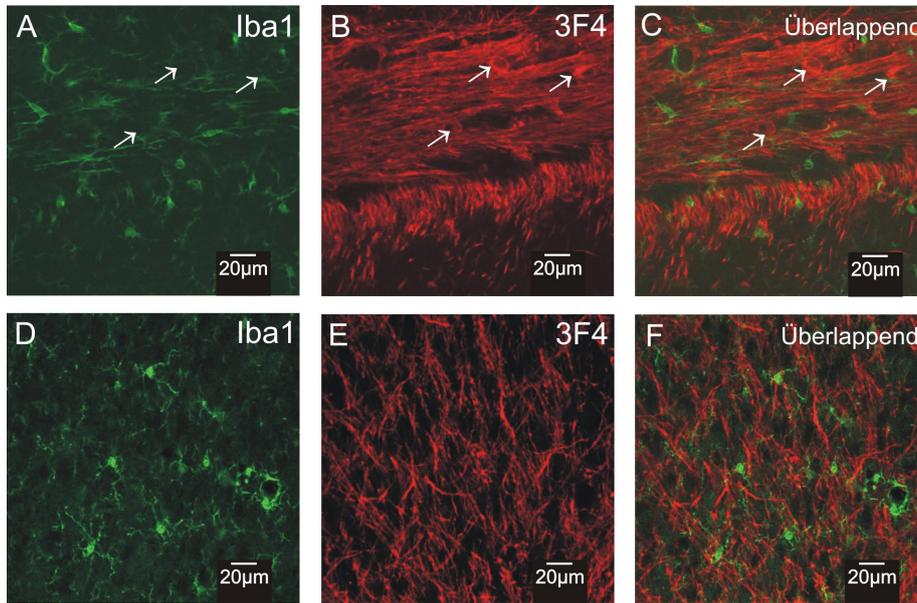


Abbildung 3.8: Konfokale Immunofluoreszenz-Mikroskopie von Iba1 und PLP (3F4) an Kryoschnitten von Shiverern (A-C) und Wildtyp-Mäusen (D-F). Fehlende Kolokalisation lässt schließen, dass die vesikulären Akkumulate nicht in Mikroglia-Zellen liegen.

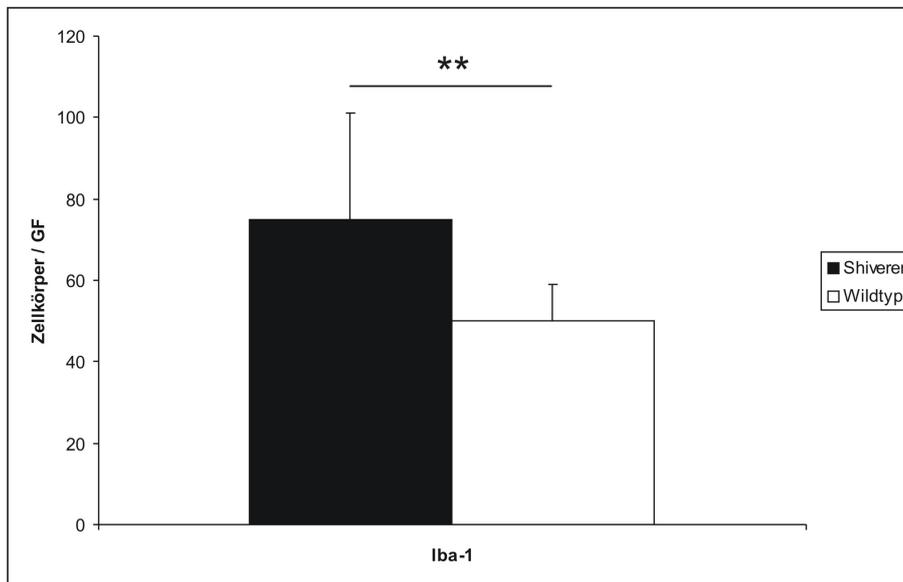


Abbildung 3.9: Gesamtzahl der Iba1-positiven Zellen in Shiverer- (schwarz) bzw. Wildtyp-Schnitten (weiß). Unterschied auf dem 5%-Niveau hoch signifikant (p-Wert = 0,009). (Shiverer: n = 30, Wildtyp: n = 20)

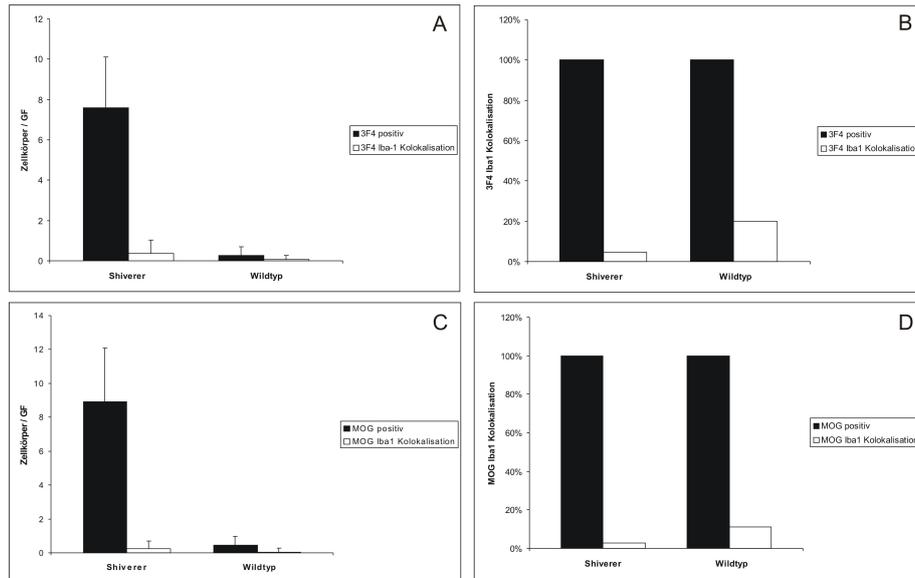


Abbildung 3.10: **A** Graphische Darstellung der Mittelwerte PLP-positiver (3F4, schwarz) vesikulär gefärbter Zellkörper pro Gesichtsfeld (GF) und der zugleich Iba-1 positiven Zellen (weiß) für Shiverer und Wildtypen. (Shiverer: n = 40, Wildtyp: n = 30);

B Darstellung des prozentualen Anteils der PLP und Iba-1 kofärbenden Zellen (weiß) an allen PLP-positiven Zellen (schwarz). Die Mittelwerte PLP-positiver vesikulär gefärbter Zellkörper pro Gesichtsfeld (GF) wurden für Shiverer und Wildtypen jeweils als 100% betrachtet.

C Graphische Darstellung der Mittelwerte MOG-positiver (schwarz) vesikulär gefärbter Zellkörper pro Gesichtsfeld (GF) und der zugleich Iba-1 positiven Zellen (weiß) für Shiverer und Wildtypen. (Shiverer: n = 39, Wildtyp: n = 40)

D Darstellung des prozentualen Anteils der MOG und Iba-1 kofärbenden Zellen (weiß) an allen MOG-positiven Zellen (schwarz). Die Mittelwerte MOG-positiver vesikulär gefärbter Zellkörper pro Gesichtsfeld (GF) wurden für Shiverer und Wildtypen jeweils als 100% betrachtet.

21 Tage alte Wildtyp-Mäuse (98,48% Kolokalisation) ebenso wie für gleichaltrige Shiverer (97,77% Kolokalisation) (vgl. Abb. 3.11 und 3.12).

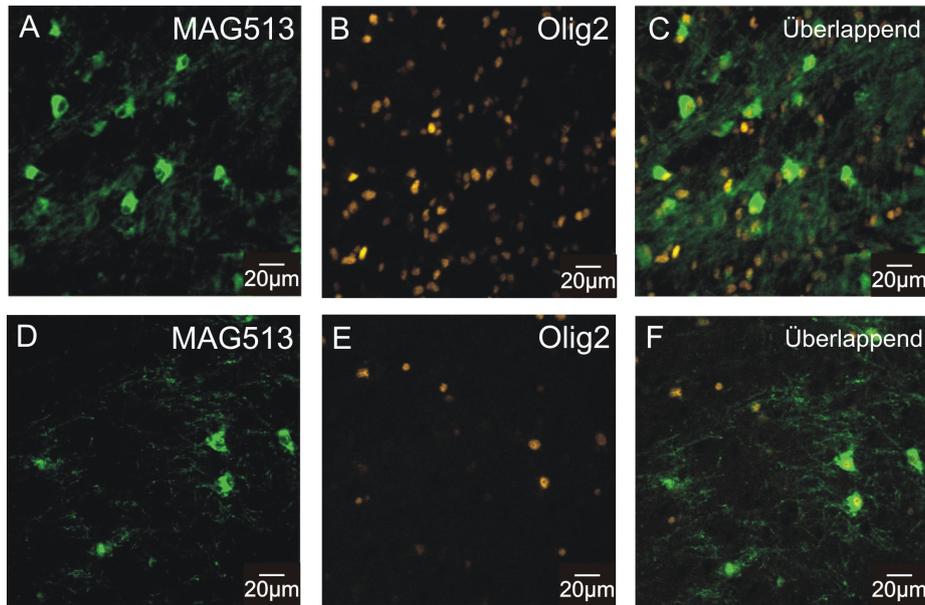


Abbildung 3.11: Konfokale Immunofluoreszenz-Mikroskopie von MAG und Olig-2 an Kryoschnitten der Shiverer- (A-C) und Wildtyp-Maus (D-F). Deutliche Kolokalisation der Marker (C, F).

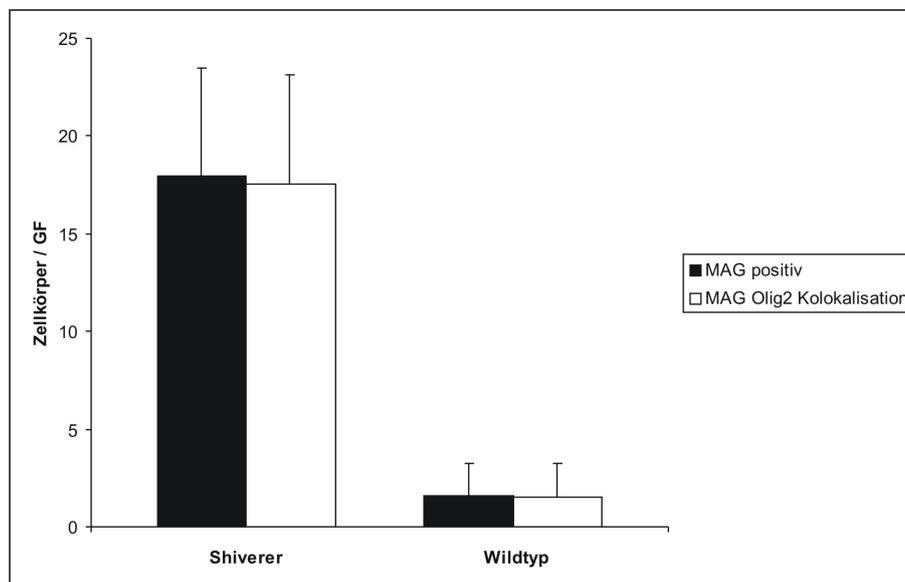


Abbildung 3.12: Graphische Darstellung der Mittelwerte MAG-positiver (schwarz) vesikulär gefärbter Zellkörper pro Gesichtsfeld (GF) und der zugleich Olig-2 positiven Zellen (weiß) für Shiverer und Wildtypen. Deutliche Kolokalisation. (Shiverer: n = 40 , Wildtyp: n = 42).

3.5 Beobachtung an Squalen-Synthase-Knockout-Mäusen

Um der Frage nachzugehen, ob die vesikulären Protein-Akkumulate in Shiverern eine allgemeine Folge des Myelinisierungsdefektes sind, im Sinne einer Komponenten-Anhäufung durch fehlendes Auswachsen von Myelinmembranen, wurden Immunofluoreszenzfärbungen an Gefrierschnitten der Squalen-Synthase-Knockout-Maus durchgeführt. Analog zur Färbung von Shiverer-Schnitten erfolgte Kofärbung für PLP (431A) und Lamp-1. Dabei wurden Gehirne von Mutanten der Altersstufen P9 und P20 mit Gehirnen von Kontrolltieren des Alters P9 bzw. P17 verglichen. Es wurde wie oben beschrieben an einem Fluoreszenzmikroskop vom Typ *Zeiss Axiophot* (Carl Zeiss MicroImaging GmbH; Jena, Deutschland) die mittlere Anzahl der vesikulär gefärbten Zellkörper pro Gesichtsfeld ermittelt (40-fache Vergrößerung). Wie in Abb. 3.14 dargestellt, war für P9 ein signifikanter Unterschied zwischen Knockout-Mäusen und Kontrolltieren erkennbar, nicht jedoch für P20. Wie in der Diskussion näher erläutert, erscheint vor diesem Hintergrund für Shiverer ein unspezifischer Effekt durch Myelinisierungsstörung unwahrscheinlich. Ein unbekannter spezifischer Prozess, der zur vesikulären Protein-

Anhäufung führt, ist anzunehmen.

3.6 *CHAPS*-Extraktion von Gehirnhomogenisat und Western-Blot-Analyse

Bei der Substanz *CHAPS* handelt es sich um ein nicht-ionisches Detergens. Die Anwendung von *CHAPS* zur Extraktion von Glykosphingolipid- und Cholesterol-reichen Membrananteilen, wie sie in *rafts* und im Myelin zu finden sind, ist wiederholt beschrieben worden (Simons M et al. 2000; Krämer-Albers et al. 2006). So konnte für Shiverer-Gehirnhomogenisat von Fitzner et al. gezeigt werden, dass im Vergleich mit Wildtyp-Gehirnhomogenisat bei Shiverern mehr PLP in den löslichen Fraktionen zu finden ist, als dies für den Wildtyp der Fall ist (Fitzner et al. 2006).

Die Homogenisierung der Gehirne und die *CHAPS*-Extraktion von Shiverer- bzw. Wildtyp-Gehirn erfolgten nach dem in Material und Methoden beschriebenen Protokoll. Verwendet wurden die Gehirne von drei 21 Tage alten Shiverer-Mäusen eines Wurfes und die Gehirne von drei 21 Tage alten Wildtyp-Mäusen eines Wurfes der NMRI-Linie.

Ziel der *CHAPS*-Extraktion war, die von Fitzner et al. beschriebene Beobachtung zu reproduzieren und entsprechende Experimente für die Myelinproteine MAG, MOG und CNP anzuschließen.

Die *CHAPS*-Extraktionen wurden zum Ausschluss einer starken Temperatur-Abhängigkeit der Ergebnisse jeweils bei 4 °C und bei Raumtemperatur (RT) durchgeführt (Ausnahme CNP: ausschließlich bei RT für jeweils zwei Tiere). Die Quantifizierung der Western Blot-Signale erfolgte mit Hilfe des Programms Image J. Es wurde für jedes Tier unter jeder Bedingung der Quotient aus der Signalstärke der löslichen Fraktion und jener der unlöslichen Fraktion gebildet. Zur Ermittlung der Mittelwerte wurden für jede Bedingung getrennt Shiverer- bzw. Wildtyp-Werte eines Experimentes zusammengefasst. Für PLP konnte das Ergebnis von Fitzner et al. (2006) bestätigt werden. Für alle untersuchten Shiverer-Gehirnhomogenisate war im Vergleich zum Wildtyp ein größerer Anteil PLP in den löslichen Membranfraktionen detektierbar. Analoge Ergebnisse wurden für die Myelinproteine MAG und MOG erzielt.

Das Protein CNP nahm auch bei der *CHAPS*-Extraktion eine Sonderrolle ein: Ein Unterschied in der Fraktionsverteilung zwischen Shiverern und Wildtypen war nicht feststellbar.

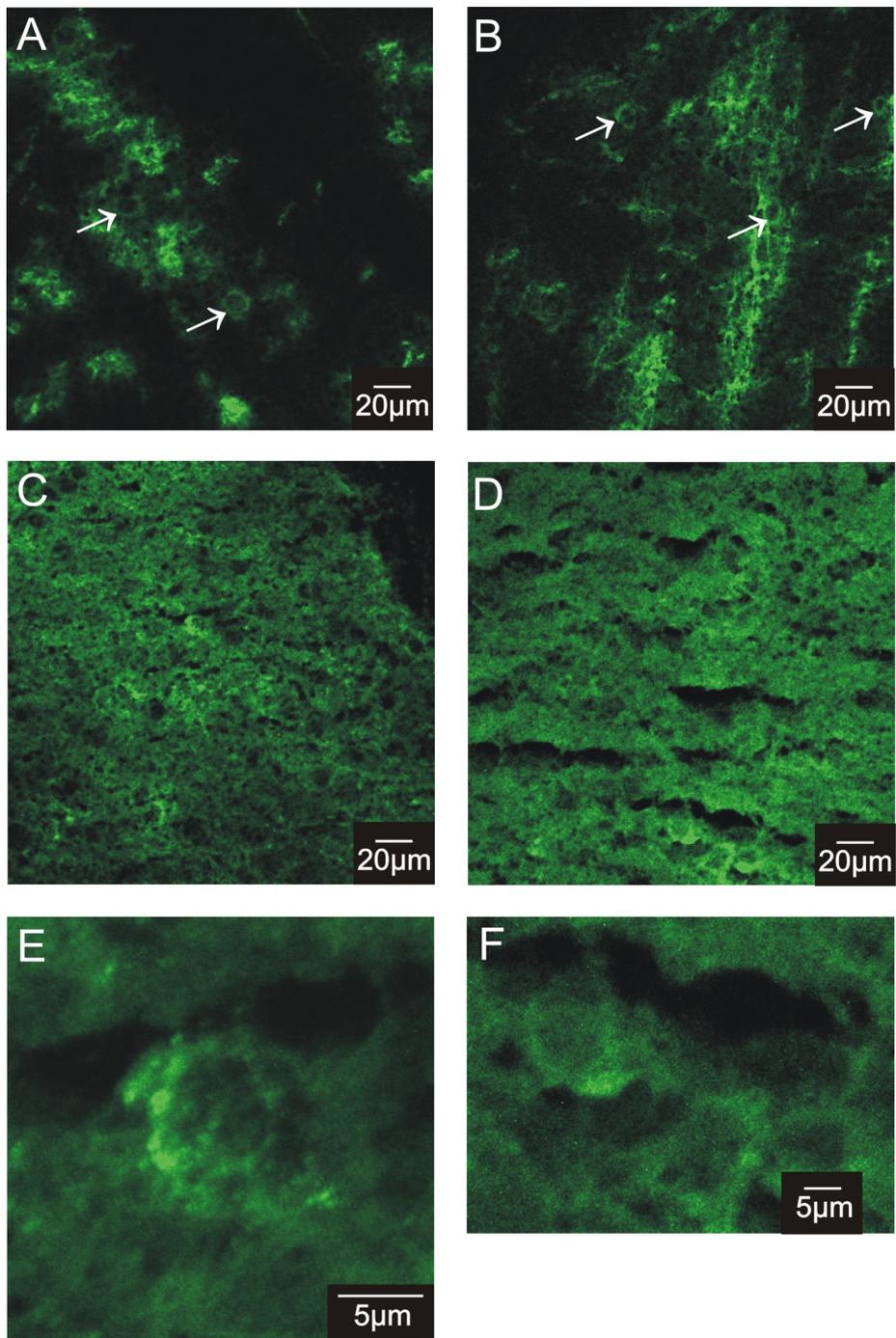


Abbildung 3.13: Konfokale Immunofluoreszenz-Mikroskopie von PLP (431A) an Kryoschnitten der Squalen-Synthase-Knockout-Maus (B,D) und alterskorrelierten Kontrolltieren (A,C). Altersstufen P9 (A,B) und P20 bzw. P17 (C,D). Vergrößerte vesikulär gefärbte Zellen des Kontrolltieres P17 (E) sowie der Mutante P20 (F).

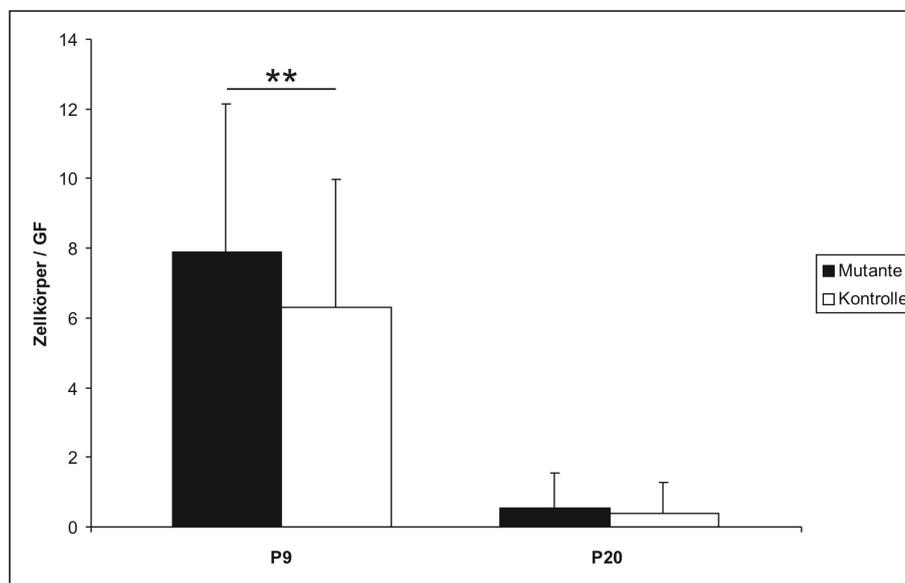


Abbildung 3.14: Graphische Darstellung der Mittelwerte PLP-positiver vesikulär gefärbter Zellkörper pro Gesichtsfeld (GF) für Squalen-Synthase-Knockout-Mäuse (schwarz) und Kontrolltiere (weiß). Der Unterschied zwischen Mutante und Kontrolle ist für P9 auf dem 5%-Niveau signifikant (p-Wert = 0,0062), nicht aber für P20 bzw. P17 (p-Wert = 0,13). (P9, Mutante: n = 110, Kontrolle: n = 52; P20 bzw. P17, Mutante: n = 119, Kontrolle: n = 94)

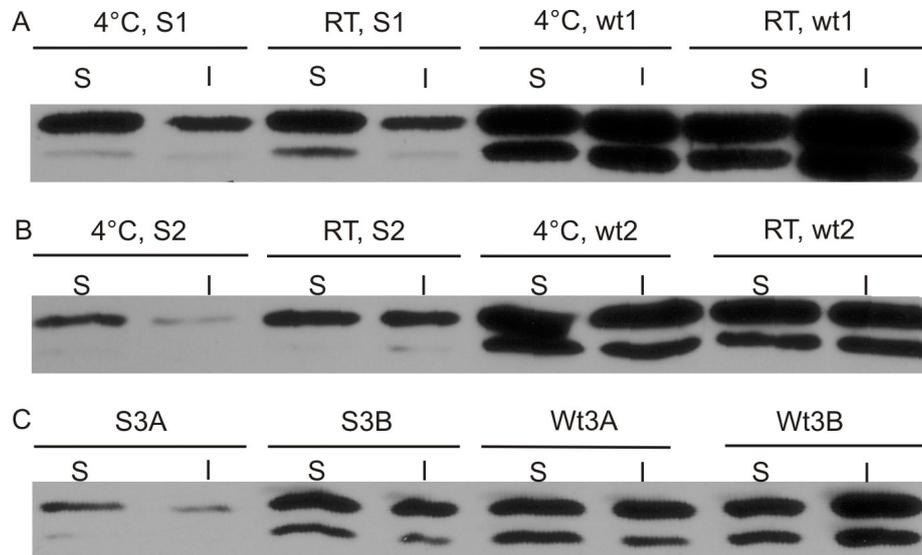


Abbildung 3.15: Western Blot mit Antikörper gegen PLP (3F4) nach *CHAPS*-Extraktion bei 4 °C und Raumtemperatur (RT). Verwendet wurde Gehirnlysat von Shiverer Tier 1 und Wildtyp 1 (S1, wt1, Abb. A), Shiverer Tier 2 und Wildtyp 2 (S2, wt2, Abb. B). Die *CHAPS*-lösliche Fraktion ist mit S (soluble), die *CHAPS*-unlösliche Fraktion mit I (insoluble) gekennzeichnet. Entsprechend für Shiverer 3 und Wildtyp 3 (S3, wt3, Abb. C) bei Raumtemperatur (RT). Es wurden zwei unterschiedliche Gehirnlysatmengen verwendet, 5 μ l (A) bzw. 10 μ l (B).

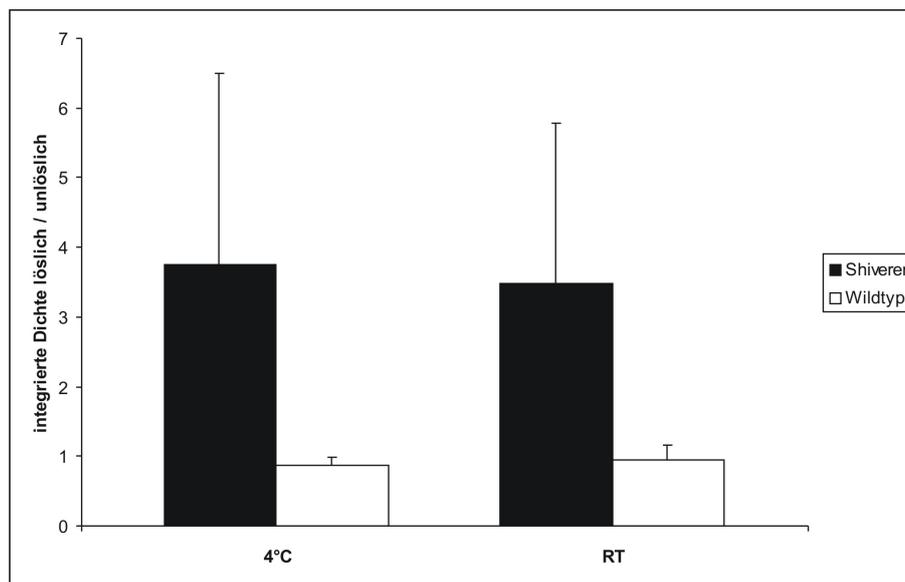


Abbildung 3.16: Graphische Darstellung der integrierten Dichte der Western-Blot-Banden aus Abb. 3.15. Aufgetragen ist der Mittelwert der Quotienten aus Banden-Dichte der löslichen Fraktion und Banden-Dichte der unlöslichen Fraktion für Shiverer (schwarz) bzw. Wildtyp-Tiere (weiß). Der höhere Wert bei Shiverern ergibt sich durch einen höheren PLP-Anteil in der *CHAPS*-löslichen Fraktion, sowohl bei 4 °C als auch bei Raumtemperatur. (4 °C: p-Wert = 0,063, RT: p-Wert = 0,058)

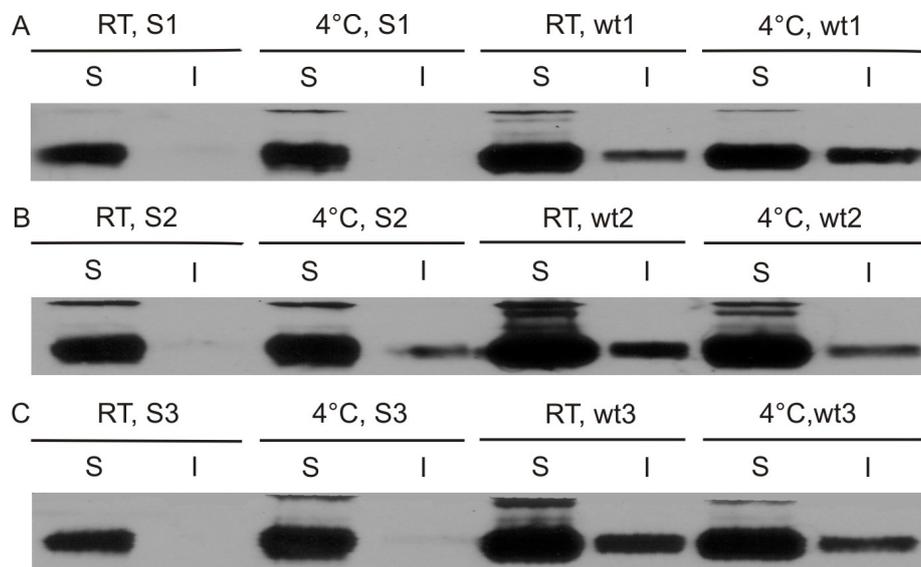


Abbildung 3.17: Western Blot mit Antikörper gegen MAG (Clon 513) nach *CHAPS*-Extraktion bei 4°C und Raumtemperatur (RT). Verwendet wurde Gehirnlysate von Shiverer Tier 1 und Wildtyp 1 (S1, wt1, Abb. A), Shiverer Tier 2 und Wildtyp 2 (S2, wt2, Abb. B) sowie von Shiverer Tier 3 und Wildtyp 3 (S3, wt3, Abb. C). Die *CHAPS*-lösliche Fraktion ist mit S (soluble), die *CHAPS*-unlösliche Fraktion mit I (insoluble) gekennzeichnet.

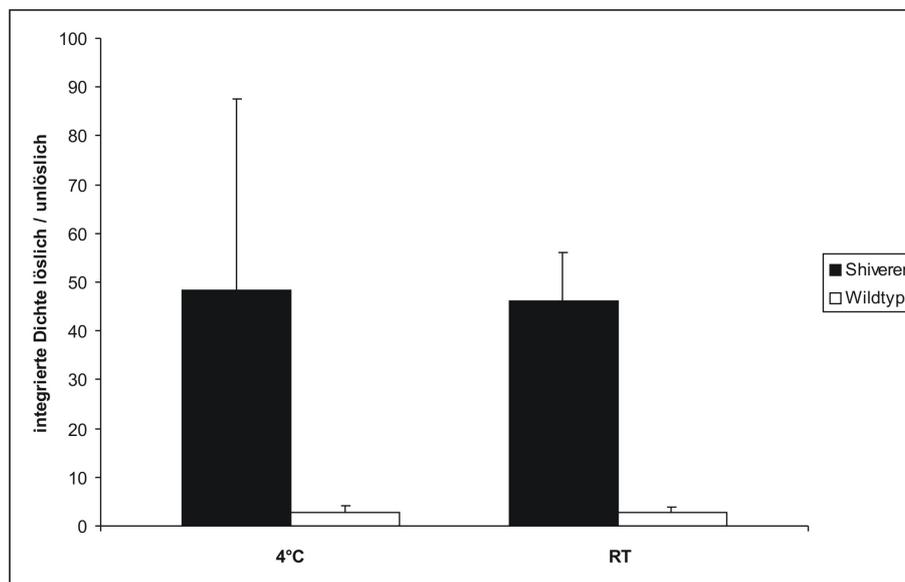


Abbildung 3.18: Graphische Darstellung der integrierten Dichte der Western-Blot-Banden aus Abb. 3.17. Aufgetragen ist der Mittelwert der Quotienten aus Banden-Dichte der löslichen Fraktion und Banden-Dichte der unlöslichen Fraktion für Shiverer (schwarz) bzw. Wildtyp-Tiere (weiß). Der höhere Wert bei Shiverern ergibt sich durch einen höheren MAG-Anteil in der *CHAPS*-löslichen Fraktion, sowohl bei 4 °C als auch bei Raumtemperatur. (4 °C: p-Wert = 0,09; RT: p-Wert = 0,05)

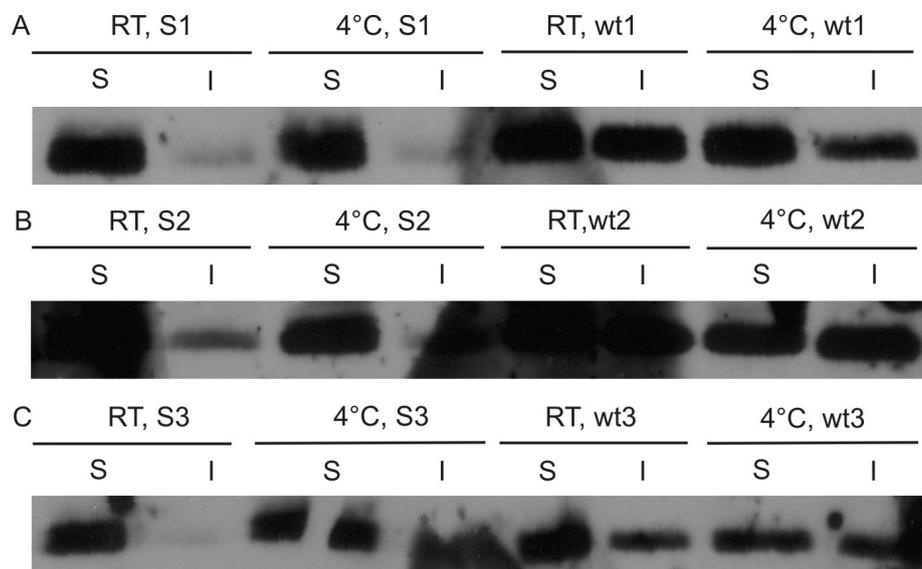


Abbildung 3.19: Western Blot mit Antikörper gegen MOG (Clon 8-18-C5) nach *CHAPS*-Extraktion bei 4°C und Raumtemperatur (RT). Verwendet wurde Gehirnlysat von Shiverer Tier 1 und Wildtyp 1 (S1, wt1, Abb. A), Shiverer Tier 2 und Wildtyp 2 (S2, wt2, Abb. B) sowie von Shiverer Tier 3 und Wildtyp 3 (S3, wt3, Abb. C). Die *CHAPS*-lösliche Fraktion ist mit S (soluble), die *CHAPS*-unlösliche Fraktion mit I (insoluble) gekennzeichnet.

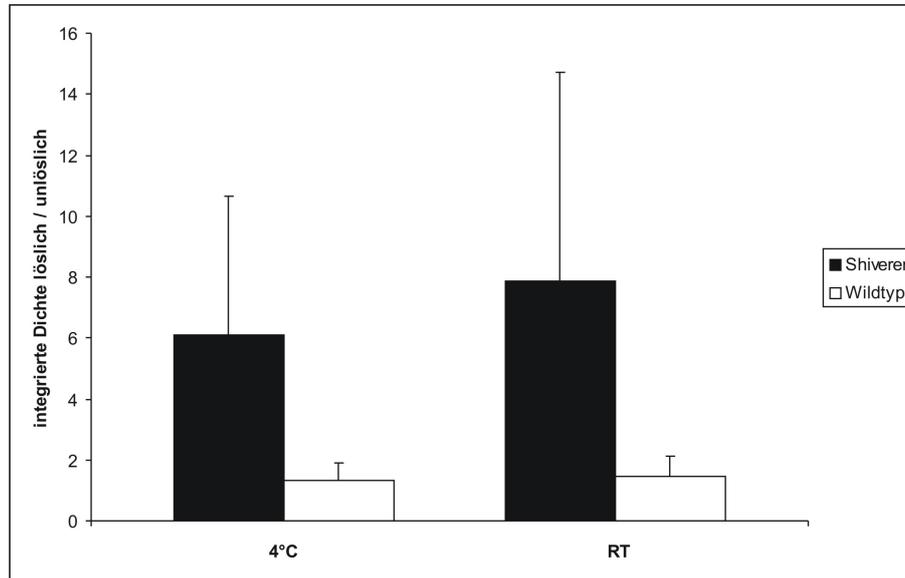


Abbildung 3.20: Graphische Darstellung der integrierten Dichte der Western-Blot-Banden aus Abb. 3.19. Aufgetragen ist der Mittelwert der Quotienten aus Banden-Dichte der löslichen Fraktion und Banden-Dichte der unlöslichen Fraktion für Shiverer (schwarz) bzw. Wildtyp-Tiere (weiß). Der höhere Wert bei Shiverern ergibt sich durch einen höheren MOG-Anteil in der *CHAPS*-löslichen Fraktion, sowohl bei 4 °C als auch bei Raumtemperatur. (4 °C: p-Wert = 0,107; RT: p-Wert = 0,121)

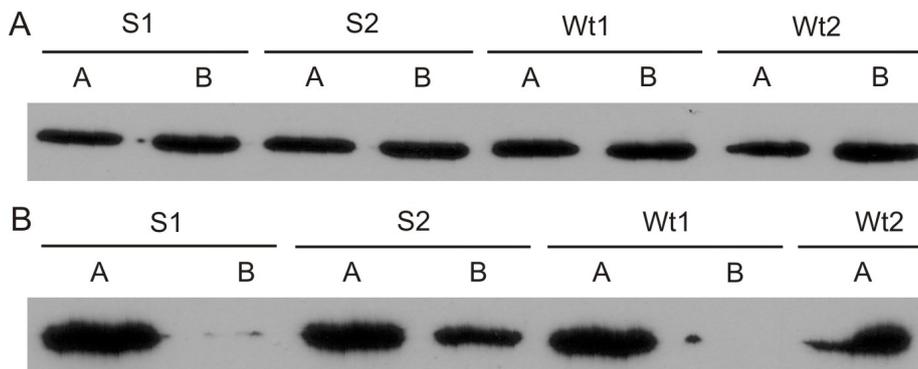


Abbildung 3.21: Western Blot mit Antikörper gegen CNP (Clon 11-5B) nach *CHAPS*-Extraktion bei Raumtemperatur (RT). Verwendet wurde Gehirnlysat von Shiverer Tier 1 und 2 (S1, S2) sowie von Wildtyp 1 und 2 (wt1, wt2). Die *CHAPS*-lösliche Fraktion findet sich im oberen Blot, die *CHAPS*-unlösliche Fraktion im unteren. Es wurden zwei unterschiedliche Gehirnlysatmengen verwendet: 5µl (A) bzw. 10µl (B).

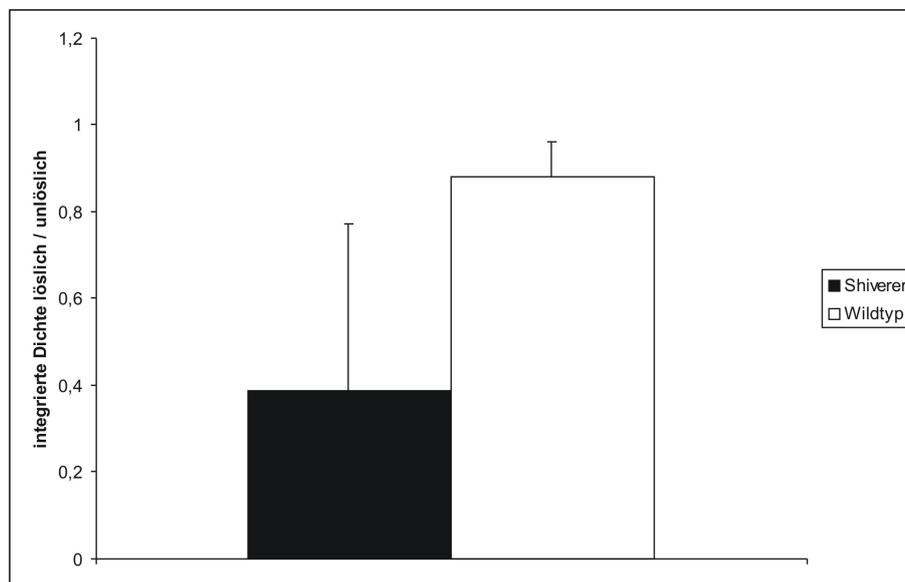


Abbildung 3.22: Graphische Darstellung der integrierten Dichte der Western-Blot-Banden aus Abb. 3.21. Aufgetragen ist der Mittelwert der Quotienten aus Banden-Dichte der löslichen Fraktion und Banden-Dichte der unlöslichen Fraktion für Shiverer (schwarz) bzw. Wildtyp-Tiere (weiß). Verwendet wurden ausschließlich die in Abb. 3.21 mit A gekennzeichneten Banden. (p-Wert = 0,147)

Kapitel 4

Diskussion

4.1 Die Proteine PLP, MAG und MOG akkumulieren vesikulär in Shiverer-Oligodendrozyten

Ziel dieser Arbeit war die nähere Charakterisierung der Mausmutante Shiverer. Insbesondere sollte festgestellt werden, ob der Membrantransport und die zelluläre Lokalisation von Myelinproteinen durch das Fehlen von MBP beeinträchtigt werden.

Es konnte anhand von Immunofluoreszenzfärbungen an Gefrierschnitten der Gehirne von drei Wochen alten Shiverer- bzw. Wildtyp-Mäusen eine vesikuläre Akkumulation der Proteine PLP, MAG und MOG im Zytoplasma demonstriert werden. Quantitative Analysen ergaben einen signifikanten Unterschied zwischen Shiverer- und Wildtyp-Gehirnen: Bei Shiverern fanden sich deutlich mehr Zellen mit vesikulär akkumulierendem Protein. Dabei war der Unterschied zwischen Mutante und Wildtyp für das Protein PLP am massivsten ausgeprägt (entsprechende Zellen in Shiverern um den Faktor 25,3 erhöht), gefolgt von MOG (Faktor 10,6) und MAG (Faktor 2,8). Für PLP konnte zudem durch Kofärbung mit dem Antikörper Lamp-1 nachgewiesen werden, dass sich das Protein im Zellorganell der Späten Endosomen / Lysosomen befindet. Für MAG und MOG war die Antikörper-Kombination mit Lamp-1 nicht möglich. Rein morphologisch entsprachen jedoch das vesikuläre Muster und die Lokalisation im Zellkörper der Verteilung des in Späten Endosomen / Lysosomen befindlichen PLPs.

Vorerst stellte sich die Frage, warum die untersuchten Proteine in Shiverern in quantitativ unterschiedlichem Ausmaß vom Wildtyp differieren. Es ist anzunehmen, dass Protein A vom Oligodendrozyt stärker exprimiert wird als Protein B oder C. Doch eine erhöhte

Konzentration des Proteins A würde nicht erklären, warum sich der prozentuale Anteil von Zellen mit Akkulaten in Shiverern bzw. Wildtyp-Mäusen für Protein A, B und C unterscheidet. Vielmehr impliziert die Beobachtung, dass die Umsatzraten der Proteine, etwa exozytotische oder endozytotische Prozesse, in der Mutante unterschiedlich stark betroffen sind.

Interessant ist dabei auch die Beobachtung, dass das Protein CNP sogar in Wildtypen moderat häufiger vesikulär akkumuliert vorkommt als in Shiverern (Faktor 1,4). Das heißt, dass es nicht nur einen quantitativen Unterschied im Ausmaß der Akkumulation gibt, sondern dass auch eine qualitative Differenz für die wichtigsten Myelinproteine besteht. Es drängt sich die Vermutung auf, dass die Proteine unterschiedlichen Transportwegen, eventuell mit gleichen Teilstrecken, folgen und diese unterschiedlich stark vom Verlust des MBP-Proteins in Shiverern betroffen sind.

An dieser Stelle ist es sinnvoll, kurz die in der Einleitung dargelegten Moleküleigenschaften und Transportmechanismen der Proteine PLP, MAG, MOG und CNP zu rekapitulieren. Während PLP, MAG und MOG Komponenten des kompakten Myelins darstellen, befindet sich CNP in nicht-kompakten Arealen, genauer gesagt in den paranodalen Schlingen und im Zytoplasma der Zellfortsätze (Trapp et al. 1988). Während für PLP (Trajkovic et al. 2006), MAG (Minuk und Braun 1996) und MOG (Kroepfl und Gardinier 2001a) vesikuläre Transportmechanismen beschrieben wurden, deuten die raren Daten für CNP auf einen nicht-vesikulären Transportweg (DeBruin et al. 2005). Dies könnte Ursache der in dieser Arbeit beobachteten Differenzen zwischen CNP einerseits und den Proteinen des kompakten Myelins andererseits sein. So wäre es denkbar, dass durch den MBP-Verlust in Shiverern Teilstrecken des Transportes kompakter Myelinkomponenten betroffen sind, nicht jedoch der Transport von CNP.

Wie genau könnte MBP nun in Transportmechanismen des Oligodendrozyten involviert sein? Zum einen denkbar ist die Möglichkeit, dass ohne MBP, also in Shiverer-Mäusen, die Endozytoserate von Zellmembranmaterial unphysiologisch erhöht ist, was zur Anhäufung von Membranproteinen in Späten Endosomen / Lysosomen führen würde. Im Umkehrschluss käme also dem Protein MBP in der Wildtyp-Maus eine Endozytose-regulierende Funktion zu. Es konnte bereits gezeigt werden, dass MBP für die Organisation der Plasmamembranlipide unerlässlich ist. Ohne MBP bleibt die Verlagerung von Galaktosylceramid (GalC) und die dichte Packung des Moleküls, wie sie im Wildtyp-Oligodendrozyt vorkommt, aus (Fitzner et al. 2006). Es ist möglich, dass MBP durch Umorganisation

der Plasmamembran einen stabilisierenden Effekt ausübt, wodurch die Endozytoserate gedrosselt wird.

Im Hinblick auf die möglicherweise zugrunde liegenden Mechanismen auf molekularer Ebene sei betont, dass für MBP eine Vielzahl von Wechselwirkungen beschrieben ist. So interagiert das Molekül elektrostatisch und hydrophob mit Lipiden (Boggs et al. 1999), wechselwirkt mit Calcium-Calmodulin, Aktin und Protein-Kinase-C (Harauz et al. 2000) und steht im Sinne eines STOP (*stable tubule only polypeptide*)-Moleküls in Verbindung mit dem Mikrotubuli-System (Galiano et al. 2006). Es ist unwahrscheinlich, dass nur einer dieser Teilaspekte für die Rolle MBPs in Transportprozessen verantwortlich ist. Eher ist davon auszugehen, dass MBP gemeinsam mit anderen Komponenten Teil einer Signaltransduktionskette ist.

Zur näheren Analyse der Rolle von MBP könnten quantifizierbare Endozytose-Experimente an kultivierten Wildtyp- bzw. Shiverer-Oligodendrozyten oder *Oli neu*-Zellen mit und ohne MBP-siRNA (*small interfering RNA*) erfolgen.

Nicht auszuschließen ist jedoch ein eventuell gleichzeitig bestehender Effekt von MBP auf die Exozytose präformierter Vesikel. Es ist denkbar, dass in Shiverer-Oligodendrozyten nicht nur eine erhöhte Endozytose der untersuchten Proteine besteht, sondern diese Proteine nach Synthese und Verpackung in Vesikel nicht zur Plasmamembran transportiert werden. Ein möglicher experimenteller Ansatz bestünde in *live-cell-imaging* Versuchen unter Einsatz von *lyso-tracker* wie von Trajkovic et al. (2006) beschrieben. Primäre Wildtyp-Oligodendrozyten müssten mit primären Shiverer-Oligodendrozyten verglichen werden.

Letztlich ist kritisch anzumerken, dass nur für PLP gezeigt werden konnte, dass die Akkumulate in Späten Endosomen / Lysosomen lokalisiert sind. Für die anderen Proteine waren keine entsprechenden Antikörperkombinationen möglich. Allerdings konnte für MAG an Wildtyp-Mäusen der Altersstufen P7 und P14 gezeigt werden, dass die vesikulären Akkumulate mit PLP kolokalisieren, von dem wiederum angenommen werden darf, dass es sich in Späten Endosomen / Lysosomen befindet.

Nicht abschließend geklärt ist die Frage, ob die beobachteten Vesikel eher Teil eines Degradationsprozesses im lysosomalen System oder Speichervesikel darstellen. Die Ergebnisse von Trajkovic et al. (2006) stützen für Wildtypen letztere Variante.

4.2 Vesikuläre Protein-Akkumulation ist ein altersabhängiges Charakteristikum

Es konnte anhand von Immunofluoreszenzfärbungen an Gefrierschnitten der Gehirne von Wildtyp-Mäusen der Altersstufen P7, P14 und P21 demonstriert werden, dass die vesikuläre Akkumulation von PLP und MAG ein altersabhängiges Charakteristikum der Oligodendrozyten-Entwicklung ist. Während zum Zeitpunkt P7 beide Proteine nur sehr schwach und vor allem vesikulär exprimiert wurden, waren im Stadium P14 sehr viele Zellen mit vesikulären PLP- bzw. MAG-Akkumulaten zu finden. Bereits im Stadium P21 waren diese Vesikel größtenteils verschwunden, während sich die nun ausgebildeten Myelintrakte deutlich anfärbten. Für PLP konnte erneut die Lokalisation im Späten Endosom / Lysosom gezeigt werden.

Interessanter Weise verhielten sich die Proteine MAG und PLP unterschiedlich: Die Steigerung der Anzahl vesikulär gefärbter Zellen von P7 auf P14 war für PLP deutlicher ausgeprägt als für MAG (PLP: Faktor 3,7; MAG: Faktor 1,4). Das Ausmaß der Reduktion von P14 zu P21 übertraf bei PLP jedoch sehr deutlich jenes von MAG: Während zum Zeitpunkt P21 für PLP die Anzahl entsprechender Zellen nur noch 1,2% des Wertes von P14 betrug, ließen sich für MAG noch 48,3% des Wertes von P14 verzeichnen.

Dieser Verlauf verdeutlicht, dass es physiologisch eine frühe Phase der vesikulären Anhäufung der Proteine PLP und MAG im Zellkörper gibt, welche dann jedoch bis zum Alter von drei Wochen in unterschiedlichem aber deutlichem Ausmaß reduziert wird. Anzunehmen ist der gerichtete Transport der Proteine in die stark wachsenden Myelinschichten.

Die Ätiologie der beschriebenen Vesikel in Wildtyp-Mäusen konnte in dieser Arbeit nicht geklärt werden. Kommt es zu einem temporären physiologischen Missverhältnis von Proteinsynthese und vesikulärer Verpackung einerseits und exozytotischem Abtransport in die wachsende Myelinschicht andererseits? Oder zeichnen sich frühe Oligodendrozyten durch eine erhöhte Endozytoserate aus, etwa durch noch nicht ausgereifte Lipidkomposition der Zellmembran bedingt? Experimentelle Ansätze zur weiteren Abklärung entsprechen den unter 4.1 beschriebenen.

Des Weiteren stellt sich die Frage, welche Signale letztlich zur Auflösung der Vesikel und zum Einbau in die wachsenden Nervenscheiden führen. Vor dem Hintergrund der Forschung der letzten Jahre, welche wie in der Einleitung dargelegt ein immer raffinierteres Bild der Neuron-Glia-Interaktion zeichnete, ist es bestechend, von neuronal-

len Signalen auszugehen. Trajkovic et al. konnten 2006 beispielsweise erarbeiten, dass in Oligodendrozyten befindliche präformierte Vesikel mit PLP durch ein neuronales, lösliches und cAMP-abhängiges Signal zur Plasmamembran verlagert werden. Ein entsprechender Ansatz mit kultivierten Oligodendrozyten mit und ohne neuronale Kokultur erscheint plausibel.

Die Analogie der Akkumulate in Wildtyp-Mäusen der Altersstufe P14 und Shiverern der Altersstufe P21 wirft die Frage auf, ob die Mutante in ihrer Entwicklung verspätet ist. Es ist nicht auszuschließen, dass die Vesikel in Shiverern zumindest partiell jenseits des Alters P21 zur Zellmembran dirigiert und dort fusioniert oder gar abgebaut werden. Es gibt Arbeitsgruppen, welche einen Differenzierungsblock von Shiverer-Oligodendrozyten postulieren. So beschreiben Seiwa et al. (2002), dass Shiverer-Oligodendrozyten, welche aus dem Gehirn eines 17 Tage alten Shiverer-Embryos gewonnen wurden, in Kultur einen Differenzierungsrückstand gegenüber Wildtyp-Zellen aufwiesen, welcher durch Zugabe des Signalmoleküls cAMP teilweise kompensiert werden konnte. Bu et al. (2004) konnten mit Hilfe des chemischen Nukleosid-Analogons BrdU feststellen, dass in Shiverer-Mäusen NG2-positive Oligodendrozyten-Vorläuferzellen eine verlängerte Phase der Proliferation und Differenzierung durchlaufen.

Um die hier dargelegten Ergebnisse weiter zu untermauern, müssten systematisch Shiverer-Gehirne jenseits des Stadiums P21 bis hin zum Alter von 3 Monaten, in welchem der Großteil der Tiere ver stirbt, immunhistochemisch untersucht werden. Auch eine Analyse des Differenzierungsgrades von Shiverer-Oligodendrozyten, etwa mit NG2 als Marker sehr früher Vorläuferstadien, sollte an Schnitten unterschiedlicher Altersstufen erfolgen.

4.3 Das Shiverer-Gehirn weist eine moderate Vermehrung der Mikroglia-Zellen auf

Es konnte anhand von Immunofluoreszenzfärbungen an Gefrierschnitten der Gehirne von drei Wochen alten Shiverer- bzw. Wildtyp-Mäusen mittels des Mikroglia-Markers Iba-1 in Kombination mit PLP bzw. MOG ausgeschlossen werden, dass die beobachteten Vesikel ausschließlich phagozytiertem Myelin in Mikroglia-Zellen entsprechen. In Shiverern befanden sich nur 4% der PLP-positiven Vesikel und 2,8% der MOG-positiven Vesikel in Iba-1 positiven Mikroglia-Zellen. Für Wildtyp-Schnitte ergaben sich Kollokalisationsraten von 20% für PLP und Iba-1 bzw. 11,1% für MOG und Iba-1. Die um den

Faktor 5 höheren Kollokalisationsraten in Wildtyp-Mäusen könnten dadurch bedingt sein, dass physiologisch ein geringer Verlust von Zellmaterial stattfindet, welches von Mikroglia-Zellen abgeräumt wird. Bei den insgesamt wenigen Vesikel-tragenden Zellen in Wildtypen scheint Phagozytose einen bedeutenden Anteil einzunehmen. Auch in Shiverern kommt diese Phagozytose vor, jedoch steht dem gegenüber ein deutlich höherer Anteil und eine deutlich höhere Gesamtzahl Vesikel-tragender Zellen, welche vom Phagozytoseprozess unabhängig zu sein scheinen.

Die quantitative Analyse der Iba-1 positiven Mikroglia-Zellen ergab zudem eine signifikante, moderate Erhöhung der Anzahl der Mikroglia-Zellen in Shiverer-Gehirnschnitten. Ein plausibler Erklärungsansatz ist die Annahme, dass das fehlgestaltete Shiverer-Myelin durch Mikroglia-Zellen zumindest teilweise abgeräumt wird. Interessant ist in diesem Zusammenhang die Frage nach einer Altersabhängigkeit der Mikroglia-Aktivierung. Möglich wäre z.B. die Annahme, dass im fortgeschrittenen Alter der Shiverer-Maus Myelin verstärkt dekompenziert und abgebaut wird und dementsprechend höhere Mikroglia-Zahlen zu finden wären.

4.4 Kaum Protein-Akkumulate in der Squalen-Synthase-Knockout-Maus

Um zu überprüfen, ob die vesikuläre Protein-Akkumulation eine unspezifische Folge des Myelinisierungsdefektes der Shiverer-Maus darstellt, wurden analoge Immunofluoreszenzfärbungen für PLP und Lamp-1 an der Squalen-Synthase-Knockout-Maus durchgeführt.

Die Squalen-Synthase-Knockout-Maus wurde 2005 ausführlich beschrieben von Saher et al.. Es handelt es sich um eine konditionale Mutante des Squalen-Synthase-Gens (*Fdft1*) in Oligodendrozyten. Betroffenen Zellen fehlt vollständig die Möglichkeit zur Cholesterin-Biosynthese. Die entsprechenden Tiere weisen ab dem Alter von zwei Wochen neurologische Defizite auf. Der Gang ist ataktisch und es besteht Tremor.

Es kommt nicht zu einem Verlust von Oligodendrozyten, insbesondere ist die Apoptose-Rate im Vergleich zum Kontrolltier nicht erhöht. Histologische Analysen zeigen jedoch lokalisationsabhängig eine starke Reduktion des Myelingehts. Insbesondere die weiße Substanz des zentralen Nervensystems ist betroffen, allerdings sind keine ultrastrukturellen Defizite des vorhandenen Myelins feststellbar. Bei reduziertem Myelingeht ist die Proteinzusammensetzung (untersucht für PLP und CNP) dem Wildtyp entsprechend. Auch

die für PLP durchgeführte *CHAPS*-Gradientenzentrifugation zeigt keine wesentlichen Unterschiede zwischen Mutante und Kontrolltieren. Die Transkription der Myelinproteine PLP, CNP und MBP ist allerdings deutlich reduziert.

Von besonderem Interesse ist die Lipid-Zusammensetzung des Myelins dieser zur Cholesterin-Synthese unfähigen Oligodendrozyten. Unerwarteter Weise erreicht das Myelin der mutanten Tiere bis zu 70% des Cholesterin-Gehaltes von Kontroll-Mäusen. Dies bedeutet, dass Oligodendrozyten in der Lage sein müssen, von benachbarten Zellen anderer Zelllinien Cholesterin abzugeben. Wie dies erfolgt und welche Zelltypen als Cholesterin-Lieferanten fungieren, ist bisher nicht abschließend geklärt. Das Verhältnis der einzelnen Lipidkomponenten des Myelins zueinander entspricht sich jedoch in Squalen-Synthase-Knockout-Mäusen und Kontroll-Tieren.

Ein Drittel der Mutanten verstirbt 20 bis 30 Tage nach der Geburt. Interessanter Weise erreicht der Großteil der Tiere, welche diese Schwelle überleben, das Alter von Wildtyp-Mäusen. Im Alter von 100 postnatalen Tagen zeigen die Tiere einen deutlich gemilderten Phänotyp. Die zuvor reduzierte Proteinkonzentration erreicht Normalniveau und histologisch zeigt sich, dass praktisch jedes Axon eine wenn auch dünnere Myelinscheide besitzt (Saher et al. 2005).

Die in dieser Arbeit untersuchten Gehirnschnitte entsprachen den Altersstufen P9 und P20, d.h. Stadien mit deutlich ausgeprägtem Phänotyp und entsprechend starker Dysmyelinisierung. In beiden Stadien wiesen die Mutanten mehr vesikulär gefärbte Zellkörper pro Gesichtsfeld auf als die jeweiligen Kontrolltiere. Der Unterschied war jedoch nur für P9 auf dem 5%-Niveau signifikant (p -Wert = 0,0062). Dieses Ergebnis lässt zwei Interpretationen zu: Zum einen ist es möglich, dass im Alter von neun Tagen die mutierten Oligodendrozyten ihren Mangel an Cholesterin noch nicht ausreichend durch Aufnahme aus Nachbarzellen kompensieren konnten. Möglicherweise ist im Alter von 20 Tagen die Cholesterin-Übernahme ausreichend, um dies auszugleichen.

Andererseits ist zu bedenken, dass die Tiere im Alter von 20 Tagen nach wie vor schwere neurologische Defizite und histologisch ausgeprägte Dysmyelinisierung der weißen Substanz aufweisen. Vor diesem Hintergrund und in Anbetracht der Tatsache, dass aufgrund von wenig verfügbarem Material der Stichprobenumfang begrenzt war, ist die Signifikanz der Unterschiede zum Zeitpunkt P9 kritisch zu hinterfragen.

In ihrer Gesamtheit betrachtet deuten die Daten nicht darauf hin, dass Squalen-Synthase-Knockout-Mäuse das Phänomen der vesikulären Protein-Akkumulation in einer der Shiverer-Linie entsprechen-

den Ausprägung aufweisen. Gestützt wird diese Ansicht durch die Beobachtung, dass die *CHAPS*-Gradienten für PLP der Altersstufe P20 keinen Unterschied zwischen Mutante und Kontrolltieren aufweisen (Saher et al. 2005). Wie unter 4.5 näher dargestellt, ist dies für gleichaltrige Shiverer-Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Tieren nicht der Fall.

So gesehen sprechen die Ergebnisse gegen die Hypothese eines unspezifischen, durch schwere Dysmyelinisierung bedingten Proteinaufbaus. Zur Festigung der Daten wäre allerdings die Untersuchung einer größeren Stichprobe sowie eines weiteren Tiermodells, etwa der in der Einleitung beschriebenen CGT-Knockout-Maus, wünschenswert.

4.5 Die Proteinverteilung in *CHAPS*-Gradienten differiert zwischen Shiverern und Wildtyp-Mäusen

Durch Einsatz von *CHAPS*, einem nicht-ionischen Detergens zur Extraktion von Glykosphingolipid- und Cholesterol-reichen Membrananteilen, konnte für die Proteine PLP, MAG und MOG, nicht aber für CNP, eine unterschiedliche Verteilung zwischen Shiverer- und Wildtyp-Gehirn festgestellt werden.

Die Beobachtung von Fitzner et al., wonach im Vergleich mit Wildtyp-Gehirnhomogenisat bei Shiverern mehr PLP in den löslichen Fraktionen zu finden ist, konnte reproduziert werden (Fitzner et al. 2006).

Darüber hinaus gelang es in dieser Arbeit, eine analoge Verschiebung zugunsten der löslichen Fraktionen für die Proteine MAG und MOG zu demonstrieren, wohingegen für CNP kein entsprechender Unterschied zwischen Shiverer- und Wildtyp-Gehirn festgestellt werden konnte.

Diese Ergebnisse untermauern durch eine zweite experimentelle Methode die durch Immunofluoreszenzfärbungen gewonnenen Ergebnisse: Die Proteine des kompakten Myelins, PLP, MAG und MOG, sind in Shiverer-Oligodendrozyten anders verteilt als in Wildtyp-Zellen. Dies gilt nicht für das periphere Membranprotein CNP.

Die für Myelin und *rafts* charakteristischen Membranabschnitte, reich an Glykosphingolipiden und Cholesterol, sind in *CHAPS* nicht löslichen (Simons M et al. 2000). Eine Verschiebung bei Shiverern zugunsten der Verteilung in löslichen Fraktionen könnte folglich bedeuten, dass geringere Anteile der Proteine mit entsprechend zusammengesetzten Membranen assoziiert sind. Die anteilige Zunahme der

Proteine in der löslichen Fraktion könnte dadurch erklärt werden, dass die durch Immunofluoreszenzfärbungen demonstrierten vesikulären Protein-Einschlüsse *CHAPS*-löslich sind. Eine quantitative Verschiebung durch Mangel an Myelin und damit *CHAPS*-unlöslichem Material in Shiverern kommt ursächlich ebenfalls in Betracht. Zur Erklärung der abweichenden Ergebnisse von CNP müssen die Unterschiede in Moleküleigenschaften und Transportwegen berücksichtigt werden (vgl. Einleitung, 1.3.2 und 1.4.2).

4.6 Perspektiven

Durch die oben dargestellten Ergebnisse konnte eine Parallele zwischen unreifen Stadien der Oligodendrozyten der Wildtyp-Maus und reiferen Stadien der schwerst dysmyelinisierenden Mutante Shiverer gezogen werden. So rückt der Aspekt der funktionellen Unreife von Oligodendrozyten im Zusammenhang mit Störungen der Myelinproduktion in den Fokus des Interesses. Diskutabel erscheint die Frage, ob vesikuläre Akkumulate insbesondere der Myelin-Hauptkomponente PLP nicht als Maßstab der funktionellen Unreife und Effektivität des Myelinisierungsprozesses angesehen werden können.

Wie in der Einleitung unter 1.5.1 beschrieben, kommt es im Verlauf der Multiplen Sklerose zur Einwanderung von Oligodendrozyten-Vorläuferzellen (Chang et al. 2000), Ausmaß und Qualität der Remyelinisierung sind jedoch nicht ausreichend, um den gesunden Status wiederherzustellen.

Die Oligodendrozyten-Differenzierung wird unter anderem durch die Interaktion von Jagged (auf Axonen und Astrozyten) und Notch (auf Oligodendrozyten) geblockt (John et al. 2002). Bis heute existiert kein histologisches Maß, um die Effektivität der Remyelinisierung im Multiple-Sklerose-Plaques deutlich zu machen. Umfangreiche Experimente an Tiermodellen der Erkrankung könnten deutlich machen, ob der Anteil von Oligodendrozyten mit vesikulären PLP-Akkumulaten an der Gesamtzahl der vorhandenen Oligodendrozyten ein Maß für die Effektivität der Remyelinisierung darstellt.

Um die Hypothese einer funktionellen Unreife der Shiverer-Oligodendrozyten zu festigen, könnte der Effekt Reife-induzierender Faktoren wie IGF-1 auf kultivierte Shiverer-Oligodendrozyten untersucht werden.

Des Weiteren rückt durch die vorliegende Arbeit die Bedeutung gestörter Transportprozesse als Ursache für ineffiziente Myelinisierung in den Vordergrund. Ein Blick in die Fachliteratur erstaunt: Für viele Hauptkomponenten des Myelins sind die genauen zellulären

Transportmechanismen noch nicht abschließend geklärt (vgl. Einleitung, 1.4.2). Dies spiegelt die Schwierigkeit adäquater experimenteller Ansätze wider. Durch die Kofärbungen mit Lamp-1, einem spezifischen Marker für Späte Endosomen / Lysosomen, wurde ein Bruchteil einer möglichen Transportstrecke abgebildet. Von Bedeutung erscheint dabei der Rückgriff auf Gefrierschnitte von Mausgehirnen, wurden doch viele frühere Daten an kultivierten Zellen gewonnen. Es ist nicht davon auszugehen, dass die Prozesse in Kultur jenen in vivo exakt entsprechen. Interessant wäre dennoch die Übertragung auf kultivierte primäre Oligodendrozyten der Shiverer- bzw. Wildtyp-Maus ebenso wie Experimente mit MBP-siRNA an primären Wildtyp-Oligodendrozyten und Experimente mit MBP-transfizierten bzw. nicht-transfizierten *Oli neu*-Zellen. Endozytose-Experimente für PLP, MAG und MOG könnten einen quantifizierbaren Vergleich zwischen Zellen mit und ohne MBP zulassen und somit Klarheit über die Frage bringen, ob MBP die Endozytoserate herabzuregulieren vermag (vgl. Trajkovic et al. 2006).

Kapitel 5

Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die nähere Charakterisierung von Transportwegen und zellulärer Lokalisation von Myelinproteinen in der Mausmutante Shiverer.

Es konnte gezeigt werden, dass in den Oligodendrozyten von 21 Tage alten Shiverer-Mäusen eine vesikuläre Akkumulation der Myelinproteine PLP, MAG und MOG vorliegt, wohingegen dies für CNP nicht der Fall ist. Dabei sind PLP, MAG und MOG Komponenten des kompakten Myelins, CNP hingegen des nicht-kompakten Myelins. Die Vesikel konnten partiell als Späte Endosomen / Lysosomen identifiziert werden.

Durch *CHAPS*-Extraktions-Experimente, in denen sich eine unterschiedliche Verteilung der Proteine PLP, MAG und MOG in der Shiverer-Maus nachweisen ließ, konnten die Ergebnisse untermauert werden.

Der Vergleich mit Wildtyp-Mäusen der Altersstufen P7, P14 und P21 konnte zeigen, dass es vor allem zum Zeitpunkt P14 zu einer den Shiverern entsprechenden vesikulären Anhäufung der Proteine PLP und MAG kommt, diese jedoch zum Zeitpunkt P21 wieder deutlich reduziert ist.

Ebenfalls in Squalen-Synthase-Knockout-Mäusen, welche in der phänotypischen Ausprägung neurologischer Defizite Shiverern ähneln, finden sich analoge Phänomene in frühen Entwicklungsstufen, jedoch nicht mehr drei Wochen nach Geburt.

Diese Ergebnisse werfen die Frage nach einer spezifischen Funktion des Proteins MBP in der Regulation endo- oder exozytotischer Transportprozesse auf.

Die Analogie zwischen unreifen Stadien der Oligodendrozyten der Wildtyp-Maus und reiferen Stadien der schwerst dysmyelinisierenden Mutante Shiverer eröffnet zwei Perspektiven: Zum einen könnte das vesikuläre Stadium von Wildtyp-Zellen ihrer Einordnung in

den Differenzierungsprozess dienen, etwa als Charakteristikum des prämyelinisierenden bzw. frühen myelinisierenden Stadiums. Zum anderen ist eine Bedeutung in der neuropathologischen Beurteilung demyelinisierender Erkrankungen vorstellbar, so etwa bei der Frage nach Remyelinisierungsaktivität in der Multiplen-Sklerose-Läsion.

Kapitel 6

Anhang: Abkürzungen

bFGF, auch FGF2	boviner Fribroblasten-Wachstumsfaktor
BSA	bovines Serum-Albumin
Caspr	contactin-associated protein
CCP	clathrin coated pit
CGT	Galaktose-Ceramid-Galaktosyltransferase
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat
CIMF	<i>CHAPS</i> insoluble membrane fragment
CNP	2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase
CNTF	ciliary neurotrophic factor
DIG	detergent insoluble, glycolipid enriched membrane
DRM	detergent resistant membrane
EAE	Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis
EE	early endosome, Frühes Endosom
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor
exon2+MBP	MBP einschließlich Exon 2
exon2-MBP	MBP ohne Exon 2
GA	Golgi-Apparat
GalC	Galaktosylceramid
GF	Gesichtsfeld
HBSS	Hank's balanced salt solution
Iba-1	ionized calcium-binding adaptor molecule 1
IGF-1	Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor 1
IPL	intraperiod line
LE	late endosome, Spätes Endosom
LIF	leukemia inhibitory factor
LSM	Laserscan-Mikroskop
Ly	Lysosom

MAG	myelin-associated glycoprotein
MDL	major dense line
MDCK	Madin-Darby canine kidney
MHC	major histocompatibility complex
MLM	myelin like membrane
MOG	myelin oligodendrocyte glycoprotein
MS	Multiple Sklerose
msd	myelin synthesis deficient
MVB	multivesicular body
n	Stichprobenumfang
NgR	Nogo-Rezeptor
NT-3	Neurotrophin 3
Omgp	oligodendrocyte myelin glycoprotein
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PDGF α R	platelet derived growth factor receptor α
PFA	Paraformaldehyd
PLP	proteolipid protein
PM	Plasmamembran
PMD	Pelizaeus-Merzbacher-Erkrankung
PNS	Peripheres Nervensystem
pp	post partum
PtdIns3P	Phosphatidylinositol-3-Phosphat
RE	Recycling-Endosom
rER	raues Endoplasmatisches Reticulum
rsh	rumpshaker
RT	Raumtemperatur
sGalC	Galaktosulfatid
STOP	stable tubule only polypeptide
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
shi	Shiverer
siRNA	small interfering RNA
SQS	Squalen-Synthase
SVZ	Subventrikularzone
ZNS	Zentrales Nervensystem

Kapitel 7

Literaturverzeichnis

Allegretta M, Nicklas JA, Sriram S, Albertini RJ (1990): T cells responsive to myelin basic protein in patients with multiple sclerosis. *Science* 247(4943), 718-21

Allinquant B, Staugaitis SM, D'Urso D, Colman DR (1991): The ectopic expression of myelin basic protein isoforms in Shiverer oligodendrocytes: implications for myelinogenesis. *J Cell Biol* 113(2), 393-403

Amberger VR, Avellana-Adalid V, Hensel T, Baron-van Evercooren A, Schwab ME (1997): Oligodendrocyte-type 2 astrocyte progenitors use a metalloendoprotease to spread and migrate on CNS myelin. *Eur J Neurosci* 9(1), 151-62

Amiguet P, Gardinier MV, Zanetta JP, Matthieu JM (1992): Purification and partial structural and functional characterization of mouse myelin/oligodendrocyte glycoprotein. *J Neurochem* 58(5), 1676-82

Andres KH (1965): On the fine structure of special structures in myelinated nerve fibers of the rat cerebellum. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 65, 701-12

Armstrong RC, Dorn HH, Kufta CV, Friedman E, Dubois-Dalcq ME (1992): Pre-oligodendrocytes from adult human CNS. *J Neurosci* 12(4), 1538-47

Bache KG, Brech A, Mehlum A, Stenmark H (2003): Hrs regulates multivesicular body formation via ESCRT recruitment to endosomes. *J Cell Biol* 162(3), 435-42

Barbarese E, Carson JH, Braun PE (1978): Accumulation of the four myelin basic proteins in mouse brain during development. *J Neurochem* 31(4), 779-82

Baron W, Colognato H, Ffrench-Constant C (2005): Integrin-growth factor interactions as regulators of oligodendroglial development and function. *Glia* 49(4), 467-79

Barres BA, Raff MC (1994): Control of oligodendrocyte number in the developing rat optic nerve. *Neuron* 12(5), 935-42

- Barres BA, Raff MC (1999): Axonal control of oligodendrocyte development. *J Cell Biol* 147(6), 1123-8
- Barres BA, Jacobson MD, Schmid R, Sendtner M, Raff MC (1993): Does oligodendrocyte survival depend on axons? *Curr Biol* 3(8), 489-97
- Barton DE, Arquint M, Roder J, Dunn R, Francke U (1987): The myelin-associated glycoprotein gene: mapping to human chromosome 19 and mouse chromosome 7 and expression in quivering mice. *Genomics* 1(2), 107-12
- Baumann N, Pham-Dinh D (2001): Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiol Rev* 81(2), 871-927
- Beniac DR, Wood DD, Palaniyar N, Ottensmeyer FP, Moscarello MA, Harauz G (2000): Cryoelectron microscopy of protein-lipid complexes of human myelin basic protein charge isomers differing in degree of citrullination. *J Struct Biol* 129(1), 80-95
- Bernard CC, Johns TG, Slavin A, Ichikawa M, Ewing C, Liu J, Bettadapura J (1997): Myelin oligodendrocyte glycoprotein: a novel candidate autoantigen in multiple sclerosis. *J Mol Med* 75(2), 77-88
- Bernier L, Colman DR, D'Eustachio P (1988): Chromosomal locations of genes encoding 2',3' cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase and glial fibrillary acidic protein in the mouse. *J Neurosci Res* 20(4), 497-504
- Billings-Gagliardi S, Adcock LH, Wolf MK (1980): Hypomyelinated mutant mice: description of jpsd and comparison with jp and qk on their present genetic backgrounds. *Brain Res* 194(2), 325-38
- Birling MC, Roussel G, Nussbaum F, Nussbaum JL (1993): Biochemical and immunohistochemical studies with specific polyclonal antibodies directed against bovine myelin/oligodendrocyte glycoprotein. *Neurochem Res* 18(8), 937-45
- Bö L, Quarles RH, Fujita N, Bartoszewicz Z, Sato S, Trapp BD (1995): Endocytic depletion of L-MAG from CNS myelin in quaking mice. *J Cell Biol* 131(6 Pt 2), 1811-20
- Boggs JM, Rangaraj G, Koshy KM (1999): Analysis of the membrane-interacting domains of myelin basic protein by hydrophobic photolabeling. *Biochim Biophys Acta* 1417(2), 254-66
- Boiko T, Winckler B (2006): Myelin under construction - teamwork required. *J Cell Biol* 172(6), 799-801
- Boison D, Büssow H, D'Urso D, Müller HW, Stoffel W (1995): Adhesive properties of proteolipid protein are responsible for the compaction of CNS myelin sheaths. *J Neurosci* 15(8), 5502-13
- Bosio A, Binczek E, Stoffel W (1996): Functional breakdown of the lipid bilayer of the myelin membrane in central and peripheral nervous system by disrupted galactocerebroside synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(23), 13280-5

- Bottenstein JE, Sato GH (1979): Growth of a rat neuroblastoma cell line in serum-free supplemented medium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76(1), 514-7
- Boucrot E, Kirchhausen T (2007): Endosomal recycling controls plasma membrane area during mitosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(19), 7939-44
- Bradl M, Linington C (1996): Animal models of demyelination. *Brain Pathol* 6(3), 303-11
- Brown DA, London E (2000): Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J Biol Chem* 275(23), 17221-4
- Brunner C, Lassmann H, Waehneltd TV, Matthieu JM, Linington C (1989): Differential ultrastructural localization of myelin basic protein, myelin/oligodendroglial glycoprotein, and 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase in the CNS of adult rats. *J Neurochem* 52(1), 296-304
- Bu J, Banki A, Wu Q, Nishiyama A (2004): Increased NG2(+) glial cell proliferation and oligodendrocyte generation in the hypomyelinating mutant shiverer. *Glia* 48(1), 51-63
- Bunge MB, Bunge RP, Pappas GD (1962): Electron microscopic demonstration of connections between glia and myelin sheaths in the developing mammalian central nervous system. *J Cell Biol* 12, 448-53
- Butt AM, Ransom BR (1989): Visualization of oligodendrocytes and astrocytes in the intact rat optic nerve by intracellular injection of lucifer yellow and horseradish peroxidase. *Glia* 2(6), 470-5
- Cajal y R (1913): Contribucion al conocimiento de la neuroglia del cerebro humano. *Trab Lab Invest Biol (Madrid)* 11, 255-315
- Caldwell JH, Schaller KL, Lasher RS, Peles E, Levinson SR (2000): Sodium channel Na(v)1.6 is localized at nodes of ranvier, dendrites, and synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(10), 5616-20
- Canoll PD, Musacchio JM, Hardy R, Reynolds R, Marchionni MA, Salzer JL (1996): GGF/neuregulin is a neuronal signal that promotes the proliferation and survival and inhibits the differentiation of oligodendrocyte progenitors. *Neuron* 17(2), 229-43
- Canoll PD, Kraemer R, Teng KK, Marchionni MA, Salzer JL (1999): GGF/neuregulin induces a phenotypic reversion of oligodendrocytes. *Mol Cell Neurosci* 13(2), 79-94
- Chang A, Nishiyama A, Peterson J, Prineas J, Trapp BD (2000): NG2-positive oligodendrocyte progenitor cells in adult human brain and multiple sclerosis lesions. *J Neurosci* 20(17), 6404-12
- Chang A, Tourtellotte WW, Rudick R, Trapp BD (2002): Premyelinating oligodendrocytes in chronic lesions of multiple sclerosis. *N Engl J Med* 346(3), 165-73

- Chernoff GF (1981): Shiverer: an autosomal recessive mutant mouse with myelin deficiency. *J Hered* 72(2), 128
- Cohen AW, Hnasko R, Schubert W, Lisanti MP (2004): Role of caveolae and caveolins in health and disease. *Physiol Rev* 84(4), 1341-79
- Colman DR, Kreibich G, Frey AB, Sabatini DD (1982): Synthesis and incorporation of myelin polypeptides into CNS myelin. *J Cell Biol* 95(2 Pt 1), 598-608
- Court FA, Wrabetz L, Feltri ML (2006): Basal lamina: Schwann cells wrap to the rhythm of space-time. *Curr Opin Neurobiol* 16(5), 501-7
- Cua DJ, Sherlock J, Chen Y, Murphy CA, Joyce B, Seymour B, Lucian L, To W, Kwan S, Churakova T, Zurawski S, Wiekowski M, Lira SA, Gorman D, Kastelein RA, Sedgwick JD (2003): Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature* 421(6924), 744-8
- Curatolo W (1982): Thermal behavior of fractionated and unfractionated bovine brain cerebrosides. *Biochemistry* 21(8), 1761-4
- DeBruin LS, Haines JD, Wellhauser LA, Radeva G, Schonmann V, Bienzle D, Harauz G (2005): Developmental partitioning of myelin basic protein into membrane microdomains. *J Neurosci Res* 80(2), 211-25
- della Gaspera B, Pham-Dinh D, Roussel G, Nussbaum JL, Dautigny A (1998): Membrane topology of the myelin/oligodendrocyte glycoprotein. *Eur J Biochem* 258(2), 478-84
- Denisenko-Nehrbass N, Oguievetskaia K, Goutebroze L, Galvez T, Yamakawa H, Ohara O, Carnaud M, Girault JA (2003): Protein 4.1B associates with both Caspr/paranodin and Caspr2 at paranodes and juxtapanodes of myelinated fibres. *Eur J Neurosci* 17(2), 411-6
- De Vries H, Hoekstra D (2000) : On the biogenesis of the myelin sheath: cognate polarized trafficking pathways in oligodendrocytes. *Glycoconj J* 17(3 -4), 181-90
- De Vries H, de Jonge JC, Schrage C, van der Haar ME, Hoekstra D (1997): Differential and cell development-dependent localization of myelin mRNAs in oligodendrocytes. *J Neurosci Res* 47(5), 479-88
- DeWille JW, Horrocks LA (1992): Synthesis and turnover of myelin phospholipids and cholesterol. *Myelin* 3, 207-231
- Dubois-Dalcq M, Behar T, Hudson L, Lazzarini RA (1986): Emergence of three myelin proteins in oligodendrocytes cultured without neurons. *J Cell Biol* 102(2), 384-92
- Duncan ID, Hammang JP, Goda S, Quarles RH (1989): Myelination in the jimpy mouse in the absence of proteolipid protein. *Glia* 2(3), 148-54

- Dupree JL, Coetzee T, Blight A, Suzuki K, Popko B (1998): Myelin galactolipids are essential for proper node of Ranvier formation in the CNS. *J Neurosci* 18(5), 1642-9
- Dupree P, Parton RG, Raposo G, Kurzchalia TV, Simons K (1993): Caveolae and sorting in the trans-Golgi network of epithelial cells. *EMBO J* 12(4), 1597-605
- Engelhardt B (2008): The blood-central nervous system barriers actively control immune cell entry into the central nervous system. *Curr Pharm Des* 14(16), 1555-65
- Eshed Y, Feinberg K, Poliak S, Sabanay H, Sarig-Nadir O, Spiegel I, Bermingham JR Jr, Peles E (2005): Gliomedin mediates Schwann cell-axon interaction and the molecular assembly of the nodes of Ranvier. *Neuron* 47(2), 215-29
- Fitzner D, Schneider A, Kippert A, Möbius W, Willig KI, Hell SW, Bunt G, Gaus K, Simons M (2006): Myelin basic protein-dependent plasma membrane reorganization in the formation of myelin. *EMBO J* 25(21), 5037-48
- Fölsch H, Ohno H, Bonifacino JS, Mellman I (1999): A novel clathrin adaptor complex mediates basolateral targeting in polarized epithelial cells. *Cell* 99(2), 189-98
- Frail DE, Braun PE (1984): Two developmentally regulated messenger RNAs differing in their coding region may exist for the myelin-associated glycoprotein. *J Biol Chem* 259(23), 14857-62
- Friede RL (1973): Dating the development of human cerebellum. *Acta Neuropathol* 23(1), 48-58
- Friede RL, Bischhausen R (1982): How are sheath dimensions affected by axon caliber and internode length? *Brain Res* 235(2), 335-50
- Frohman EM, Racke MK, Raine CS (2006): Multiple sclerosis—the plaque and its pathogenesis. *N Engl J Med* 354(9), 942-55
- Fuller SD, Bravo R, Simons K (1985): An enzymatic assay reveals that proteins destined for the apical or basolateral domains of an epithelial cell line share the same late Golgi compartments. *EMBO J* 4(2), 297-307
- Galiano MR, Andrieux A, Deloulme JC, Bosc C, Schweitzer A, Job D, Hallak ME (2006): Myelin basic protein functions as a microtubule stabilizing protein in differentiated oligodendrocytes. *J Neurosci Res* 84(3), 534-41
- Gardinier MV, Amiguet P, Linington C, Matthieu JM (1992): Myelin/oligodendrocyte glycoprotein is a unique member of the immunoglobulin superfamily. *J Neurosci Res* 33(1), 177-87
- Ghandour MS, Feutz AC, Jalabi W, Taleb O, Bessert D, Cypher M, Carlock L, Skoff RP (2002): Trafficking of PLP/DM20 and cAMP signaling in immortalized jimpy oligodendrocytes. *Glia* 40(3), 300-11

- Giger RJ, Venkatesh K, Chivatakarn O, Raiker SJ, Robak L, Hofer T, Lee H, Rader C (2008): Mechanisms of CNS myelin inhibition: evidence for distinct and neuronal cell type specific receptor systems. *Restor Neurol Neurosci* 26(2-3), 97-115
- Gogate N, Verma L, Zhou JM, Milward E, Rusten R, O'Connor M, Kufta C, Kim J, Hudson L, Dubois-Dalcq M (1994): Plasticity in the adult human oligodendrocyte lineage. *J Neurosci* 14(8), 4571-87
- Gow A, Southwood CM, Lazzarini RA (1998): Disrupted proteolipid protein trafficking results in oligodendrocyte apoptosis in an animal model of Pelizaeus-Merzbacher disease. *J Cell Biol* 140(4), 925-34
- Greene B, Liu SH, Wilde A, Brodsky FM (2000): Complete reconstitution of clathrin basket formation with recombinant protein fragments: adaptor control of clathrin self-assembly. *Traffic* 1(1), 69-75
- Greer JM, Lees MB (2002): Myelin proteolipid protein-the first 50 years. *Int J Biochem Cell Biol* 34(3), 211-5
- Griffiths I, Klugmann M, Anderson T, Yool D, Thomson C, Schwab MH, Schneider A, Zimmermann F, McCulloch M, Nadon N, Nave KA (1998): Axonal swellings and degeneration in mice lacking the major proteolipid of myelin. *Science* 280(5369), 1610-3
- Gruenberg J, Stenmark H (2004): The biogenesis of multivesicular endosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5(4), 317-23
- Harauz G, Ishiyama N, Bates IR (2000): Analogous structural motifs in myelin basic protein and in MARCKS. *Mol Cell Biochem* 209(1-2), 155-63
- Hess A, Young JZ (1952): The nodes of Ranvier. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 140(900), 301-20
- Heuser J, Kirchhausen T (1985): Deep-etch views of clathrin assemblies. *J Ultrastruct Res* 92(1-2), 1-27
- Hortega R (1928): Tercera aportacion al conocimiento morfologico e interpretacion funcional de la oligodendroglia. *Memor Real Soc Esp Hist Nat* 14, 5-122
- Ishibashi T, Dakin KA, Stevens B, Lee PR, Kozlov SV, Stewart CL, Fields RD (2006): Astrocytes promote myelination in response to electrical impulses. *Neuron* 49(6), 823-32
- John GR, Shankar SL, Shafit-Zagardo B, Massimi A, Lee SC, Raine CS, Brosnan CF (2002): Multiple sclerosis: re-expression of a developmental pathway that restricts oligodendrocyte maturation. *Nat Med* 8(10), 1115-21
- Jung M, Krämer E, Grzenkowski M, Tang K, Blakemore W, Aguzzi A, Khazaie K, Chlichlia K, von Blankenfeld G, Kettenmann H, et al. (1995): Lines of murine oligodendroglial precursor cells immortalized by an activated neu tyrosine kinase show distinct degrees of interaction with axons in vitro and in vivo. *Eur J Neurosci* 7(6), 1245-65

- Karim SA, Barrie JA, McCulloch MC, Montague P, Edgar JM, Kirkham D, Anderson TJ, Nave KA, Griffiths IR, McLaughlin M (2007): PLP overexpression perturbs myelin protein composition and myelination in a mouse model of Pelizaeus-Merzbacher disease. *Glia* 55(4), 341-51
- Katzmann DJ, Odorizzi G, Emr SD (2002): Receptor downregulation and multivesicular-body sorting. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3(12), 893-905
- Kimura M, Sato M, Akatsuka A, Nozawa-Kimura S, Takahashi R, Yokoyama M, Nomura T, Katsuki M (1989): Restoration of myelin formation by a single type of myelin basic protein in transgenic shiverer mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(14), 5661-5
- Klugmann M, Schwab MH, Pühlhofer A, Schneider A, Zimmermann F, Griffiths IR, Nave KA (1997): Assembly of CNS myelin in the absence of proteolipid protein. *Neuron* 18(1), 59-70
- Knapp PE, Skoff RP, Redstone DW (1986): Oligodendroglial cell death in jimpy mice: an explanation for the myelin deficit. *J Neurosci* 6(10), 2813-22
- Koehler NK, Genain CP, Giesser B, Hauser SL (2002): The human T cell response to myelin oligodendrocyte glycoprotein: a multiple sclerosis family-based study. *J Immunol* 168(11), 5920-7
- Komada M, Soriano P (2002): [Beta]IV-spectrin regulates sodium channel clustering through ankyrin-G at axon initial segments and nodes of Ranvier. *J Cell Biol* 156(2), 337-48
- Krämer EM, Schardt A, Nave KA (2001): Membrane traffic in myelinating oligodendrocytes. *Microsc Res Tech* 52(6), 656-71
- Krämer-Albers EM, Gehrig-Burger K, Thiele C, Trotter J, Nave KA (2006): Perturbed interactions of mutant proteolipid protein/DM20 with cholesterol and lipid rafts in oligodendroglia: implications for dysmyelination in spastic paraplegia. *J Neurosci* 26(45), 11743-52
- Kroepfl JF, Gardinier MV (2001a): Mutually exclusive apicobasolateral sorting of two oligodendroglial membrane proteins, proteolipid protein and myelin/oligodendrocyte glycoprotein, in Madin-Darby canine kidney cells. *J Neurosci Res* 66(6), 1140-8
- Kroepfl JF, Gardinier MV (2001b): Identification of a basolateral membrane targeting signal within the cytoplasmic domain of myelin/oligodendrocyte glycoprotein. *J Neurochem* 77(5), 1301-9
- Lillie, RS (1925): Factors affecting transmission and recovery in the passive iron model. *J Gen Physiol* 7, 473-507
- Lisanti MP, Scherer PE, Tang Z, Sargiacomo M (1994): Caveolae, caveolin and caveolin-rich membrane domains: a signalling hypothesis. *Trends Cell Biol* 4(7), 231-5

- Lock C, Hermans G, Pedotti R, Brendolan A, Schadt E, Garren H, Langer-Gould A, Strober S, Cannella B, Allard J, Klonowski P, Austin A, Lad N, Kaminski N, Galli SJ, Oksenberg JR, Raine CS, Heller R, Steinman L (2002): Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis. *Nat Med* 8(5), 500-8
- Lüllmann-Rauch R: Histologie, Verstehen - Lernen - Nachschlagen, 1. Auflage; Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2003
- Marcus J, Dupree JL, Popko B (2002): Myelin-associated glycoprotein and myelin galactolipids stabilize developing axo-glial interactions. *J Cell Biol* 156(3), 567-77
- Masuhr KF, Neumann M: Duale Reihe Neurologie, 5. Auflage; Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2005
- McIntosh DP, Tan XY, Oh P, Schnitzer JE (2002): Targeting endothelium and its dynamic caveolae for tissue-specific transcytosis in vivo: a pathway to overcome cell barriers to drug and gene delivery. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(4), 1996-2001
- Mellman I, Nelson WJ (2008): Coordinated protein sorting, targeting and distribution in polarized cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9(11), 833-45
- Minuk J, Braun PE (1996): Differential intracellular sorting of the myelin-associated glycoprotein isoforms. *J Neurosci Res* 44(5), 411-20
- Monge M, Kadiiski D, Jacque CM, Zalc B (1986) : Oligodendroglial expression and deposition of four major myelin constituents in the myelin sheath during development. An in vivo study. *Dev Neurosci* 8(4), 222-35
- Morell P, Jurevics H (1996): Origin of cholesterol in myelin. *Neurochem Res* 21(4), 463-70
- Mousavi SA, Malerød L, Berg T, Kjekken R (2004): Clathrin-dependent endocytosis. *Biochem J* 377(Pt 1), 1-16
- Nave KA, Lai C, Bloom FE, Milner RJ (1986): Jimpy mutant mouse: a 74-base deletion in the mRNA for myelin proteolipid protein and evidence for a primary defect in RNA splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(23), 9264-8
- Norton WT, Poduslo SE(1973): Myelination in rat brain: changes in myelin composition during brain maturation. *J Neurochem* 21(4), 759-73
- O'Brien JS, Rouser G (1964): The fatty acid composition of brain sphingolipids: sphingomyelin, ceramide, cerebroside, and cerebroside sulfate. *J Lipid Res* 5(3), 339-42
- Ogawa Y, Schafer DP, Horresh I, Bar V, Hales K, Yang Y, Susuki K, Peles E, Stankewich MC, Rasband MN (2006): Spectrins and ankyrinB constitute a specialized paranodal cytoskeleton. *J Neurosci* 26(19), 5230-9

- Oh P, McIntosh DP, Schnitzer JE (1998): Dynamin at the neck of caveolae mediates their budding to form transport vesicles by GTP-driven fission from the plasma membrane of endothelium. *J Cell Biol* 141(1), 101-14
- Owen DJ, Vallis Y, Pearse BM, McMahon HT, Evans PR (2000): The structure and function of the beta 2-adaptin appendage domain. *EMBO J* 19(16), 4216-27
- Palma AE, Owh P, Fredric C, Readhead C, Moscarello MA (1997): Characterization of myelin basic protein charge microheterogeneity in developing mouse brain and in the transgenic shiverer mutant. *J Neurochem* 69(4), 1753-62
- Pedraza L, Fidler L, Staugaitis SM, Colman DR (1997): The active transport of myelin basic protein into the nucleus suggests a regulatory role in myelination. *Neuron* 18(4), 579-89
- Peles E, Salzer JL (2000): Molecular domains of myelinated axons. *Curr Opin Neurobiol* 10(5), 558-65
- Peters A, Palay S, Webster H: The Fine Structure of the Nervous System: the Neuron and the Supporting Cells. Oxford Univ. Press, Oxford 1991
- Pfeiffer SE, Warrington AE, Bansal R (1993): The oligodendrocyte and its many cellular processes. *Trends Cell Biol* 3(6), 191-7
- Pham-Dinh D, Jones EP, Pitiot G, Della Gaspera B, Daubas P, Mallet J, Le Paslier D, Fischer Lindahl K, Dautigny A (1995): Physical mapping of the human and mouse MOG gene at the distal end of the MHC class Ib region. *Immunogenetics* 42(5), 386-91
- Poliak S, Gollan L, Martinez R, Custer A, Einheber S, Salzer JL, Trimmer JS, Shrager P, Peles E (1999): Caspr2, a new member of the neurexin superfamily, is localized at the juxtaparanodes of myelinated axons and associates with K⁺ channels. *Neuron* 24(4), 1037-47
- Privat A, Jacque C, Bourre JM, Dupouey P, Baumann N (1979): Absence of the major dense line in myelin of the mutant mouse shiverer. *Neurosci Lett* 12(1), 107-12
- Pschyrembel Klinisches Wörterbuch, 261. Auflage; Walter de Gruyter Verlag, Berlin, 2007, s.v. Pelizaeus-Merzbacher-Krankheit, S. 1413
- Quarles RH, Everly JL, Brady RO (1973): Myelin-associated glycoprotein: a developmental change. *Brain Res* 58(2), 506-9
- Raff MC, Mirsky R, Fields KL, Lisak RP, Dorfman SH, Silberberg DH, Gregson NA, Leibowitz S, Kennedy MC (1978): Galactocerebroside is a specific cell-surface antigenic marker for oligodendrocytes in culture. *Nature* 274(5673), 813-6
- Raiborg C, Rusten TE, Stenmark H (2003): Protein sorting into multivesicular endosomes. *Curr Opin Cell Biol* 15(4), 446-55

- Ranvier LA (1871) : Sur les éléments conjonctifs de la moelle épinière. *Compt Rend* 73, 1168-1171
- Readhead C, Popko B, Takahashi N, Shine HD, Saavedra RA, Sidman RL, Hood L (1987): Expression of a myelin basic protein gene in transgenic shiverer mice: correction of the dysmyelinating phenotype. *Cell* 48(4), 703-12
- Reynolds R, Wilkin GP (1988): Development of macroglial cells in rat cerebellum. II. An in situ immunohistochemical study of oligodendroglial lineage from precursor to mature myelinating cell. *Development* 102(2), 409-25
- Ritchie JM (1982): On the relation between fibre diameter and conduction velocity in myelinated nerve fibres. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 217(1206), 29-35
- Roach A, Takahashi N, Pravtcheva D, Ruddle F, Hood L (1985): Chromosomal mapping of mouse myelin basic protein gene and structure and transcription of the partially deleted gene in shiverer mutant mice. *Cell* 42(1), 149-55
- Rohde G, Wenzel D, Haucke V (2002): A phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate binding site within mu2-adaptin regulates clathrin-mediated endocytosis. *J Cell Biol* 158(2), 209-14
- Rosenbluth J (1980): Central myelin in the mouse mutant shiverer. *J Comp Neurol* 194(3), 639-48
- Rothberg KG, Heuser JE, Donzell WC, Ying YS, Glenney JR, Anderson RG (1992): Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell* 68(4), 673-82
- Rushton WAH (1951): A theory of the effects of fibre size in medullated nerve. *J Physiol* 115, 101
- Sadler TW: Medizinische Embryologie, Die normale menschliche Entwicklung und ihre Fehlbildungen, 10. Auflage; Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2003
- Saher G, Brügger B, Lappe-Siefke C, Möbius W, Tozawa R, Wehr MC, Wieland F, Ishibashi S, Nave KA (2005): High cholesterol level is essential for myelin membrane growth. *Nat Neurosci* 8(4), 468-75
- Salzer JL (2003): Polarized domains of myelinated axons. *Neuron* 40(2), 297-318
- Salzer JL, Holmes WP, Colman DR (1987): The amino acid sequences of the myelin-associated glycoproteins: homology to the immunoglobulin gene superfamily. *J Cell Biol* 104(4), 957-65
- Schneider An, Länder H, Schulz G, Wolburg H, Nave KA, Schulz JB, Simons M (2005): Palmitoylation is a sorting determinant for transport to the myelin membrane. *J Cell Sci* 118(Pt 11), 2415-23

- Schneider Ar, Montague P, Griffiths I, Fanarraga M, Kennedy P, Brophy P, Nave KA (1992): Uncoupling of hypomyelination and glial cell death by a mutation in the proteolipid protein gene. *Nature* 358(6389), 758-61
- Schulte S, Stoffel W (1993): Ceramide UDPgalactosyltransferase from myelinating rat brain: purification, cloning, and expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(21), 10265-9
- Schwob VS, Clark HB, Agrawal D, Agrawal HC (1985): Electron microscopic immunocytochemical localization of myelin proteolipid protein and myelin basic protein to oligodendrocytes in rat brain during myelination. *J Neurochem* 45(2), 559-71
- Seiwa C, Kojima-Aikawa K, Matsumoto I, Asou H (2002): CNS myelogenesis in vitro: myelin basic protein deficient shiverer oligodendrocytes. *J Neurosci Res* 69(3), 305-17
- Severs NJ (1988): Caveolae: static in-pocketings of the plasma membrane, dynamic vesicles or plain artifact? *J Cell Sci* 90 (Pt 3), 341-8
- Sherman DL, Tait S, Melrose S, Johnson R, Zonta B, Court FA, Macklin WB, Meek S, Smith AJ, Cottrell DF, Brophy PJ (2005): Neurofascins are required to establish axonal domains for saltatory conduction. *Neuron* 48(5), 737-42
- Simons K, Fuller SD (1985): Cell surface polarity in epithelia. *Annu Rev Cell Biol* 1, 243-88
- Simons K, Ikonen E (1997): Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387(6633), 569-72
- Simons M, Trajkovic K (2006): Neuron-glia communication in the control of oligodendrocyte function and myelin biogenesis. *J Cell Sci* 119(Pt 21), 4381-9
- Simons M, Friedrichson T, Schulz JB, Pitto M, Masserini M, Kurzchalia TV (1999): Exogenous administration of gangliosides displaces GPI-anchored proteins from lipid microdomains in living cells. *Mol Biol Cell* 10(10), 3187-96
- Simons M, Krämer EM, Thiele C, Stoffel W, Trotter J (2000): Assembly of myelin by association of proteolipid protein with cholesterol- and galactosylceramide-rich membrane domains. *J Cell Biol* 151(1), 143-54
- Simons M, Kramer EM, Macchi P, Rathke-Hartlieb S, Trotter J, Nave KA, Schulz JB (2002): Overexpression of the myelin proteolipid protein leads to accumulation of cholesterol and proteolipid protein in endosomes/lysosomes: implications for Pelizaeus-Merzbacher disease. *J Cell Biol* 157(2), 327-36
- Sjöstrand FS (1949): An electron microscope study of the retinal rods of the guinea pig eye. *J Cell Physiol* 33(3), 383-403
- Skoff RP, Knapp PE (1990): Expression of the jimpy phenotype in relation to proteolipid protein appearance. *Ann N Y Acad Sci* 605, 122-34

- Solly SK, Thomas JL, Monge M, Demerens C, Lubetzki C, Gardinier MV, Matthieu JM, Zalc B (1996): Myelin/oligodendrocyte glycoprotein (MOG) expression is associated with myelin deposition. *Glia* 18(1), 39-48
- Spencer T, Domeniconi M, Cao Z, Filbin MT (2003): New roles for old proteins in adult CNS axonal regeneration. *Curr Opin Neurobiol* 13(1), 133-9
- Sperber BR, Boyle-Walsh EA, Engleka MJ, Gadue P, Peterson AC, Stein PL, Scherer SS, McMorris FA (2001): A unique role for Fyn in CNS myelination. *J Neurosci* 21(6), 2039-47
- Sprinkle TJ (1989): 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase, an oligodendrocyte-Schwann cell and myelin-associated enzyme of the nervous system. *Crit Rev Neurobiol* 4(3), 235-301
- Staugaitis SM, Smith PR, Colman DR (1990): Expression of myelin basic protein isoforms in nonglial cells. *J Cell Biol* 110(5), 1719-27
- Sternberger NH, Quarles RH, Itoyama Y, Webster HD (1979): Myelin-associated glycoprotein demonstrated immunocytochemically in myelin and myelin-forming cells of developing rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76(3), 1510-4
- Stevens B, Porta S, Haak LL, Gallo V, Fields RD (2002): Adenosine: a neuron-glia transmitter promoting myelination in the CNS in response to action potentials. *Neuron* 36(5), 855-68
- Stoffel W, Bosio A (1997): Myelin glycolipids and their functions. *Curr Opin Neurobiol* 7(5), 654-61
- Stoffel W, Hillen H, Schröder W, Deutzmann R (1983): The primary structure of bovine brain myelin lipophilin (proteolipid apoprotein). *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 364(10), 1255-66
- Sturrock RR, Smart IH (1980): A morphological study of the mouse subependymal layer from embryonic life to old age. *J Anat* 130(Pt 2), 391-415
- Tang S, Shen YJ, DeBellard ME, Mukhopadhyay G, Salzer JL, Crocker PR, Filbin MT (1997): Myelin-associated glycoprotein interacts with neurons via a sialic acid binding site at ARG118 and a distinct neurite inhibition site. *J Cell Biol* 138(6), 1355-66
- Thomson CE, Montague P, Jung M, Nave KA, Griffiths IR (1997): Phenotypic severity of murine Plp mutants reflects in vivo and in vitro variations in transport of PLP isoproteins. *Glia* 20(4), 322-32
- Thomson CE, Vouyiouklis DA, Barrie JA, Wease KN, Montague P (2005): Plp gene regulation in the developing murine optic nerve: correlation with oligodendroglial process alignment along the axons. *Dev Neurosci* 27(1), 27-36

- Trajkovic K, Dhaunchak AS, Goncalves JT, Wenzel D, Schneider A, Bunt G, Nave KA, Simons M (2006): Neuron to glia signaling triggers myelin membrane exocytosis from endosomal storage sites. *J Cell Biol* 172(6), 937-48
- Traka M, Goutebroze L, Denisenko N, Bessa M, Nifli A, Havaki S, Iwakura Y, Fukamauchi F, Watanabe K, Soliven B, Girault JA, Karagogeos D (2003): Association of TAG-1 with Caspr2 is essential for the molecular organization of juxtaparanodal regions of myelinated fibers. *J Cell Biol* 162(6), 1161-72
- Trapp BD (1990): Myelin-associated glycoprotein. Location and potential functions. *Ann N Y Acad Sci* 605, 29-43
- Trapp BD, Bernier L, Andrews SB, Colman DR (1988): Cellular and sub-cellular distribution of 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase and its mRNA in the rat central nervous system. *J Neurochem* 51(3), 859-68
- Trapp BD, Andrews SB, Cootauco C, Quarles R (1989): The myelin-associated glycoprotein is enriched in multivesicular bodies and periaxonal membranes of actively myelinating oligodendrocytes. *J Cell Biol* 109(5), 2417-26
- Trapp BD, Nishiyama A, Cheng D, Macklin W (1997): Differentiation and death of premyelinating oligodendrocytes in developing rodent brain. *J Cell Biol* 137(2), 459-68
- Trapp BD, Peterson J, Ransohoff RM, Rudick R, Mörk S, Bö L (1998): Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *N Engl J Med* 338(5), 278-85
- Trotter J, Bitter-Suermann D, Schachner M (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(4), 369-83
- Trotter JL, Damico CA, Cross AH, Pelfrey CM, Karr RW, Fu XT, McFarland HF (1997): HPRT mutant T-cell lines from multiple sclerosis patients recognize myelin proteolipid protein peptides. *Neuroimmunology* 75(1-2), 95-103
- Umemori H, Kadowaki Y, Hirosawa K, Yoshida Y, Hironaka K, Okano H, Yamamoto T (1999): Stimulation of myelin basic protein gene transcription by Fyn tyrosine kinase for myelination. *J Neurosci* 19(4), 1393-7
- Urbé S, Mills IG, Stenmark H, Kitamura N, Clague MJ (2000): Endosomal localization and receptor dynamics determine tyrosine phosphorylation of hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate. *Mol Cell Biol* 20(20), 7685-92
- Uschkureit T, Sporkel O, Stracke J, Bussow H, Stoffel W (2000): Early onset of axonal degeneration in double (plp^{-/-}mag^{-/-}) and hypomyelination in triple (plp^{-/-}mbp^{-/-}mag^{-/-}) mutant mice. *J Neurosci* 20(14), 5225-33

Varma R, Mayor S (1998): GPI-anchored proteins are organized in sub-micron domains at the cell surface. *Nature* 394(6695), 798-801

Virchow R (1854): Über das ausgebreitete Vorkommen einer dem Nervenmark analogen Substanz in den tierischen Geweben. *Virchows Arch Pathol Anat* 6, 562

Vogel US, Thompson RJ (1988): Molecular structure, localization, and possible functions of the myelin-associated enzyme 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase. *J Neurochem* 50(6), 1667-77

Von Bonsdorff CH, Fuller SD, Simons K (1985): Apical and basolateral endocytosis in Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells grown on nitrocellulose filters. *EMBO J* 4(11), 2781-92

Wang S, Sdrulla AD, diSibio G, Bush G, Nofziger D, Hicks C, Weinmaster G, Barres BA (1998): Notch receptor activation inhibits oligodendrocyte differentiation. *Neuron* 21(1), 63-75

Weimbs T, Stoffel W (1992): Proteolipid protein (PLP) of CNS myelin: positions of free, disulfide-bonded, and fatty acid thioester-linked cysteine residues and implications for the membrane topology of PLP. *Biochemistry* 31(49), 12289-96

Wight PA, Duchala CS, Readhead C, Macklin WB (1993): A myelin proteolipid protein-LacZ fusion protein is developmentally regulated and targeted to the myelin membrane in transgenic mice. *J Cell Biol* 123(2), 443-54