

**Aus dem Zentrum für Neurologie der Universität Tübingen
Abteilung Allgemeine Neurologie
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. J. Dichgans**

**Intrazellulärer Transport des Proteolipid Proteins
in Oligodendrozyten**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Hanna Ingeborg Länder
aus
Leonberg
2004**

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. B. Schulz

2. Berichterstatter: Professor Dr. F. Lang

ABKÜRZUNGEN	III
1 EINLEITUNG	1
1.1 Myelin	1
1.1.1 Aufbau und Bildung von Myelin	1
1.1.2 Funktion von Myelin	6
1.1.3 Zusammensetzung von Myelin	6
1.1.4 Das Proteolipid Protein (PLP)	9
1.1.5 Das Myelin Oligodendrozyten Glycoprotein (MOG)	13
1.2 Sortierung in polarisierten Zellen	14
1.2.1 Der Aufbau von Rafts	14
1.2.2 Rafts in Oligodendrozyten	16
1.3 Zielsetzung der Arbeit.....	18
2 MATERIAL UND METHODEN	19
2.1 Molekularbiologische Methoden.....	19
2.1.1 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	19
2.1.2 Restriktionsspaltung	20
2.1.3 Aufreinigung von DNA nach enzymatischer Reaktion	20
2.1.4 Auftrennung der DNA nach Grösse: Agarosegel-Elektrophorese	21
2.1.5 Extraktion von DNA aus Agarose	21
2.1.6 DNA-Aufreinigung: Chloroform/Phenolextraktion	22
2.1.7 „Fill up“	23
2.1.8 Dephosphorylierung	23
2.1.9 Ligation	23
2.1.10 Sequenzierung	24
2.2 Vervielfältigung und Isolierung von Plasmiden in E. coli.....	24
2.2.1 Kultur von Bakterien	24
2.2.2 Transformation von E.coli	25
2.2.3 Isolierung von Plasmiden aus E. coli: Qiagen Miniprep	26
2.2.4 Isolierung von Plasmiden aus E. coli: Qiagen Maxiprep	26
2.3 Klonierung der verwendeten Plasmide	28
2.4 Herstellung des rekombinanten SFV	30
2.5 Zellkultur	31
2.5.1 Zellen auftauen	32
2.5.2 Zellen passagieren	32
2.5.3 Zellen einfrieren	33
2.5.4 Transfektion von BHK-Zellen	33
2.5.5 Transfektion von Oli-neu-Zellen	33

2.6 Analyse von Proteinen.....	34
2.6.1 Immunfluoreszenz	34
2.6.2 Gewinnen von Zelllysat	37
2.6.3 CHAPS-Extraktion	37
2.6.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	37
2.6.5 Westernblot	39
2.6.6 Ko-Immunopräzipitation	40
2.7 Verwendete Puffer und Medien	41
2.8 Chemikalien und sonstige Verbrauchsmaterialien	43
2.9 Antikörper	44
3 ERGEBNISSE	45
3.1 Die Bedeutung der Palmitoylierung von PLP in seiner Protein-Lipid-Interaktion	45
3.1.1 Klonierung der PLP/DM20-Konstrukte	45
3.1.2 Expression der Konstrukte in BHK	47
3.1.3 Lokalisation der unterschiedlichen PLP-Mutanten in BHK-Zellen	48
3.1.4 CHAPS-Extraktion in Oli-neu-Zellen	50
3.2 Weitere Sortierungssignale.....	52
3.2.1 Dileucin-Signal in der Sortierung von PLP	52
3.3 Protein-Protein-Interaktionen in der Sortierung von PLP.....	54
3.3.1 MOG und PLP bilden spezifische Komplexe in Oligodendrozyten	54
3.3.2 PLP wird durch MOG in aktinreiche Membrandomänen sortiert	57
3.3.3 Mutationen in PLP behindern den Transport von MOG aus dem ER	60
4 DISKUSSION.....	62
4.1 Lipidmodifikation an PLP spielt keine Rolle für dessen Sortierung in „Myelinrafts“	62
4.2 MOG und PLP bilden Komplexe und beeinflussen sich gegenseitig in ihrer Lokalisation innerhalb der Zellen	64
5 ZUSAMMENFASSUNG.....	69
6 LITERATURVERZEICHNIS.....	70

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
bFGF	basic fibroblast growth factor
CGT	Ceramid-Galactosyl-Transferase
CMT1	Charcot-Marie-Tooth-Krankheit Typ 1
CNP	2´3´-zyklische Nukleotid-3´-Phosphodiesterase
CNTF	ciliary neurotrophic factor
Cys	Zystein
DRM	Detergens-unlösliche Glycospphingolipid-reiche Komplexe
DM20	alternativ gespleißte Isoform des Proteolipid Protein
DMEM	Dulbecco´s modifiziertes Eagle Grundmedium
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
GPI	Glycosyl-Phosphatidylinositol
Ig	Immunglobulin
IGF-1	Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor
IP	Immunpräzipitation
IPL	Intraperiod Line
kD	Kilodalton
MAG	Myelin-assoziiertes Glycoprotein
MBP	Myelin basisches Protein
MDL	major dense line
MOG	Myelin Oligodendrozyten Glycoprotein
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
NCAM	Neurales Zelladhäsionsmolekül
NT3	Neurotrophin-3
OMgp	Oligodendrozyten-Myelin Glycoprotein
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PBST	Phosphat-gepufferte Salzlösung mit Tween20
PCR	Poly-chain-reaction
PDGF	Thrombozytenwachstumsfaktor (Platelet derived growth

Abkürzungen

	factor)
PLL	Poly-L-Lysin
PLP	Proteolipid Protein
PMD	Pelizäus-Merzbacher-Krankheit
PNS	peripheres Nervensystem
rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese
SPG2	Spastische Paraplegie Typ2
srPLP	Somal-restricted Proteolipid Protein
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TGF β	Transformierender Wachstumsfaktor β
TX100	TritonX100
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

Myelin isoliert elektrisch Nervenaxone in regelmäßigen Abständen und ermöglicht diesen, ihre Signalweiterleitung platz- und energiesparend zu beschleunigen. Schwerwiegende Krankheiten sind die Folge, wenn die Funktion des Myelins beeinträchtigt ist. Ein bekanntes Beispiel dafür ist die Multiple Sklerose, bei der das Myelin des zentralen Nervensystems (ZNS) durch eine autoimmunbedingte Entzündung abgebaut wird. Symptome der Krankheit sind Sensibilitätsausfälle, Paresen, Störung des Sehens und andere Ausfälle, je nach Lokalisation der entzündlichen Läsion im ZNS. Die Axone werden nach der akuten Entzündung häufig nur unzureichend remyelinisiert und sind somit dauerhaft in ihrer Funktion eingeschränkt. Es wird intensiv an den molekularen Prozessen der Myelinisierung geforscht, um daraus eventuelle Therapiekonzepte abzuleiten. Obwohl die Struktur und Zusammensetzung von Myelin schon seit langem bekannt ist, weiß man immer noch wenig über die molekularen Mechanismen der Myelinbildung.

Thema der vorliegenden Arbeit sind Protein-Protein- und Protein-Lipidinteraktionen des Proteolipidproteins (PLP) und deren mögliche Rolle in der Sortierung von Myelin. PLP ist eines der Myelinhauptproteine im ZNS.

In den folgenden Kapiteln wird mit einer kurzen Darstellung über Myelin, Oligodendrozyten und Zellsortierungsmechanismen in polarisierten Zellen in die Thematik eingeführt, um anschließend auf die konkreten Fragestellungen dieser Forschungsarbeit einzugehen.

1.1 Myelin

1.1.1 Aufbau und Bildung von Myelin

Myelin ist eine spezialisierte Subdomäne der Plasmamembran von myelinbildenden Zellen (Übersicht in Lemke, 1992; Nave und Suter, 1997). Die Myelinmembranfortsätze sind dabei in bis zu 50 Schichten um jeweils ein Axonsegment gewunden, das eine Länge von bis zu einem Millimeter haben kann. Myelin wird von Oligodendrozyten im ZNS und von Schwann-Zellen im peripheren

Nervensystem (PNS) gebildet. Im Gegensatz zu Schwannzellen, die jeweils nur ein Axonsegment myelinisieren, kann ein Oligodendrozyt bis zu 50 Axonsegmente umhüllen. Obwohl Oligodendrozyten und Schwannzellen morphologisch und entwicklungsgeschichtlich unterschiedliche Zellen sind, ist die Struktur und Zusammensetzung des peripheren und zentralen Myelins sehr ähnlich. Im elektronenmikroskopischen Querschnitt stellt sich die Struktur der Membranschichten in alternierenden elektronendichten Linien dar. Man unterscheidet hierbei die dichtere, so genannte „Major dense line“, die den Zellinnenseiten der gegenüberliegenden Membranschichten mit Zytoplasma entspricht und die „Intraperiod line“, welche die Zellaußenseiten der Membranen darstellt. Diese typische Ultrastruktur entsteht nach dem Entfernen des Zytoplasmas aus dem Myelin – der Kompaktierung. Nur in der innersten und äußersten Lamelle, sowie in den direkt an die Schnürringe grenzenden Paranodien bleiben nicht-kompaktierte, zytoplasmatische Bereiche erhalten. Dadurch kommt es zur Kompartimentierung des Myelins in Subdomänen: kompaktes Myelin, inneres Mesaxon, äußeres Mesaxon und Paranodien (Übersicht in Raine, 1984). In den unterschiedlichen Subdomänen sind unterschiedliche Proteine angereichert (Arroyo und Scherer, 2000).

Auch das ausgereifte Myelin steht noch in ständigem metabolischen Austausch mit dem Perikaryon, so dass Myelin als eine besondere Form von Zellorganelle betrachtet werden kann (Lemke, 1992).

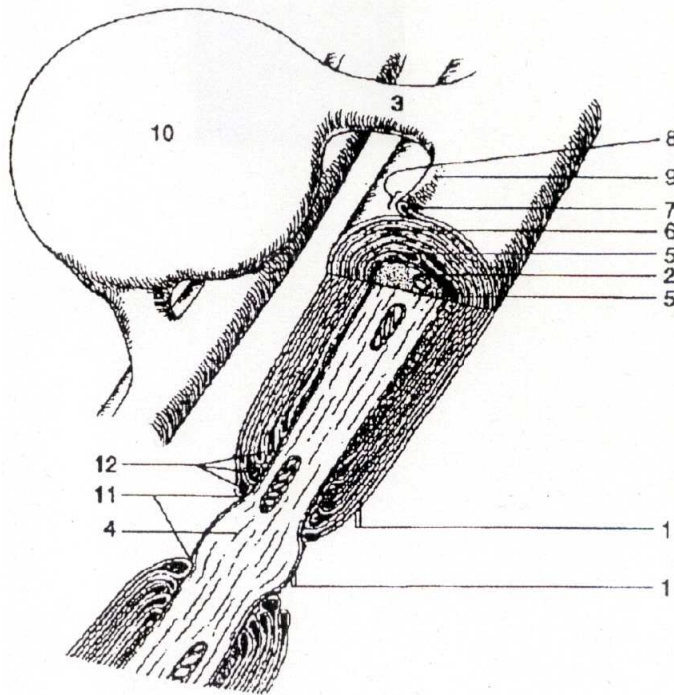


Abb. 1.1: Schematische Darstellung eines myelinisierenden Oligodendrozyten.

Oligodendrozyten wickeln ihre Plasmamembran um das Axon und bilden so die multilamellare Myelinscheide aus. Myelinisierte Abschnitte im Wechsel mit myelinfreien Abschnitten bilden die Grundlage der saltatorischen Erregungsleitung. Kompaktierte und nicht-kompaktierte Bereiche mit Resten von Zytoplasma unterteilen die Myelinschicht in verschiedene Subdomänen.

1: Plasmamembran, 2: inneres Mesaxon, 3: Oligodendrozyten-Fortsatz, 4: Axon, 5,6: Reste von Zytoplasma, 7-9: äußeres Mesaxon, 10: Perikaryon, 11: Ranvier'scher Schnürring, 12: Paranodien

(Modifiziert nach Wood und Bunge, 1984).

Die Myelinisierung findet in den ersten Lebenswochen statt. Oligodendrozytenvorläuferzellen wandern aus der Subventrikulärzone des Neuralrohrs aus in die Regionen der späteren weißen Substanz, um zu differenzieren und Axone zu myelinisieren. Dabei entsteht ein großer Überschuss an Oligodendrozytenvorläuferzellen, der später an die Zahl der Axonsegmente durch ein Wechselspiel zwischen Proliferation und Apoptose angeglichen wird. Die Vorläuferzellen konkurrieren um von Astrozyten und Neuronen freigesetzte limitierte Wachstums- und Überlebensfaktoren. Besondere Bedeutung haben dabei der „ciliary neurotrophic factor“ (CNTF), Neurotrophin-3 (NT-3) und „Insulin like growth factor 1“ (IGF-1) (Übersicht in Price, 1994). Sie verhindern die Apoptose von jungen Oligodendrozyten. In Anwesenheit von „platelet derived growth factor“ (PDGF)

differenzieren Oligodendrozytenvorläuferzellen *in vitro* nach einer unbestimmten Anzahl an Zellzyklen, ähnlich dem Zeitverlauf ihrer *in vivo* Entwicklung (Temple und Raff, 1986; Raff et al., 1988). PDGF und basic fibroblast growth factor (bFGF) zusammen verhindern jedoch die Differenzierung vollständig und die Vorläuferzellen bleiben in der Proliferationsphase (Bögler et al., 1990). Außerdem spielen weitere Faktoren (z. B. Thyroxin, Trijodthyronin, Glucocorticoide, Retinolsäure und TGF β – McKinnon et al., 1993; Barres et al., 1994), der Zellkontakt mit Axonen und deren elektrische Aktivität eine Rolle in der Entwicklung von Oligodendrozyten (Chen und DeVries, 1989; Nordlund et al., 1992). Die meisten Erkenntnisse über die Differenzierung von Oligodendrozyten wurden an *in vitro*-Zellkultursystemen erlangt. Dabei teilt man die Differenzierung von Oligodendrozyten in fünf Stadien ein, die durch die Expression bestimmter gliaspezifischer Oberflächenantigene charakterisiert sind (Übersicht in Pfeiffer et al., 1993). Die zuletzt exprimierten Antigene des „reifen Oligodendrozyten“ sind zumindest teilweise identisch mit den Strukturproteinen im Myelin. Diese Differenzierung findet in Abwesenheit von Neuronen statt, obwohl diese modulierend auf die Entwicklung von Oligodendrozyten wirken (Macklin et al., 1986; Kidd et al., 1990; Barres und Raff, 1993). Die Erkenntnisse aus der Zellkultur von Oligodendrozyten scheinen auch repräsentativ für die *in vivo*-Entwicklung der Zellen zu sein. Im Gehirn wurden mit den 5 Stadien phänotypisch identische Vorläuferzellen und intermediäre Reifestadien identifiziert (Warrington und Pfeiffer, 1992). Außerdem sind transplantierte Oligodendrozytenvorläuferzellen, die lange Zeit *in vitro* kultiviert wurden, in der Lage, morphologisch normales Myelin zu bilden (Übersicht in Franklin and Blakemore, 1995).

Die Myelinisierung des ZNS erfolgt in einer geordneten Reihenfolge: Bei Nagetieren beginnt die Myelinisierung etwa zwei Tage nach Geburt zuerst im Rückenmark und expandiert rostro-caudal. Sie setzt sich dann zwischen den Tagen 10 bis 21 rostral bis zum Telencephalon fort und dauert insgesamt etwa 16 Wochen (Jacobson, 1963; Waxmann und Sims, 1984; Übersicht in Jacobson, 1991).

Zu Beginn des Myelinisierungsprozesses nehmen die Oligodendrozytenfortsätze engen Zellkontakt zu Axonen auf und beginnen, diese zu umwinden. Nach

mehreren Umhüllungen wird das Zytoplasma verdrängt und die Membranstapel werden kompaktiert (Wood und Bunge, 1984). Dabei entsteht die typische Ultrastruktur der Myelinscheide. Schmale zytoplasmatische Kanäle bleiben jedoch für den metabolischen Austausch zwischen Zelle und Myelin erhalten (Sternberger et al., 1979).

Untersuchungen über die zellulären Mechanismen der Axonumwindung wurden hauptsächlich an Schwannzellen durchgeführt, besitzen aber auch für Oligodendrozyten Gültigkeit. Zurzeit geht man davon aus, dass die Zellen durch schnelle Membransynthese eine erste Schicht Membran um das Axon legen. Nach der ersten Umwindung muss die Wachstumspitze unter die erste Schicht untertauchen, was nur durch exakt lokalisierte Zelladhäsionsmoleküle möglich ist. Die weiteren Umwindungen werden durch Verdrängung der direkt im Kontakt mit dem Axon stehenden Membran gebildet. Die Vorwärtsbewegung erfolgt somit nicht am Ansatz des Myelinkompartiments, sondern an der vordersten Spitze der innersten Myelinschicht (Bunge et al., 1989; Übersicht in Lemke, 1992). Der Einbau der Membranvesikel findet wahrscheinlich nicht innerhalb des Myelins statt, sondern an der Wurzel des Fortsatzes in der Nähe des Zellkörpers (Lemke, 1992).

Die dritte postnatale Woche ist (bei Nagetieren) die aktivste Zeit der Myelinisierung im Gehirn. Dabei vollbringen Oligodendrozyten eine gewaltige Membransyntheseleistung. Sie bilden in dieser Zeit täglich etwa die dreifache Menge Myelin ihres eigenen Zellkörpergewichtes (Wood and Bunge, 1984). Die Protein- und Lipidsynthese muss dazu genau reguliert und aufeinander abgestimmt sein. Die Myelinbestandteile müssen an die richtige Stelle in der Zelle gebracht werden, um die unterschiedlichen Kompartimente aufzubauen und zu erhalten. Dazu benötigen sie einen Apparat zur Sortierung der Myelinkomponenten und zum Transport der Membranvesikel an ihren Bestimmungsort. Das Zytoskelett der Oligodendrozyten spielt bei der Sortierung, dem Transport und Aufbau der Myelinarchitektur wahrscheinlich eine entscheidende Rolle (Pfeiffer et al., 1993; Brophy et al., 1994; Richter-Landsberg, 2000).

1.1.2 Funktion von Myelin

Die wesentliche Funktion des Myelins besteht in der Isolation von einzelnen Axonen. Die Myelinscheide ist nicht durchgängig um das Axon gewunden, sondern lässt in regelmäßigen Abständen kleine Lücken frei – die Ranvier-Schnürringe. In diesen Regionen liegt eine große Anzahl an spannungsgesteuerten Natrium- und Kaliumkanälen vor. Im Gegensatz dazu ist die Konzentration dieser Kanäle in den myelinisierten Abschnitten, den Internodien, gering. (Peles und Salzer, 2000). Dies hat zu Folge, dass ein Aktionspotential nicht kontinuierlich am Axon entlang weiter geleitet wird, sondern von Schnürring zu Schnürring „springt“. Dieses Phänomen bezeichnet man als saltatorische Erregungsleitung, welche Grundlage für die Beschleunigung der Informationsübertragung ist. Ein nicht myelinisiertes Axon benötigt für die gleiche Weiterleitungsgeschwindigkeit den zehnfachen Durchmesser eines myelinisierten Axons. Für die Entwicklung des komplexen aber dennoch kompakten Nervensystems ist der durch das Myelin erzeugte Raumgewinn für Vertebraten essentiell (Lemke, 1992).

Ein weiterer Vorteil der Myelinisierung ist, dass der Gesamtionenfluss über den axonalen Membranen herabgesetzt und damit das extrazelluläre Ionenmilieu stabilisiert wird. Dies erklärt, weshalb es bei vielen dysmyelinisierenden Erkrankungen häufig zu zerebralen Krampfanfällen kommt. Man nimmt an, dass durch die erhöhten Ionenströme über die pathologisch myelinisierten Axonmembranen die extrazelluläre Kaliumkonzentration so weit steigt, dass diese auf die Neuronen depolarisierend wirken (Nave und Suter, 1997).

1.1.3 Zusammensetzung von Myelin

Die biochemische Zusammensetzung der Myelinmembran unterscheidet sich von anderen biologischen Membranen (Übersichten in Norton und Cammer, 1984; Morell et al., 1994):

Der Lipidanteil im Myelin ist mit 70 - 80 % (Trockengewicht) besonders hoch. Die meisten anderen Plasmamembranen bestehen nur zu etwa 35 - 40 % (im Trockengewicht) aus Lipiden.

Außerdem unterscheidet sich die Lipidzusammensetzung der Myelinmembran zu der von den meisten anderen Membranen. Angereichert sind vor allem Sphingolipide, wovon Galactocerebroside und Galactosulfocerebroside (= Sulfatid) einen sehr hohen Anteil haben. Außerdem ist der Anteil von Cholesterin in der Myelinmembran besonders hoch. Im Gegensatz dazu sind Glycerophospholipiden, z. B. Phosphatidylcholin in den meisten Membranen stärker vertreten (Pfeiffer et al. 1993; Stoffel und Bosio, 1997).

Die Lipide sind wie in allen Biomembranen asymmetrisch verteilt: Glycolipide sind in der exoplasmischen Membranhälfte, während Phosphatidylethanolamin und Plasmalogene in der zytoplasmischen Membranhälfte lokalisiert sind.

Eine weitere Besonderheit der Myelinlipide sind die an die Cerebroside gebundenen Acylketten, die lang (häufig 23 Kohlenstoffatome) und meist gesättigt sind (Übersicht in Agranoff und Hajra, 1994).

Aufgrund des hohen Lipidanteils ist der Proteinanteil im Myelin relativ gering. Deshalb besitzt das reife Myelin im Gegensatz zur oligodendroglialen Plasmamembran nur ein beschränktes Repertoire an charakteristischen Proteinen (Übersichten in Braun, 1984; Lees und Bostroff, 1984; Morell et al., 1994; Campagnoni, 1995).

85 % aller Myelinproteine im ZNS bestehen aus Myelin Basic Protein (MBP, ~35 % aller Myelinproteine) und Proteolipid Protein/DM 20 (PLP, ~50 % aller Myelinproteine). Beide sind im kompakten Myelin lokalisiert (Brunner et al., 1989; Griffiths et al., 1998b). MBP ist ein zytoplasmatisches, membranassoziiertes Protein, das in mindestens fünf Spleißvarianten vorkommt. Das Molekulargewicht liegt zwischen 14 und 21 kD. Es wird vermutet, dass es an der Kompaktierung der Major-dense-line beteiligt ist.

2`3`-cyclic nucleotide 3`phosphohydrolase (CNP) stellt ca. 4 % der Myelinproteine und ist ein basisches Protein, das in der zytoplasmatischen Seite der Membran lokalisiert. Es kommt in zwei Isoformen von 46 und 50 kD vor. Man findet CNP hauptsächlich in nicht kompaktierten Bereichen des Myelins (Trapp et al., 1988; Braun et al., 1988). Weiterhin sind andere Enzymaktivitäten im Myelin lokalisiert, unter anderem proteolytische Aktivitäten, Kinasen, Phosphatasen

und Enzyme, die den Metabolismus von Strukturlipiden steuern (Morell et al., 1994).

Myelin-assoziiertes Glykoprotein (MAG) (Salzer et al., 1987), Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein (MOG) (Linnington et al., 1984), Oligodendrozyten-Myelin Glycoprotein (OMgp) (Mikol und Stefansson, 1988) und die 120 kD Isoform von NCAM (Bhat und Silberberg, 1986; Trotter et al., 1989) sind Mitglieder der Ig-Superfamilie und kommen in relativ kleinen Mengen (ca. 1-5 % des Myelinproteins) im Myelin vor.

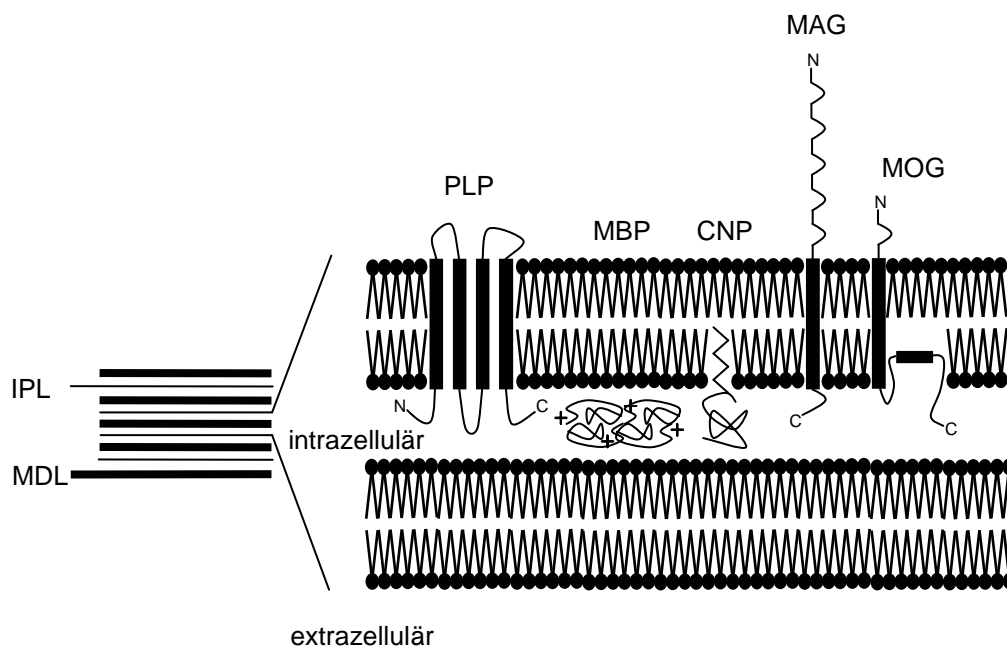


Abb.1.2: Schematische Darstellung der Membrantopologie von Myelin

Im linken Teil der Abbildung ist die charakteristische Ultrastruktur der Myelinmembran schematisch dargestellt. Durch Kompaktierung der extrazellulären Membranoberflächen entsteht die „Intraperiod Line“ (IPL), durch Kompaktierung der intrazellulären Membranoberflächen entsteht die „Major Dense Line“ (MDL). Die hypothetische Membrantopologie der wichtigsten Myelinproteine ist im rechten Teil der Abbildung wiedergegeben. PLP: Proteolipid Protein; MBP: Myelin Basischen Protein; CNP: 2´3´-zyklische Nukleotid-3´-Phosphodiesterase; MAG: Myelin-assoziiertes Glycoprotein; MOG: Myelin Oligodendrozyten Glycoprotein (modifiziert nach Pfeiffer et al., 1993).

1.1.4 Das Proteolipid Protein (PLP)

Das Proteolipid Protein, das zusammen mit seiner Isoform DM20 mehr als 50% der ZNS- Myelinproteine ausmacht, ist ein hydrophobes Protein, welches aus vier Transmembrandomänen besteht (Popot et al., 1991). Sowohl das N- als auch das C-terminale Ende befinden sich auf der zytoplasmatischen Seite (Weimbs und Stoffel, 1992). Im Endoplasmatischen Retikulum gebildet und in die Membran integriert wird es über den Golgi-Apparat in Vesikeln an die Zelloberfläche transportiert (Coleman et al., 1982; Nussbaum und Roussel, 1983; Schwob et al., 1985; Roussel et al., 1987). Auf dem Transportweg zur Plasmamembran werden über Thioesterbindung insgesamt sechs Palmitoyle Säuren an Zysteine kovalent gebunden (Weimbs und Stoffel, 1992). Dies hat zur Folge, dass der lipophile Charakter des Proteins zunimmt. PLP/DM20 findet man hauptsächlich in Oligodendrozyten, in kleinen Mengen wurde es aber auch in Schwann-Zellen und anderen Geweben (z. B. Herzmuskelzellen und Thymus) nachgewiesen (Puckett et al., 1987; Campagnoni et al., 1992; Pribyl et al., 1996).

Das PLP/DM20-Gen ist auf dem langen Arm des X-Chromosoms lokalisiert (Xq21.2.-23) (Willard und Riordan, 1985). Dem alternativ gesplicten DM20 fehlt intrazytoplasmatisch ein Teil (Aminosäure 116 bis 150), ist aber ansonsten mit PLP identisch (Nave et al., 1987). PLP und DM20 haben ein Molekulargewicht von 26 bzw. 20 kD. Das erst vor kurzem entdeckte, weniger stark exprimierte „somal-restricted“ PLP (srPLP) zeichnet sich durch 12 weitere Aminosäuren N-terminal aus und bleibt hauptsächlich um den Zellkern (Bongarzone et al., 1999 und 2001). Möglicherweise ist die sich vom gewöhnlichen PLP unterscheidende Lokalisierung durch die Maskierung eines Sortierungssignals zu erklären. In der Tat scheint neben diesen 12 Aminosäuren eine Sortierungssequenz lokalisiert zu sein. Direkt am N-Terminus befinden sich 13 Aminosäuren, die, wenn sie an ein LacZ-Protein gekoppelt werden, die Sortierung ins Myelin bewirken (Whight et al., 1993).

PLP wird nur in myelinisierenden Zellen exprimiert und kann in primären Oligodendrozytenkulturen bereits nach wenigen Tagen in vitro nachgewiesen werden

(Gow et al., 1994a; Jung et al., 1996; Thomson et al., 1997; Simons et al., 2002).

Wenig ist über die genaue Funktion von PLP bekannt, allerdings gibt es Hinweise, dass PLP eine Rolle bei der Formation der „Intra period line“ (IPL) spielt und für die Stabilität der Myelinscheide mit verantwortlich ist (Übersicht in Griffiths et al., 1998b). So zeigte sich, dass PLP-„knock-out“-Mäuse Myelin mit reduzierter Stabilität bilden. Inzwischen werden PLP, abgesehen von seinen Eigenschaften als Strukturprotein, noch weitere Funktionen zugeschrieben. So wird z. B. berichtet, dass PLP an der Interaktion zwischen Axon und Oligodendrozyt beteiligt ist (Yool et al., 2001). Eine verstärkte Expression von PLP/DM20 scheint dagegen das Überleben von Zellen zu beeinträchtigen (Yang und Skoff, 1997; Boucher et al., 2000; Campagnoni et al., 2001).

Beim Menschen werden zwei Krankheiten durch Mutationen, Deletionen oder Duplikationen von PLP ausgelöst: die x-chromosomal-rezessive Leukodystrophie Pelizaeus-Merzbacher-Krankheit (PMD) und die Spastische Paraplegie Typ 2 (SPG2; Koeppen et al., 1987; Saugier-veber et al., 1994). In mehr als 50% aller Fälle ist eine Duplikation die Ursache der Krankheiten und damit wesentlich häufiger als Mutationen oder Deletionen (Hodes and Dlouhy, 1996; Sijm et al., 1998).

Das klinische Bild von PMD und SPG ist sehr variabel. Es gibt leichte Verläufe, die erst im Jugendalter beginnen, aber auch solche, die schon in früher Kindheit zum Tod führen. Für die von F. Pelizaeus 1885 und L. Merzbacher 1910 zum ersten Mal beschriebene PMD setzte sich eine Klassifikation durch. Danach wird eine klassische Form (Typ 1; Krankheitsbeginn in den ersten Lebensjahren) von einer schweren konnatalen Form (Typ 2; Krankheitsbeginn bald nach der Geburt) unterschieden. PMD äußert sich durch Nystagmus, epileptische Krampfanfälle, Beeinträchtigung der Motorik, Muskelhypotonie, Myoklonien, Tremor, Ataxie und geistige Retardierung. Diese Symptome werden durch eine Dysmyelinisierung im ZNS ausgelöst. Das PNS ist nicht betroffen, weil es fast

kein PLP/DM20 besitzt. Insgesamt verläuft PMD progredient. Die Lebenserwartung reicht von unter zwei Jahren bis ins höhere Erwachsenenalter.

Die Spastische Paraplegie ist die leichtere Form der beiden Krankheiten mit einem späteren Beginn und einer langsameren Progredienz.

Neben dem klinischen Bild geben verzögerte sensorisch evozierte Potentiale bei normaler peripherer Leitungsgeschwindigkeit und Zeichen der Dysmyelinisierung im Kernspin Hinweise auf PMD/SPG2 (Nezu et al., 1998; Barkovich 2000). Gesichert wird die Diagnose durch molekulargenetische Untersuchungen (FISH und PCR). Jedoch schließt ein negatives Ergebnis dieser Untersuchungen PMD/SPG2 nicht aus (Übersichten in Nave und Suter, 1997; Gabern et al., 1999; Yool et al., 2000; Campagnoni und Skoff, 2001; Koeppen und Robitaille, 2002).

Die Pathomechanismen von PMD/SPG2 sind ausführlich anhand unterschiedlicher Mausmodelle untersucht worden (Werner et al., 1998). Zwei Beispiele für Mutationen sind die *Jimpy^{msd}*-Maus und die Rumpshaker-Maus. Außerdem existieren sowohl PLP-transgene Mäuse als auch PLP-knock-out-Mäuse.

Ursache der *Jimpy^{msd}*-Maus ist eine Mutation an Position 242 (Alanin zu Valin). Aufgrund starker Dysmyelinisierung und Oligodendrozytenzelltod sterben die Mäuse früh (Gencic und Hudson, 1990). Nur etwa 5% der Axone dieser Mäuse sind myelinisiert. Das noch vorhandene Myelin ist dünn und zeigt ultrastrukturelle Defekte. Eine *Jimpy^{msd}*-Mutation löst beim Menschen eine konnatale Form der PMD aus (Yamamoto et al., 1998).

Auch die Rumpshaker-Maus wird durch eine Mutation ausgelöst (Position 186: Isoleucin wird durch Threonin ersetzt). Die betroffenen Mäuse leben länger als *Jimpy^{msd}*-Mäuse. Die Myelinisierung ist jedoch auch hier nicht vollständig, dennoch überleben mehr Oligodendrozyten (Griffiths et al., 1990). Beim Menschen zeigt sich die RSH-Mutation als SPG2 (Schneider et al., 1992; Kobayashi et al., 1994).

Die Pathophysiologie der Punktmutationen wird dadurch erklärt, dass das PLP/DM20 nach seiner Synthese nicht korrekt gefaltet wird. Ein, je nach Mutation, unterschiedlich großer Anteil dieser Proteine akkumuliert im ER und führt zur Apoptose der Oligodendrozyten (Gow et al., 1994b; Jung et al., 1996; Gow

et al., 1998). Die Schwere des klinischen Bildes hängt von dem Ausmaß der Beeinträchtigung des Transportes von PLP/DM20 aus dem ER ab (Gow et al., 1996; Thomson et al., 1997). Der genetische Hintergrund wirkt sich zusätzlich auf die Ausprägung der Symptomatik aus (Werner et al., 1998).

In den letzten Jahren wurden transgene Mäuse mit unterschiedlicher Anzahl an PLP-Genen hergestellt. Es zeigte sich, dass eine höhere Gendosis zu einer stärkeren Beeinträchtigung der Maus führt (Readhead et al., 1994; Kagawa et al., 1994). Ebenso wie Mutationen führen auch Duplikationen zur Apoptose der Oligodendrozyten bald nach der Geburt. Zusätzlich entwickeln die betroffenen Tiere eine Axondegeneration (Anderson et al., 1998).

Eine Erklärung des Pathomechanismus der Duplikation ist die Umsortierung von Myelinkomponenten: Ein Teil von PLP scheint sich mit Myelinlipiden in Lysosomen und späten Endosomen anzuhäufen (Simons et al., 2002). Dies könnte zu vermehrtem Zellstress und nachfolgend zu Apoptose führen. Duplikationen führen beim Menschen v. a. zur klassischen Form der PMD (Ellis und Malcolm, 1994).

Während PLP-Duplikation und Mutationen zu ausgeprägten Krankheitsbildern führen, zeigt die PLP-knock-out-Maus erstaunlicherweise zunächst keine klinischen Auffälligkeiten. Erst später entwickeln die Tiere eine Axondegeneration (Boison und Stoffel, 1994; Klugmann et al., 1997; Griffiths et al., 1998a).

Auf ultrastruktureller Ebene zeigt deren Myelin geringe Abweichungen gegenüber dem normalen Myelin. Die IPL scheint dichter und instabil zu sein. Darüber hinaus ist das Myelin physikalisch weniger stabil und/oder besitzt eine höhere Dichte als Myelin gesunder Tiere (Jurevics et al. 2003).

Beim Menschen entspricht die PLP-Nullmutation einer Spastischen Paraplegie oder einer leichten Form von PMD (Sistermans et al., 1996). Die betroffenen Patienten entwickeln ebenfalls eine periphere Neuropathie (Gabern et al., 1997).

Zusammenfassend zeigen die Mausmodelle, dass leichte Formen der PMD/SPG2 durch einen Verlust von PLP erklärt werden können, während die schweren Verläufe auf Mutationen oder Duplikation zurückzuführen sind.

Das bedeutet, dass die Dysmyelinisierung vor allem auf einer „Gain of toxic function“-Mutation des mutierten/ überexprimierten PLPs beruht, und nicht auf einem Verlust seiner Funktion („loss of function“-Mutation).

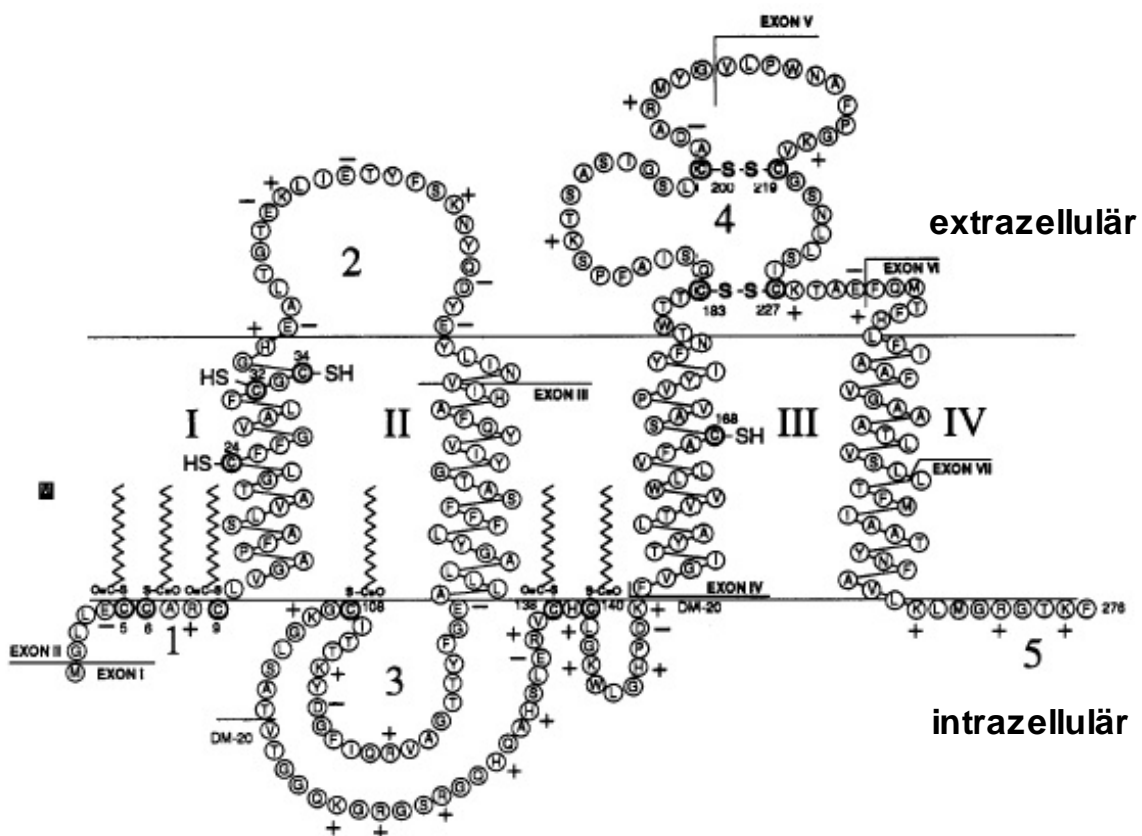


Abb.1.3: Schematische Darstellung der Struktur von PLP

PLP verfügt über vier Transmembrandomänen, zwei extrazellulären und einem intrazellulären Anteil. Das N- und C-terminale Ende befindet sich in der Zelle. Die Zysteine an Position 5,6,9,108,138 und 140 sind palmitoyliert. Im intrazellulären Anteil fehlen DM20 die Aminosäuren von 116 bis 150 (modifiziert nach Weimbs und Stoffel, 1992).

1.1.5 Das Myelin Oligodendrozyten Glycoprotein (MOG)

Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein (MOG) ist mit einem Anteil von 0,05 - 0,1 % (am Gesamtmyelinprotein) nur in geringen Mengen im Myelin vorhanden (Lington et al., 1984). MOG ist ein Typ I-Membranprotein mit einem N-Terminus, der in den Extrazellulärraum reicht und einem C-Terminus, der zytoplasmatisch

lokalisiert ist (Kröpfl et al., 1996). Es wird angenommen, dass das C-terminale Ende eine Schleife bildet und direkt mit der Membran assoziiert. MOG hat ein Molekulargewicht von 28 kDa, liegt jedoch in den Zellen als Dimer vor und wird deshalb in der Gelelektrophorese auch als eine 55 kDa-Bande vorgefunden (Abo et al., 1993; Slavin et al., 1997). Genau wie PLP ist MOG ein Myelin-spezifisches Protein, das im ZNS nur in Oligodendrozyten exprimiert wird. Im Myelin ist es vor allem in den äußeren Windungen des Myelins lokalisiert (Brunner et al., 1989). MOG wird erst ein bis zwei Tage nach den anderen Myelinproteinen exprimiert und dient als Marker für reife Oligodendrozyten (Scolding et al., 1989; Solly., 1996). Die Funktion des Proteins ist noch völlig unklar. Da es von seiner Struktur zu der Ig-Superfamilie gehört, nimmt man an, dass es vor allem als Adhaesionsprotein fungiert (Gardinier et al., 1992). Gut etabliert ist dagegen die Rolle von MOG als Auto-Antigen bei demyelinisierenden Erkrankungen (Übersicht in Johns und Bernard, 1999).

1.2 Sortierung in polarisierten Zellen

Genau wie Nerven- und Epithelzellen sind Oligodendrozyten in abgrenzbare Membrandomänen polarisiert. Da Myelin eine charakteristische Protein- und Lipidzusammensetzung hat, sind spezifische Sortierungsmechanismen notwendig, um Myelin von der übrigen Oligodendrozytenmembran zu trennen (Krämer et al., 1997; Kim und Pfeiffer, 1999; Simons et al., 2000; Kröpfl und Gardinier, 2001b; Krämer et al., 2001).

1.2.1 Der Aufbau von Rafts

Die molekularen Mechanismen des polarisierten Membrantransports sind am besten in Epithelzellen untersucht. In Epithelzellen unterscheidet man eine apikale und eine basolaterale Membran, die durch Zonulae occludentes („Tight-junktions“) voneinander getrennt sind. Nicht nur die Protein-, sondern auch die Lipidzusammensetzung sind in beiden Membrandomänen unterschiedlich. In der apikalen Membran sind Glycosphingolipide angereichert, während in der basolateralen Membran Glycerophospholipide dominieren (Simons und van

Meer, 1988). Da Myelin und die apikale Membran eine ähnliche Lipidzusammensetzung haben, geht man davon aus, dass Oligodendrozyten und Epithelzellen analoge Sortierungsmechanismen verwenden (Krämer et al., 1997; Kim und Pfeiffer, 1999; Simons et al., 2000; Kröpfl und Gardinier, 2001b; Krämer et al., 2001).

In Epithelzellen werden Proteine, die für die apikale oder basolaterale Membran bestimmt sind, im Trans-Golgi-Apparat sortiert, in Vesikel verpackt und an die jeweilige Zelloberfläche transportiert. Die Zuordnung zu den richtigen Vesikeln erfolgt durch unterschiedliche Mechanismen. Für die basolaterale Sortierung sind Signale innerhalb der zytoplasmatischen Domäne des Proteins entscheidend, die durch spezifische Protein-Protein-Interaktionen in die entsprechenden Vesikel verpackt werden (Mellman, 1996). Bekannte Motive sind zum Beispiel ein Dileucin-Signal oder ein Thyrosinrest, die von hydrophoben Aminosäuren umgeben sind (Keller und Simons, 1997; Bonifacino und Dell'Angelica, 1999).

Für die apikale Sortierung sind Protein-Lipid-Interaktionen und Lipid-Lipid-Interaktionen verantwortlich (Rodriguez-Boulan und Zurzolo, 1993; Simons und Ikonen, 1997; Brown und London, 1998). Proteine, die für die apikale Membran bestimmt sind, assoziieren im Golgi-Apparat mit Membranmikrodomänen, so genannten Lipid-Rafts. Rafts sind bewegliche, kleine, dicht gepackte Mikrodomänen, die eine Größe von etwa 50 nm haben und vor allem aus Glycosphingolipiden und Cholesterin bestehen. Glycosphingolipide haben einen höheren Schmelzpunkt (60 - 80°C) als Glycerophospholipide, die vor allem aus ungesättigten Fettsäuren bestehen (~0°C) (Koynova und Caffrey, 1995) und befinden sich deshalb bei Körpertemperatur gemeinsam mit Cholesterin in einer „liquidordered“ (l_o), dichter gepackten Phase (Brown und London, 1998).

Die genauen molekularen Mechanismen, wie Proteine in Rafts sortiert werden, sind noch nicht geklärt. Man weiss jedoch, dass Lipid-Modifikationen eine entscheidende Rolle spielen. So werden z. B. Proteine mit langen, gesättigten Acylketten oder Proteine, die an Glykosyl-phosphatidyl-inositol (GPI) gebunden sind, sowie an Cholesterin gebundene Proteine in Rafts aufgenommen (Brown

und London, 1998; Rietveld et al., 1999; Hooper, 1999; Simons und Toomre, 2000).

Rafts sind zu klein, um lichtmikroskopisch gesehen zu werden (Varma und Mayor, 1998; Pralle et al., 2000). Sie können jedoch auf lebenden Zellen mit Antikörpern zu größeren Domänen verbunden und anschließend im Mikroskop sichtbar gemacht werden (Harder et al., 1998; Friedrichson und Kurzchalia, 1998).

Biochemisch lassen sich Rafts anhand ihrer Unlöslichkeit in nicht-ionischen Detergenzien isolieren. Da Rafts in milden nichtionischen Detergenzien bei 4°C unlöslich sind, flotieren sie aufgrund ihrer geringen Dichte im Dichtegradienten und können so vom Zytoskelett und den restlichen Proteinen aufgetrennt werden (Brown und Rose, 1992; Schroeder et al., 1994; Brown und London, 2000; Simons und Toomre, 2000). In diesen so genannten DRMS (= detergent insoluble glycosphingolipid rich complexes) reichern sich Proteine und Lipide, die sich in einer „liquid-ordered“-Phase befinden, an. Durch die Isolation von DRMS kann somit relativ einfach festgestellt werden, ob ein Protein in Rafts zu finden ist. Allerdings können Proteine, die eine schwache Rafts-Assoziation aufweisen, durch diese Methode verloren gehen. Ein wichtiges Kriterium, ob ein Protein in Rafts zu finden ist, ist der Cholesterinentzug (z. B. mit Cyclodextrin). Wird den Rafts Cholesterin entzogen, so werden Proteine, die sich in Rafts befinden, detergentenlöslich (Simons und Toomre, 2000).

1.2.2 Rafts in Oligodendrozyten

In Oligodendrozyten muss ein Sortierungsapparat vorhanden sein, der die Sortierung der Myelinbestandteile in das Myelin steuert. Verschiedene Schritte des Membrantransports müssen reguliert werden: die Bildung von Transportvesikeln, der Transport der Vesikel in das Myelin und die Fusion der Vesikel mit der Myelinmembran. Es gibt viele Hinweise, die darauf hindeuten, dass Rafts für diese Prozesse und damit für die Entstehung der Myelinscheide wichtig sein könnten (Krämer et al., 1997 und 1999; Kim und Pfeiffer, 1999; Trotter et al., 2000; Simons et al., 2000; Kröpfl und Gardinier, 2001b).

Die Myelinmembran ist durch einen besonders hohen Gehalt von Sphingolipiden und Cholesterin gekennzeichnet. Es wurde gezeigt, dass die Myelinlipide und PLP/DM20 – eines der Myelinhauptproteine – den Kriterien der Rafts-Assoziation entsprechen: PLP/DM20 ist in CHAPS bei niedrigen Temperaturen unlöslich. Entzieht man Oligodendrozyten jedoch Cholesterin mit Methyl- β -Cyclodextrin oder behandelt sie mit Fumonisin B1, einem Inhibitor der Sphingolipid-Neusynthese, enthält die unlösliche Membranfraktion fast kein PLP/DM20 mehr. Außerdem konnte die direkte Interaktion zwischen PLP und Cholesterin in Experimenten mit photoaktivierbarem Cholesterin gezeigt werden. In „pulse-chase“-Experimenten wurde nachgewiesen, dass sich die CHAPS-unlöslichen Membranfraktionen innerhalb des Golgi-Apparates bilden (Simons et al., 2000). Die Bedeutung der Sphingolipide, Galaktosylceramide und Sulfatide wurde in Experimenten an Ceramidgalaktosyltransferase (CGT)-knock-out-Mäuse deutlich. Diese Tiere sind nicht in der Lage, Galaktosylceramide und Sulfatide zu synthetisieren, produzieren jedoch zum Ausgleich Glukosylceramide. Als das Myelin von diesen Mäusen biochemisch analysiert wurde, zeigte sich, dass PLP/DM20 in wesentlich geringerem Maße als in Wildtyp-Tieren in der CHAPS-unlöslichen Membranfraktion zu finden war (Coetzee et al., 1996; Bosio et al., 1996; Simons et al., 2000).

Aus der Gesamtheit der Ergebnisse wurde geschlossen, dass PLP eine Interaktion mit Cholesterin und Galactosylceramiden im Golgi-Apparat eingeht und dadurch zur Myelinmembran sortiert wird. Es wird vermutet, dass diese Lipid-Protein-Interaktionen entscheidend dazu beitragen, dass Myelinproteine zur Myelinmembran gelangen. Wie PLP mit Rafts assoziiert, ist nicht bekannt. PLP ist ein hydrophobes Transmembranprotein mit ca. 50% unpolaren Aminosäuren. Außerdem sind an Position 5, 6, 9, 108, 138 und 140 über Thioester sechs Palmitoylsäuren an Zysteine kovalent gebunden.

Beides wären mögliche Raftssortierungssignale, wobei vor allem dicht nebeneinander liegende Palmitoylierungen die Assoziation von Proteinen mit Rafts erhöhen (Melkonian et al., 1999).

Außerdem wurde die Rolle dieser molekularen Interaktion in der Pathogenese von PMD untersucht. Es zeigte sich, dass die vermehrte PLP-Expression zur

Anhäufung von detergensunlöslichem PLP und Cholesterin-Aggregaten in Endosomen/Lysosomen führt. Es scheint, dass diese Aggregate die Myelinisierung beeinträchtigen und möglicherweise den Oligodendrozytenzelltod auslösen (Simons et al., 2002).

Abgesehen von PLP sind weitere Myelinproteine mit Rafts assoziiert, so z. B. auch GPI-verankerte Proteine, CNP, MOG, MAG, OSP/Claudin11, MAL/MAVP17, P0 und PMP22 (Krämer et al., 1997; Frank, 2000; Kim und Pfeiffer, 1999 und 2002; Simons et al., 2000; Taylor et al., 2002; Erne et al., 2002). Inzwischen geht man davon aus, dass Oligodendrozyten Rafts nicht nur für die Membransortierung, sondern auch in der Signaltransduktion und im Axon-Glia-Kontakt benötigen (Krämer et al., 1997 und 1999; Kim und Pfeiffer, 1999; Trotter et al., 2000; Simons et al., 2000; Kröpfl und Gardinier, 2001b; Marta et al., 2003; Vinson et al., 2003; Baron et al., 2003).

1.3 Zielsetzung der Arbeit

In dieser Arbeit sollten die Rolle von Protein-Lipid- und Protein-Protein-Interaktionen in der Sortierung von PLP näher untersucht und charakterisiert werden.

1. Insbesondere sollte untersucht werden, ob die Palmitoylierung von PLP für dessen Assoziation mit Cholesterin- und Galactosylceramidangereicherten Membrandomänen („Myelinrafts“) verantwortlich ist.
2. Darüberhinaus sollte geprüft werden, ob PLP mit anderen Proteinen eine Interaktion eingeht, und ob diese für die Sortierung eine Rolle spielen könnte.

2 Material und Methoden

2.1 Molekularbiologische Methoden

2.1.1 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die PCR erlaubt es, bestimmte DNA-Abschnitte selektiv zu amplifizieren. Dazu werden nur geringe Mengen an zu vervielfältigender DNA, Oligonukleotide (Primer), die komplementär zu den jeweiligen 3´Ende des zu amplifizierenden DNA-Stückes sind, Taq-Polymerase und eine ausreichende Menge der vier Deoxyribonukleotid-Triphosphate benötigt.

Im ersten Schritt wird die DNA durch Erhitzen auf 94 °C für 30 sec. in zwei Einzelstränge zerlegt (Denaturierung). Die Primer können sich nun im zweiten Schritt bei 40 - 60 °C an die jeweils komplementären Stellen der Ausgangs-DNA binden (Primer-Annealing) und werden bei 72 °C von der Taq-Polymerase verlängert (Primer-Extension). Anschließend wird wieder mit dem ersten Schritt begonnen.

Nach etwa 30 Zyklen sind genug Kopien des gewünschten DNA-Abschnitts vorhanden, um damit weiterzuarbeiten.

Ansatz: 5 µl Puffer

1 µl dNTP

1,5 µl Primer 1, Konzentration: 10 pm/µl (vorwärts)

1,5 µl Primer 2, Konzentration: 10 pm/µl (rückwärts)

0,5 µl Taq-Polymerase

1µg DNA

mit Wasser auf 50 µl auffüllen

2.1.2 Restriktionsspaltung

Durch die Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen werden definierte DNA-Fragmente erzeugt, die zur weiteren Analyse oder zum Klonieren verwendet werden können. Restriktionsenzyme sind Endonukleasen bakteriellen Ursprungs. Sie spalten doppelsträngige DNA an für das jeweilige Enzym spezifischen Erkennungs- und Spaltstellen.

Ansatz: 5-10 µg DNA
 10 U Restriktionsenzymes
 5 µl 10-fach Reaktionspuffer
 mit Wasser auf 50 µl auffüllen

Der Ansatz wird bei der vom Hersteller angegebenen Temperatur (meist 37 °C) für 1-3 Stunden inkubiert. Ein Teil des Enzyms wird erst nach einer (bzw. einer halben) Stunde zugegeben.

Je nach weiterer Verwendung wird die DNA zur Kontrolle oder zum Isolieren eines Fragmentes auf ein Agarosegel aufgetragen oder gereinigt.

2.1.3 Aufreinigung von DNA nach enzymatischer Reaktion

DNA-Fragmente werden nach der PCR oder enzymatischen Reaktionen mit dem QIAquick-PCR-Purification Kit Protokoll (Qiagen) isoliert.

1. Zuerst werden 5 Volumen Puffer PB zur DNA-Lösung gegeben, dann gemischt und alles auf eine QIAquick-Säule pipettiert. In diesem Schritt bindet die DNA an die Säule.
2. Die Säule wird 1 min bei 14 000 rpm zentrifugiert.
3. Gewaschen wird zweimal mit jeweils 750 µl PE Puffer (zweimal 1 min zentrifugieren und Zentrifugat jeweils verwerfen)
4. Zum Eluieren wird die Säule auf ein neues Eppendorfgefäß gestellt, die gewünschte Menge Wasser auf die Membran gegeben und wieder (nach 1 min Inkubation) für 1 min zentrifugiert.

2.1.4 Auftrennung der DNA nach Grösse: Agarosegel-Elektrophorese

Bei der Agarose-Gelelektrophorese werden DNA-Fragmente nach der Grösse aufgetrennt. Agarose ist ein Polymer, das aus verschiedenen verknüpften Galactoseeinheiten besteht und eine Art Netz bildet. Zur DNA-Auftrennung wird an das Gel ein elektrisches Feld angelegt. Die negativ geladene DNA wandert zur Kathode und wird je nach Länge unterschiedlich stark von den Agarosepolymeren verlangsamt.

Je nach DNA-Fragmentlänge werden 1-2%ige Gele verwendet. Die Agarose wird in 1 x TAE-Puffer gegeben und in der Mikrowelle erhitzt bis sie sich vollständig löst. Die Lösung wird unter Rühren auf ca. 50 °C abgekühlt, das Ethidiumbromid zugegeben (10 µl/ml) und dann das Gel in die Kammer gegossen. Mit Kämmen unterschiedlicher Größe werden im Gel Probetaschen ausgespart. Für die Elektrophorese wird das Gel in eine mit TAE-Puffer gefüllte Kammer gelegt, die mit 6 x Ladepuffer versetzte DNA in die Probetaschen pipettiert und eine Spannung für 30 bis 60 min von 90 bis 110 Volt angelegt.

Ethidiumbromid interkaliert in die DNA. Zum Sichtbarmachen der markierten DNA wird Ethidiumbromid mit UV-Licht (254-366 nm) angeregt und emittiert Licht im orange-roten Bereich (590 nm). Die Größe der Probe wird anhand eines Markers abgeschätzt und das Gel zur Dokumentation photographiert.

Für weitere Klonierung kann die Bande mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten werden.

2.1.5 Extraktion von DNA aus Agarose

DNA-Banden aus Agarose-Gelen werden nach dem Qiaquick Gel Extraction Kit Protokoll (Qiagen) isoliert.

1. Die gewünschte Bande wird so klein wie möglich aus dem Agarose-Gel ausgeschnitten und gewogen.
2. Anschließend wird die 3-fache Menge des Gewichts QG-Puffer dazugegeben und das Gel so lange bei 50 °C inkubiert bis sich die Agarose ge-

löst hat. Die Farbe des Indikators sollte gelb sein, da sich die DNA nur bei einem pH-Wert unter 7,5 an die Säule bindet.

3. Es wird das Gewicht der Bande in ml Isopropanol zum Ansatz pipettiert, gut gemischt und auf die Säule gegeben.
4. Nach einmal bei 14 000 rpm zentrifugieren wird der Durchlauf verworfen.
5. Mit 750 µl PE Puffer wird gewaschen und anschließend nochmal zentrifugiert.
6. Die Säule wird auf ein neues Eppendorffreaktionsgefäß gestellt, 40 µl Wasser auf die Membran pipettiert und zur Elution 1 min mit 14 000 rpm zentrifugiert.

2.1.6 DNA-Aufreinigung: Chloroform/Phenolextraktion

Mit der Chloroform/Phenolextraktion wird DNA von Proteinen und anderen Verunreinigungen reinigen.

1. Das DNA-Volumen wird auf 200 µl mit Wasser aufgefüllt.
2. Mit 200 µl Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol wird alles gemischt und 2 min mit 14 000 rpm zentrifugiert.
3. Der Überstand wird erneut mit derselben Menge Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol gevortext und zentrifugiert.
4. Diesmal wird der Überstand mit dem Ausgangsvolumen an Chloroform gemischt, zentrifugiert und die wässrige obere Phase mit der DNA abgenommen.
5. Der Überstand wird mit 25 µl Natriumacetat und 2,5-fachem Volumen Ethanol bei -80 °C für 2 Stunden inkubiert.
6. Nach 20 min zentrifugieren bei 14 000 rpm und 4 °C wird der Überstand abgesaugt.
7. 800 µl Ethanol werden hinzugefügt und wieder für 20 min bei 14 000 rpm und 4 °C zentrifugiert.
8. Nach dem Absaugen des Überstandes wird das Pellet getrocknet und in 6 µl H₂O gelöst.

2.1.7 „Fill up“

Für eine Ligation kann es notwendig sein, aus überhängenden Enden ein stumpfes Ende herzustellen. Dazu wird die T4-DNA-Polymerase verwendet.

Ansatz: In 40 µl H₂O

- 4 µl Puffer
- 4 µl 1mM dNTP
- 1 µl BSA
- 1,5 µl T4-DNA-Polymerase
- DNA-Fragment

Der Ansatz wird 20 min bei 12 °C inkubiert und anschließend die Polymerase 10 min bei 70 °C deaktiviert.

2.1.8 Dephosphorylierung

Um zu verhindern, dass bei einer Ligation sich der Vektor ohne Insert schließt, entfernt man die beiden Phosphatreste von den Vektorenden, welche von der Ligase benötigt werden.

- Ansatz: 4 µl Puffer
- 1 µl Alkalische Phosphatase
 - Vektor
 - Mit H₂O auf 40 µl auffüllen

Inkubation: 1 Stunden bei 37 °C

Deaktivieren der Alkal. Phosphatase für 15 min bei 65 °C

2.1.9 Ligation

Die T4-DNA-Ligase verbindet zwei zusammenpassende DNA-Enden miteinander (z. B. wenn beide mit demselben Restriktionsenzym geschnitten wurden oder stumpfe Enden haben).

- Ansatz: 1 µl 10x Ligationspuffer
- 1 µl T4-DNA-Ligase
 - Vektor (z. B. 1 µl pGemt)

Insert (zB 4 µl PLP-wt-myc)

Mit H₂O auf 10 µl auffüllen

Inkubation über Nacht bei 12 °C

Berechnungsformel für Vektor und Insertverhältnis:

Menge (Insert)= 50 ng Vektor x Grösse (Insert) x 3 / Grösse (Vektor)

2.1.10 Sequenzierung

Zum Sequenzieren wird die Kettenabbruchmethode nach Sanger verwendet. Sie beruht auf dem Prinzip der PCR. Dem Reaktionsgemisch wird ein Primer zugegeben und neben Desoxyribonukleotid-triphosphaten (dNTPs) auch fluoreszenzmarkierte Didesoxyribonukleotid-triphosphate (ddNTPs). Die Ausgangs-DNA kann nur in eine Richtung polymerisiert werden. Wird nun anstelle eines dNTPs ein ddNTP von der Polymerase eingebaut, wird der Strang nicht mehr fortgeführt weil kein freies 3`-Hydroxylende mehr vorhanden ist. Die Kette bricht ab. Nach mehreren PCR-Zyklen erhält man Fragmente unterschiedlicher Länge, die elektrophoretisch aufgetrennt werden. Aus der Farbfolge des, je nach letztem ddNTP unterschiedlich markierten Fragments, kann die Sequenz bestimmt werden.

Ansatz: 400 ng DNA

10 pmol Primer

3 µl BDT-Mix

in 20 µl Gesamtvolumen

2.2 Vervielfältigung und Isolierung von Plasmiden in E. coli

2.2.1 Kultur von Bakterien

Die Bakterien werden in LB-Medium kultiviert. Nach dem Autoklavieren des Mediums lässt man die Flüssigkeit abkühlen und fügt das entsprechende Antibiotikum hinzu. (für pGemt und pR4: Ampicillin 100µg/µl). Das Antibiotikum selektiert die transformierten E. coli-Klone. Durch ein Antibiotikum-Resistenzgen

auf den eingeführten Plasmiden sind die Plasmid-positiven Kolonien vor dem Antibiotikum geschützt, die anderen sterben ab.

Für das Kultivieren auf Platten wird dem LB-Medium vor dem Autoklavieren 1,5 % (w/v) Agar zugefügt. Nach dem Abkühlen auf 50 °C wird die entsprechende Menge Ampicillin zugegeben und die Platten gegossen.

Die Platten werden mit den Bakterien angeimpft und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Für weitere Verwendung ist es möglich, sie bei 4 °C mehrere Wochen zu lagern.

Flüssigkulturen werden mit einer Kolonie von einer LB-Agarplatte angeimpft und über Nacht bei 180 rpm (37 °C) geschüttelt. Die Kolonien werden erst in einer kleinen Menge (5 ml) angezogen und anschließend in größere Mediummengen (120ml) überführt.

2.2.2 Transformation von E.coli

Bei der Transformation kann in E.coli zellfremde DNA eingeführt werden in Form eines Plasmides.

Chemokompetente Zellen (One Shot TOP10 kompetente Zellen) werden auf Eis aufgetaut. 2-4 µl Plasmid-DNA werden dazugegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Die chemokompetenten Zellen besitzen durch gebundene Kationen positiv geladene Zellwände, welche die negativ geladene Plasmid-DNA binden. Die Bakterien werden 30 sec auf 42 °C erwärmt. Dadurch werden die Plasmide in die Zelle aufgenommen. Nach 2 min auf Eis wird 300 µl LB-Medium dazupipettiert und die Zellen für 1 Stunde leicht geschüttelt. Während dieser Zeit exprimieren die Bakterien das Antibiotikaresistenz-Gen. Die Agarplatten werden mit 80 µl beimpft und über Nacht bei 37 °C kultiviert.

2.2.3 Isolierung von Plasmiden aus E. coli: Qiagen Miniprep

Der QIAprep Spin Miniprep Kit wird zur Extraktion von Plasmid-DNA aus E.coli-Kulturen verwendet (bis zu maximal 5 ml).

Eine Kolonie wird über Nacht bei 37 °C geschüttelt und am nächsten Tag weiter verarbeitet.

1. 4 ml Kultur werden bei 14 000 rpm für 4 min zentrifugiert und der Überstand verworfen.
2. In 250 µl eiskaltem Puffer P1 werden die Zellen resuspendiert.
3. Mit 250 µl P2 lysiert man die Bakterien (max. 5 min).
4. Die Zelllysis wird mit 500 µl P3 gestoppt und die Proteine ausgefällt.
5. Nach 10-minütigem Zentrifugieren bei 14 000 rpm gibt man den Überstand auf eine Säule (QIAprep column) und legt Vakuum an.
6. Die an die Säule gebundene DNA wird 2 x mit 1 ml PE- Puffer gewaschen und anschließend noch mindestens 5 min durch das Vakuum getrocknet.
7. Die Plasmid-DNA wird mit 110 µl eluiert.

2.2.4 Isolierung von Plasmiden aus E. coli: Qiagen Maxiprep

Mit dem Qiagen Maxiprep ist es möglich, größere Mengen an Plasmid-DNA aus E.coli-Flüssigkulturen zu isolieren (bis zu 120 ml).

Vorbereitend wird eine 120 ml-Kultur der gewünschten Kolonie hergestellt.

1. Nach 15 min Zentrifugieren der Kultur mit 5 000 g bei 4 °C (Rotor GS3) werden die pelletierten Zellen in 10 ml Puffer P1 resuspendiert. Es sollten keine Zellklumpen mehr vorhanden sein.
2. Anschließend werden die Zellen bei Raumtemperatur mit 10 ml P2 für 5 min lysiert. SDS löst die Phospholipide und Proteine aus der Zellmembran. NaOH denaturiert Proteine und die DNA.
3. Das Lysat wird mit 10 ml kaltem P3 neutralisiert. Durch die hohe Salzkonzentration fällt Kaliumdodecylsulfat aus und präzipitiert die denaturierten Proteine, chromosomale DNA und andere Zelltrümmer. Die klei-

nerer Plasmid-DNA renaturiert unter neutralisierten Bedingungen wieder und bleibt in Lösung.

4. Während des Abzentrifugierens der Zelldebris (30 min, 14 000 rpm, 4 °C im Ti 45-Rotor) äquilibriert man die Säule (QIAGEN-tip 500) mit 10 ml QBT- Puffer.
5. Sofort nach Ende des Zentrifugierens wird der Überstand auf die Säule gegeben. Die Plasmid-DNA bindet während des Durchlaufs an die positiv geladene Säule.
6. Zum Entfernen von unerwünschter Kontamination verwendet man 2 x jeweils 30 ml Puffer QC bevor mit 15 ml QF die DNA eluiert wird.
7. Die DNA wird mit 10,5 ml Isopropanol ausgefällt und zentrifugiert. (35 min, 4 °C, 14 000 rpm). Der Überstand muss vorsichtig abgesaugt werden, damit man das Pellet nicht verliert.
8. Nach Waschen mit 70%igem Ethanol, zentrifugieren und lufttrocknen wird die DNA in 200 µl TE gelöst.
9. Zum Abschluss wird die Konzentration der DNA mit dem Photometer bei 260 nm gemessen.

2.3 Klonierung der verwendeten Plasmide

Tab 2.2: Klonierte Plasmide

wt	wildtyp
Δ cys3	Mutation der ersten drei Cysteine zu Serin
Δ cys108	Mutation des Cysteins an Position 108 zu Serin
Δ leu	Mutation der ersten beiden Leucine zu Alanin
myc	myc-Tac (EQKLISEEDL)
jmp	jimpy-Mutation
rsh	rumpshaker-Mutation

NR	INSERT IM VEKTOR PR4
1	PLP-wt-myc
2	DM-20-wt-myc
3	DM20- Δ cys3-myc
4	DM20- Δ cys108-myc
5	PLP- Δ cys3-myc
6	DM20- Δ cys3- Δ cys108-myc
7	PLP- Δ leu-myc
8	DM20- Δ leu-myc
9	PLP-wt
10	PLP-rsh
11	PLP-jmp

Alle Konstrukte wurden vor der Einführung in den pR4-Vektor in pGemt kloniert.

Klon PLP-wt-myc, DM-20-wt-myc, PLP-wt, PLP-jmp und PLP-rsh/PLP-jmp wurden von M.Simons hergestellt. PLP- Δ cys3-myc, DM20- Δ cys3-myc und DM20- Δ cys108-myc standen im Klonierungsvektor pGemt zur Verfügung.

Klon 6 (DM20- Δ cys3- Δ cys108-myc) :

Zuerst wurde eine PCR mit pGemt-DM20- Δ cys108-myc (Primer: 16f und 15/16rev) durchgeführt, um eine Δ cys3-Mutation einzuführen. Das aus einem anschließenden Gel extrahierte Produkt wurde mit pGemt ligiert und in E.coli

transformiert. Um die E.coli-Kolonien auszuwählen, welche ein Plasmid mit Insert haben, wurde erneut eine PCR durchgeführt mit denselben Primern.

Nach der Klonierung in den pR4-Vektor und Sequenzierung fand sich eine Mutation im myc-Tac. Deshalb wurden sowohl pR4-DM20- Δ cys3 - Δ cys108-myc (6) als auch pR4-DM20- Δ cys108-myc (4) mit der Endonuklease Spe I geschnitten und das kurze Stück von 6 mit dem langen Stück von 4 (nach dessen Dephosphorylierung) ligiert.

Klon 7 und 8 (PLP- Δ leu-myc, DM20- Δ leu-myc):

Die Mutation von Leucin zu Alanin wurde mittels PCR in PLP-wt-myc und DM20-wt-myc eingeführt (Primer LeuAlaPLPfor und PLPMYCrev). Analog zu Klon 6 wurden beide Produkte in pGemt kloniert und mit erneuter PCR mit denselben Primern auf positive Klone gescreent. Vor der weiteren Verarbeitung wurde sequenziert, um die Mutationen zu bestätigen.

Klonierung der Konstrukte von pGemt in pR4-Vektor:

Die pGemt-Klone 3/4/5/7/8 wurden ebenso wie der pR4-Vektor mit BamH I verdaut, Klon 6 und pR4-Vektor mit BamH I und Pst I. Die geschnittenen Vektoren mussten nach der Gelextraktion zuerst dephosphoryliert werden, bevor sie nach erneuter Reinigung zur Ligation mit dem jeweiligen Konstrukt verwendet werden konnten. Die mit den Ligationsprodukten transformierten Bakterien wurden über Nacht auf Agarplatten kultiviert und am nächsten Morgen gepickt.

Mit PCR (Primer Sp6 und 15/16rev) wurden das Vorhandensein und die Richtung der Inserts im Vektor geprüft.

Die positiven E.coli-Kolonien wurden in 5 ml Elbroth über Nacht wachsen gelassen und in der darauffolgenden Nacht in 120 ml Elbroth mit Ampicilin weiterkultiviert für die Maxi-Präparation.

2.4 Herstellung des rekombinanten SFV

Die Herstellung von rekombinantem Semliki-Forester-Virus (SFV) erfolgte nach dem Protokoll von Liljeström und Garoff (1991).

Klonierung der Konstrukte in SFV

DM20- Δ cys108-myc (4), PLP- Δ cys3-myc (5), DM20- Δ cys3- Δ cys108-myc (6) im pR4-Vektor und pSFV wurden mit BamH I verdaut. pSFV wurde vor der Ligation mit den einzelnen Konstrukten dephosphoryliert. Die Konstrukte wurden in E.coli transformiert und nach einem Miniprep mit BamH I-Restriktion getestet, ob sie ein Insert aufgenommen hatten. Die richtige Richtung des Inserts wurde mit einer Restriktion mit Bgl II bestimmt. DM-20-wt-myc (1) wurde mit EcoR I und BamH I geschnitten, ein Fill up durchgeführt, und mit blenden Enden an ein Sma I-Schnittstelle in pSFV kloniert. Mit Xma wurde auf ein Insert getestet, mit Bgl II die Richtung des aufgenommenen Fragmentes herausgefunden.

PLP-wt-myc (1) und DM20- Δ cys3-myc (3) wurden von M.Simons hergestellt.

Die positiven Klone wurden mit Maxiprep weiterverarbeitet.

Linearisieren von pSFV und Helfervirus

pSFV wurde mit Nru I verdaut, der Helfervirus mit Spe I und anschließend mit einer Chloroform/Phenol-Extraktion gereinigt.

Herstellung der RNA

Ansatz: 5 μ l Sp6-Puffer
5 μ l Cap
5 μ l DIT
5 μ l rNTP
1,5 μ l RNAsin
1,5 μ l Sp6 RNA Polymerase
3 μ l DNA
24 μ l H₂O

Der Mix wird für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert und anschließend in flüssigen Stickstoff gegeben und bei –80 °C gelagert.

Elektroporation in BHK

Konfluent gewachsene BHK-Zellen werden in PBS gewaschen, trypsinisiert und in serumhaltigem Medium aufgenommen. Das Kulturmedium wird abzentrifugiert und die Zellen in 800 µl PBS resuspendiert. In einer Küvette werden Zellen, pSFV-RNA und Helfervirus-RNA zusammenpipettiert und mit 850 V und 25 µF elektroporiert. In Kulturflaschen werden die elektroporierten Zellen 24 Stunden bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. In dieser Zeit bilden die BHK-Zellen die Viren und geben diese in das Medium ab.

Einfrieren der hergestellten Viren

Nach genau 24 Stunden wird das virushaltige Medium abgenommen und bei 1000 rpm 5 min zentrifugiert bei 4 °C. Der Überstand wird aliquotiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Der Virus kann bei –80 °C gelagert werden.

Alle Arbeiten mit Viren werden in einem S2-Labor durchgeführt.

2.5 Zellkultur

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen an einem Laminar-Flow-Arbeitsplatz durchgeführt. Verwendete Lösungen und Medien wurden entweder autoklaviert oder steril filtriert mit Millipore SteriTop. Verwendete Materialien waren steril verpackt oder wurden autoklaviert.

BHK-Zellen (Baby-Hamster-Kidney-cells) werden in GMEM mit 5% FCS bei 37 °C und 5% CO₂ in 250 ml-Zellkulturflaschen kultiviert.

Oli-neu-Zellen, eine Oligodendrozytenzelllinie, wachsen in Sato-Medium mit 1% Horseserum versetzt bei 37 °C und 5% CO₂. Die Zellkulturflaschen, coverslips und 6-wells werden vor der Verwendung mit Poly-L-Lysin (PLL) beschichtet, damit die Oli-neu-Zellen besser adärieren können.

Die primären Zellkulturen wurden von G. Schulz präpariert und kultiviert nach dem Protokoll von Smith (1969) und Norton und Poduslo (1973).

Für Westernblots werden die Zellen in 6-well-Platten oder in 5cm-Schalen ausgesät, für Immunofluoreszenz werden coverslips verwendet.

2.5.1 Zellen auftauen

Die Zellen werden bei 37 °C aufgetaut und sofort in 10 ml vorgewärmtes Medium überführt. Anschließend zentrifugiert man 5 min bei 1000 rpm, nimmt den Überstand ab und resuspendiert die Zellen in 5 ml neuem Medium.

Die Zellen werden auf zwei vorher vorbereitete Zellkulturflaschen verteilt und in den Inkubator gestellt.

2.5.2 Zellen passagieren

Wenn die Zellen konfluent sind, müssen sie geteilt werden, um zu verhindern, dass sie übereinander wachsen.

Für Oli-neu-Zellen werden zuerst Kulturflaschen mit PLL beschichtet:

Dazu müssen die Flaschen mindestens eine halbe Stunde mit 5 ml PLL inkubiert und anschließend 2 x mit sterilem PBS gewaschen werden. 18 ml Medium werden eingefüllt und zum Äquillibrieren in den Inkubator gestellt.

Bei den zu teilenden Oli-neu-Zellen wird das alte Sato abgesaugt, mit PBS gewaschen und 2 min bei Raumtemperatur mit Trypsin low inkubiert. Mit dem Mikroskop kontrolliert man, ob sich die Zellen vom Boden gelöst haben und inhibiert dann das Trypsin mit 8 ml DMEM mit 10% FCS. Die Zellen werden abzentrifugiert (5 min bei 1000 rpm) und in 10 ml Sato resuspendiert. In die neuen Flaschen werden sie 1:5 oder 1:10 verdünnt wieder ausgesät.

Bei BHK-Zellen wird ebenso zuerst das alte Medium abgesaugt, mit PBS gewaschen und 2 ml Trypsin zugegeben. Zum Ablösen werden sie für 5 min in den Inkubator gestellt, bevor sie in 8 ml GMEM mit 5% FCS verdünnt werden.

Die Zelldichte wird mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und in Flaschen 600 000 bis 900 000 Zellen ausgesät, in 12-wells 30 000 bis 90 000 Zellen.

2.5.3 Zellen einfrieren

Wenn die Zellen konfluent in einer Kulturflasche gewachsen sind, wird das Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Zugegebenes Trypsin löst die Zellen vom Boden. Dann werden sie mit 8 ml DMEM/10%FCS 5 min bei 5000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und auf Eis weitergearbeitet: die Zellen werden in 2 ml Freezing-Medium aufgenommen und jeweils 1 ml in Kryoröhrchen überführt. Die Zellen werden langsam auf $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ abgekühlt (In einer Styroporbox) und nach einiger Zeit in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.5.4 Transfektion von BHK-Zellen

Es gibt mehrere unterschiedliche Methoden, Fremd-DNA in eukaryonte Zellen einzuschleusen. Für die BHK-Zell-Transfektion wählten wir die Liposomenvermittelte Transfektion mit Fugene.

Die Zellen lässt man bis zur gewünschten Dichte wachsen. Pro well pipettiert man 3 μl Fugene in 100 μl Optimem und fügt als letztes 1 μg DNA hinzu, mischt alles vorsichtig und inkubiert den Ansatz bei Raumtemperatur für 20 min. In dieser Zeit bilden sich Liposomen-DNA-Komplexe. Das Verhältnis von DNA zu Fugene sollte 1:2,5-3 betragen. Für Ko-Transfektionen wurden 6 μl Fugene und jeweils 1 μg DNA verwendet, für Westernblots 2 μg DNA und 6 μl Fugene. Nach der Inkubationszeit werden 100 μl von dem Gemisch in jedes 12-well gegeben. Ein Teil der Zellen nimmt Plasmide auf und exprimiert das Gen. Nach 24 Stunden werden die Zellen weiterverarbeitet.

2.5.5 Transfektion von Oli-neu-Zellen

Nach mehren Vorversuchen mit Elektroporation entschieden wir uns, Oli-neu-Zellen aufgrund der höheren Transfektionseffizienz mit Semliki-Forest-Virus zu infizieren.

Für Immunfluoreszenz:

Die coverslips werden auf Parafilm gelegt und jeweils mit 100 μ l 1:5 in Sato verdünntem Virus 1h im Inkubator infiziert. Anschließend werden die coverslips wieder zurück in das ursprüngliche 12-well mit dem alten Sato gebracht, das in der Zwischenzeit auch im Inkubator gelagert wird.

Nach 12 Stunden beginnt die Immunfluoreszenz.

Für Westernblot:

Für Westernblots werden Zellen in 5 cm-Schalen verwendet. Das Medium wird abgenommen. Der SFV wird 1:5 verdünnt in dem abgenommenen Sato und jeweils 2 ml davon in jede Schale gegeben. Wieder inkubiert man 1 Stunde und nach Entfernen des Virus fügt man 2 ml altes und 2 ml neues Sato zu den Zellen. Nach 12 Stunden beginnen die CHAPS-Extraktion und der Westernblot.

2.6 Analyse von Proteinen

2.6.1 Immunfluoreszenz

Mit der indirekten Immunfluoreszenz kann man Proteine innerhalb von Zellen nachweisen und lokalisieren. Antikörper, die (möglichst) spezifisch an ein Epitop innerhalb des gesuchten Proteins binden, werden mit einem zweiten Antikörper markiert. An den Sekundärantikörper ist ein Fluorochrom gekoppelt. Dieses kann in der Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht werden. Das Fluorochrom absorbiert Licht einer bestimmten Wellenlänge (z. B. UV-Licht) und emittiert Lichtenergie als Licht anderer Wellenlänge.

Die Zellen werden auf coverslips kultiviert, transfeziert und nach 12 Stunden (Oli-neu-Zellen) bzw. nach 24 Stunden (BHK-Zellen) für die Immunfluoreszenz verwendet.

1. Die Zellen werden 2 x kurz in PBS gewaschen.
2. Mit 500 μ l 4%-Paraformaldehyd in PBS werden die Zellen 15 min fixiert und wieder 3 x kurz in PBS gewaschen.

3. Das Permeabilisieren erfolgt mit 0,1% Triton X-100 für 2 min bei Raumtemperatur. Dieser Schritt ist wichtig, damit die Antikörper in die Zelle penetrieren können. Das Detergens wird mit PBS ausgewaschen.
4. Unspezifische Antikörperbindungsstellen werden mit 100 µl Blocklösung abgesättigt (30 min bei Raumtemperatur).
5. Nun erfolgt die Inkubation mit dem/den in 10%-iger Blocklösung verdünnten Primäntikörper(n) für 1 Stunde bei Raumtemperatur.
6. Bevor mit dem Sekundäntikörper angefärbt wird (1 Stunde bei Raumtemperatur, Antikörper verdünnt in 10%-iger Blocklösung), müssen alle nicht gebundenen Primäntikörper entfernen werden (dreimal jeweils 5 min PBS waschen).
7. Nach 3 x waschen mit PBS für 5 min werden die Deckgläschen in Moviol eingebettet. Am nächsten Tag werden die Zellen im Mikroskop analysiert, wenn das Moviol getrocknet und polymerisiert ist.

Tab. 2.3: In der Immunfluoreszenz verwendete Primär- und Sekundäntikörper

Name	Verdünnung	
myc	1:500	monoklonal
P6	1:1000	polyklonal
Calnexin	1:200	polyklonal
O10	1:50	monoklonal
α -actinin	1:100	polyklonal
MOG	1:300	monoklonal

α -mouse-cy2	1:500
α -mouse-cy3	1:1000
α -mouse-FITC	1:200
α -rabbit-cy2	1:500
α -rabbit-cy3	1:2000

Ko-Färbungen:

Um Interaktionen zwischen unterschiedlichen Proteinen zu analysieren oder um genauer definierte Lokalisation herauszufinden, wird eine Kofärbung mit unterschiedlichen Antikörpern durchgeführt. Man macht sich dabei zunutze, dass der Primärantikörper in unterschiedlichen Tieren generiert werden kann. Die Sekundärantikörper sind spezifisch für Antikörper der jeweiligen Spezies (z. B. Maus und Kanninchen) und werden mit unterschiedlichen Fluorochromen gekoppelt (z. B. cy3 und Fitc). Mit verschiedenen Filtern können nun die jeweiligen Proteine getrennt angeschaut werden.

Aktinfärbung:

Für Aktinfärbung wird ein etwas abgeändertes Protokoll verwendet:

Die Zellen werden nur 10 min fixiert und eine andere Blocklösung verwendet (2% FCS/1%BSA in TBS). Die Antikörper werden in 100 % Blocklösung verdünnt und dazwischen mit TBS gewaschen. Vor dem Einbetten in Moviol werden die Zellen 45 min bei Raumtemperatur mit 1:50 verdünntem Phalloidin-Rhodamin inkubiert.

Dextranfärbung:

Mit Dextran werden Endosomen und Lysosomen angefärbt. Die Zellen werden vor der Immunfluoreszenz 2 Stunden mit 1:20 verdünntem Dextran-Rhodamin in Kulturmedium vorbehandelt bei 37 °C und 5% CO₂.

Filipin-Färbung:

Cholesterin lässt sich mit Filipin darstellen. Filipin wird 1:5 in PBS verdünnt eingesetzt und die Zellen 20 min inkubiert. Anschließend werden die Zellen gewaschen und eingebettet.

O10-Färbung:

Der O10-Anti-PLP-Antikörper bindet nur an PLP, das sich an der Oberfläche der Zelle befindet. O10-Antikörper wird nach 2 x waschen der Zellen mit PBS für 45 min auf die Zellen gegeben (1:50 in 0,1%-igem BSA/PBS). Die Inkubation

muss auf Eis durchgeführt werden, um Endozytose zu verhindern. Anschließend wird 3 x für 5 min mit kaltem PBS gewaschen und die Zellen auf Eis fixiert. Nach erneutem Waschen werden die Zellen bei Raumtemperatur mit dem zweiten Antikörper gefärbt. (Anti-Maus-IgM).

2.6.2 Gewinnen von Zelllysat

Zellen werden in 6-well-Platten, 3 oder 5 cm-Schalen kultiviert und transfeziert. Nach 12/24 Stunden werden die Zellen mit PBS gewaschen, mit 100 µl Lysispuffer (mit Proteaseinhibitor) gekratzt und in ein Eppendorffgefäß überführt. Nach 10-minütiger Inkubation auf Eis werden die Zellkerne abzentrifugiert (2 min, 3 000 rpm, 4 °C) und mit dem Überstand weiter gearbeitet.

2.6.3 CHAPS-Extraktion

Die Zellen werden in 5 cm-Schalen kultiviert. Zuerst werden die Zellen gewaschen, in 50 µl TE-Puffer auf Eis gekratzt und in ein Eppendorffgefäß überführt. Nun wird ein Zehntel des erhaltenen Volumens 10-fach-CHAPS-Lösung zugegeben. (Endkonzentration 20 mM). Nach 30 min Extraktionszeit bei 4 °C und vorsichtigem Schütteln wird die CHAPS-lösliche Fraktion von dem unlöslichen Anteil durch Zentrifugieren für 30 min bei 4°C und 13 000 rpm getrennt. Der Überstand wird abgenommen und entspricht dem löslichen Anteil, das Pellet enthält die unlösliche Fraktion und Zellkerne. Zum Überstand wird soviel 10%iges SDS gegeben, dass die SDS-Endkonzentration 1% beträgt. Das Pellet wird im gleichen Volumen wie der Überstand mit 1%igem SDS resuspendiert. Die DNA im Pellet muss mit einer gelben Pipette dann mit einer Kanüle (22G) durch jeweils 20 x aufziehen zerstört werden.

2.6.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mit der SDS-PAGE werden Proteingemische nach ihrer Größe aufgetrennt. Die SDS-PAGE ist eine denaturierende, diskontinuierliche Elektrophorese-methode bei der das Polyacrylamidgel aus zwei Anteilen besteht. Im oberen weitporigen

Sammelgel werden die Proteine fokussiert und im engmaschigen Trenngel nach ihrer Grösse aufgetrennt. Die Eigenladung der Proteine wird durch anionische Detergens SDS überdeckt und hat somit keinen Einfluss auf die Wanderstrecke der Proteine im elektrischen Feld.

Die Proben werden mit Lämmli-puffer für 10 min auf 55 °C (P6) oder 5 min 95°C (MOG) erwärmt, wobei das DTT Disulfidbrücken spaltet und die Struktur durch SDS denaturiert wird. Die gegossenen Gele werden in die Elektrophoresekammer gespannt und mit Puffer bedeckt. Nach dem Aufladen der vorbehandelten Proteine werden etwa 100 V angelegt, um während der Wanderung durch das Sammelgel eine gute Fokussierung zu erreichen. Im Trenngel kann die Spannung erhöht werden (auf 200 V). Um das Molekulargewicht abschätzen zu können, wird gleichzeitig ein Proteinstandard mit aufgetrennt.

Gele giesen: Die Glasplatten werden mit Ethanol gereinigt und in die Vorrichtung gespannt. Das Trenngel wird pipettiert. Temed und APS werden als letztes zugegeben, weil sie die Polymerisierungsreaktion starten. Nachdem man das Trenngel zwischen die Platten gefüllt hat, wird es mit Isopropanol überschichtet. Das Gel polymerisiert innerhalb der nächsten Stunde. Das Isopropanol wird entfernt und das Sammelgel eingefüllt.

Die Gele können bei 4 °C für maximal eine Woche gelagert werden.

12-%iges Trenngel:	Wasser	16,5 ml
	30% Acrylamid-Mix	20 ml
	1,5 M Tris pH 8,8	12,5 ml
	10 % SDS	500 µl
	10 % APS	500 µl
	Temed	20 µl
Sammelgel:	Wasser	14 ml
	30% Acrylamid-Mix	3,3 ml
	1 M Tris pH 6,8	2,5 ml
	10 % SDS	200 µl
	10 % APS	200 µl
	Temed	20 µl

2.6.5 Westernblot

Die mit SDS-PAGE aufgetrennten Proteine werden auf Nitrozellulose-oder PVDF Membranen transferiert und immobilisiert. Der Transfer erfolgt in einem Wetblotsystem für 2 Stunden bei 200 mA mit folgendem Aufbau: Schwamm, zwei in Transferpuffer getränkte Whatmanpaper, Membran (PVDF-Membran wird vorher in Methanol getränkt), Gel, zwei nasse Whatman-Papiere, Schwamm. Zwischen Membran und Gel dürfen sich keine Luftblasen befinden, um die Übertragung nicht zu stören. Im mit Blotpuffer gefüllten Tank wird die Seite mit der Membran an die Anode gelegt, das Gel befindet sich an der Kathode. Die Proteinbanden färbt man anschließend 2 min mit Ponceau-S-Lösung an. Durch Waschen mit destilliertem Wasser wird die Membran wieder entfärbt. Mit 5%-iger Milchpulverlösung (30 min Raumtemperatur) werden unspezifische Bindungsstellen abgesättigt. Über Nacht wird der Blot mit dem Primärantikörper in Milchlösung bei 4 °C inkubiert. Nachdem man jeweils 10 min mit TBS/TBS-T/TBS gewaschen hat, wird der in Milchpulverlösung verdünnte Sekundärantikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur dazugegeben. Wieder wird für 10 min mit TBS, 10 min TBS-T und 2 x 5 min TBS gewaschen. An den Sekundärantikörper ist eine Meerrettich-Peroxidase gebunden, mit deren Hilfe man die Proteinbande detektiert. Dazu werden die beiden ECL-Reagenzien zu gleichen Teilen auf die Membran gegeben. Peroxidase spaltet Peroxid unter Bildung hochreaktiver Sauerstoffradikale, welche Luminol (ein Chromogen) oxidieren. Mit der vom angeregten Luminol emittierten Chemiluminiszenz wird ein Röntgenfilm belichtet und entwickelt.

Tab. 2.4: Im Westernblot verwendete Primär- und Sekundärantikörper

P6 (gegen PLP)	1:1000	polyklonal
myc	1:1000	monoklonal
MBP	1:2000	monoklonal
MOG	1:2000	monoklonal
α -Kanninchen IgG HRP	1:5000	
α -Maus IgG HRP	1:5000	

2.6.6 Ko-Immunopräzipitation

Für die Ko-Immunopräzipitation werden primäre Oligodendrozyten bzw transfertierte BHK-Zellen in 5 cm-Schalen kultiviert und ein Zelllysat mit 1,2% NP-40, 1,2% Triton X-100, 0,1% SDS, 50 mM Tris (pH 7,5) mit 10 µg/µl Chymostatin, Leupeptin, Anti-Papain und Pepstatin hergestellt. Das Lysat wird 5 min bei 3.000 rpm zentrifugiert, um die Zellkerne zu entfernen. Zum Überstand werden der entsprechende Antikörper in einer Verdünnung 1:100 gegeben (MOG oder P6) und Protein A-Sepharose bzw. A/G-Agarose. Über Nacht wird der Ansatz bei 4°C über Kopf geschüttelt. Zum Waschen wird zuerst zentrifugiert (Agarose: 13000 rpm, 2 min; Sepharose 3000 rpm 2 min), dann der Überstand mit einer ausgezogenen Pipettenspitze abgesaugt, 500 µl Waschpuffer dazugegeben und gevortext (alles auf Eis, um Proteolyse zu vermeiden). Die ersten zwei Waschschrirte erfolgen mit dem Puffer, mit dem lysiert wurde (mit 0,5 M NaCl), dann mit 150 mM NaCl und 50 mM Tris (pH 7,5) und zuletzt mit 50 mM Tris (pH 7,5). Die Proben werden in 30 µl Lämmli-Puffer aufgenommen und bei 55°C 10 min gekocht bzw. bei 95°C 5 min und anschließend mit SDS-PAGE aufgetrennt und ein Westernblot mit den jeweiligen Antikörpern durchgeführt.

2.7 Verwendete Puffer und Medien

LB-Medium	20 g/l LB Broth Base
50x TAE-Lösung	40 mM Tris 20 mM Natrium-Acetat 1 mM EDTA pH mit Eisessig auf 7,5 einstellen
6x Ladepuffer	0,2 % Bromphenolblau 60 % Glycerin 60 mM EDTA
Insulin-Lösung	0,1 g Insulin 200 µl 1 N HCl in 10 ml Wasser
Putrescine-Lösung	0,161 g Putrescine in 10 ml Wasser
Progesteron-Lösung	0,062 g in 100 ml 96% Ethanol
Tri-Iodo-Thyrodin-Lösung	0,034 g TIT in 10 ml 96 % Ethanol
Na-Selenit-Lösung	0,052 g Selenit in 10 ml PBS davon 100 µl in 9,9 ml PBS
L-Thyroxin-Lösung	0,062 g L-Thyroxin 0,104 g NaOH 14 ml 70 % Ethanol 6 ml Wasser
Gentamicin-Lösung	100 mg in 2 ml PBS
Apo-Transferrin-Lösung	50 mg in 10 ml Wasser
Sato+1 % HS	in 500 ml DMEM: 500 µl Insulin-Lösung 500 µl Putrescine-Lösung 50 µl Progesteron-Lösung 50 µl TIT-Lösung 370 µl Na-Selenit-Lösung 65 µl L-Thyroxin-Lösung 250 µl Gentamicin-Lösung 1 ml Apo-Transferrin-Lösung 5 ml inaktiviertes Pferdeserum (HS) pH auf 6,95 mit konz. HCl einstellen steril filtrieren
Trypsin-Lösung	1 ml 1 M HEPES 1 ml Penicillin-Streptomycin-Zusatz 100 ml Trypsin-EDTA Aliquots werden bei -20 °C gelagert
Trypsin low	0,01 % Trypsin 0,02 % EDTA (Trypsin-Lösung 1:5 verdünnen + 8 mg EDTA für 50 ml Trypsin low)
PBS	8 g NaCl 0,2 g KCl 1,44 g Na ₂ HPO ₄ • 7 H ₂ O 0,24 g KH ₂ PO ₄

	in 1 l Wasser
	pH auf 7,4 einstellen
Blocklösung für IF	2 % fötales Kälberserum (FCS)
	3 % Rinderserum-Albumin
	0,2 % Fischgelatine
	in PBS
Einbettmedium	2,4 g Mowiol
	6 g Glycerin
	→ 10 min rühren
	6 ml Wasser
	→ Über Nacht stehen lassen
	12 ml 0,2 M Tris pH 8,5
	→ 10 min bei 50 °C
	2,5 % DACO (bei 37 °C)
	→ 15 min zentrifugieren bei 5 000 g
	Aliquots werden bei -20 °C gelagert
Lysispuffer	1 % NP-40
	50 mM Tris-HCl
	150 mM NaCl
	2 mM EDTA
	pH auf 7,5 einstellen
TE	10 mM Tris-HCL pH 8,0
	1 mM EDTA
10x Laufpuffer (SDS-PAGE)	0,25 M Tris
	1,92 M Glycin
	1 % SDS
4x Lämmli-puffer	8 % SDS
	200 mM Tris-HCL pH 6,8
	40 % Glycerin (v/v)
	0,1 % Bromphenolblau
	10 % β-Mercaptoethanol oder DTT
Transferpuffer (Westernblot)	20 mM Tris
	150 mM Glycin
	0,02 % SDS
	20 % Methanol
Ponceau-S-Lösung	0,2 % (w/v) Ponceau S
	3 % TCA (w/v) in Wasser
10x TBS	100 mM Tris
	1,5 M NaCl
	pH mit konz. HCl auf 7,2 einstellen
TBS-T	TBS mit 0,05 % Triton X-100

2.8 Chemikalien und sonstige Verbrauchsmaterialien

30% Acrylamid-Mix	Invitrogen
Agar	Serva
Ampicillin	Roche
β -Cyclo-Dextrin	Sigma
β -Mercaptoethanol	Sigma
CHAPS	Sigma
Chemokompetente E.coli	Invitrogen
Dextran-Rhodamin	Molekular Probes
DMEM	Invitrogen
DNA-Leiter	NEB
ECL	Amersham Pharmacia
Ethanol	Merck
Ethidiumbromid	Fluka
EDTA	Sigma
FCS	PAA Laboratories GmbH
Filipin	Sigma
FuGene	Roche Molecular Biochemicals
Glutamin	GIBCO-BRL
Glycerin	Merck
GMEM	GIBCO-BRL
Hyperfilm	Amersham Pharmacia
Isopropanol	Riedel
Mowiol	Calbiochem
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva
Nitrozellulosemembran	Schleicher & Schuell
Nonidet P 40 (NP40)	Fluka
Penicillin	GIBCO-BRL
Phalloidin-Rhodamin	Molekular Probes
Poly-L-Lysin	Sigma
Ponceau S	Merck
Primer	MWG-AG Biotech
Protease-Inhibitor-Cocktail	Roche
Protein A- Sepharose	Roche
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
QIAGEN Maxiprep Kit	Qiagen
Restriktionsenzyme	NEB
Rinderserum-Albumin (BSA)	Calbiochem
Steritop	Millipore
Streptomycin	GIBCO-BRL
Temed	Roth
TritonX100	Serva
Trypsin	Sigma
Whatman Paper	Multimed

2.9 Antikörper

Primärantikörper:

Monoklonal:

α -myc

MOG (Klon 8-18C5)

O10

MBP

Polyklonal:

P6 (gegen den
C-Terminus von PLP)

Calnexin

α -Aktinin

Sigma

Bereitgestellt von C. Linnington

Bereitgestellt von Kuhlmann-Krieg (1988)

Bereitgestellt von C. Linnington

Bereitgestellt von C. Linnington

Bereitgestellt von Molinari und Helenius

Sigma

Sekundärantikörper:

für Westernblot:

α -mouse-HRP

α -rabbit-HRP

für Immunfluoreszenz:

α -mouse-FITCS/CY2/CY3

α -rabbit-CY2/CY3

Amersham Pharmacia

Amersham Pharmacia

Dianova

Dianova

3 Ergebnisse

3.1 Die Bedeutung der Palmitoylierung von PLP in seiner Protein-Lipid-Interaktion

3.1.1 Klonierung der PLP/DM20-Konstrukte

Es sind bereits mehrere Signale für die Sortierung von Proteinen in Rafts und damit in bestimmte Membrandomänen bekannt: GPI-Anker, dicht nebeneinanderliegende Palmitoylierung, Transmembrandomänen oder die Bindung an Cholesterin. PLP besteht aus vier Transmembrandomänen und ist an mehreren Stellen palmitoyliert (Position 5, 6, 9, 108, 138 und 140). Um zu untersuchen, ob die Palmitoylierung von PLP eine Rolle in der Assoziation mit „Myelinrafts“ und damit in seiner Sortierung spielt, wurden verschiedene Palmitoylierungsdefiziente PLP/DM20-Konstrukte hergestellt. PLP enthält insgesamt sechs Zysteine, die kovalent an Fettsäuren gebunden sind. DM20, der kurzen Form von PLP, fehlen die Aminosäuren von Position 116 bis 150 und somit zwei der palmitoylierten Zysteine.

In dieser Arbeit wurden die Zysteine nun an unterschiedlichen Positionen durch Serine ersetzt, um eine Thiolbindung mit Palmitoyle Säure zu verhindern. Serin wurde aufgrund seiner Ähnlichkeit zu Zystein gewählt (der einzige Unterschied besteht in einer OH-Gruppe anstelle der SH-Gruppe), um mit den Mutationen die Struktur von PLP so wenig wie möglich zu ändern.

Folgende sechs Konstrukte wurden hergestellt (siehe Abb. 3.1):

Bei Konstrukt 1 und 2 handelt es sich jeweils um die Wildtyp-Formen von PLP und DM20, denen ein myc-Tag angehängt wurde, um sie von endogenem PLP/DM20 zu unterscheiden.

Bei Konstrukt 3 (DM20- Δ cys3-myc) und 5 (PLP- Δ cys3-myc) wurden die ersten drei Zysteine mit PCR durch Serine ersetzt, zunächst in den Klonierungsvektor pGemt eingefügt und anschließend in den Expressionsvektor pR4 und in SFV kloniert.

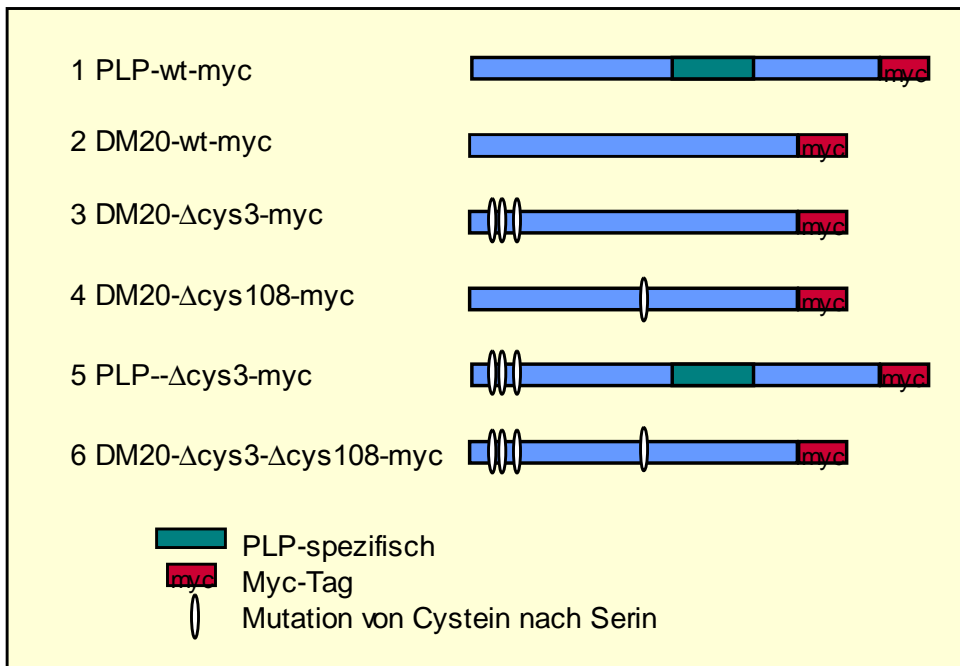


Abb. 3.1: Hergestellte Konstrukte

Folgende Plasmide wurden verwendet: PLP-wildtyp und DM20-wildtyp, jeweils mit einem myc-Tag versehen, um die transfizierten Proteine vom endogenen PLP/DM20 zu unterscheiden. Außerdem wurden vier veränderte Konstrukte der beiden Proteine kloniert: Bei Δcys3 wurden die ersten drei Zysteine in Serine geändert, bei Δcys108 das Zystein an Position 108. DM20- Δcys3 - Δcys108 -myc besitzt keine Zysteine mehr, an die eine Palmitoyle Säure binden könnte.

In Konstrukt 4 (DM20- Δcys108 -myc) wurde die Aminosäure an Position 108 mit PCR so verändert, dass ein Serin entsteht. Dem Konstrukt 6 (DM20- Δcys3 - Δcys108 -myc) fehlen alle vier Zysteine, an die eine Palmitoyle Säure binden könnte. Alle Konstrukte wurden zuerst im Klonierungsvektor pGemt hergestellt und anschließend mittels Restriktionsverdau und Ligation in den Expressionsvektor pR4 und Semliki-Forest-Virus kloniert.

Der Semliki-Forest-Virus ist ein Einzelstrang-RNA-Virus aus der Familie der Togaviridae. Das abgeänderte SFV-Expressionssystem wird häufig verwendet, um heterologe Proteine in eukaryonten Zellen zu exprimieren. Der Vorteil ist, dass man eine hohe Transfektionseffizienz erreicht, Proteine überexprimieren kann und z. B. auch primäre Zellen oder Zelllinien, die mit anderen Transfektionsmethoden nicht zugänglich sind, gut infizieren kann. Das Expressionssystem setzt sich zusammen aus einem Expressionsvektor und einem Helferplasmid. Der Expressionsvektor besteht aus der defekten cDNA von SFV ohne des-

sen Strukturproteine. Hinter den Promotor wird die DNA des gewünschten Proteins kloniert. Das Helferplasmid wird von den SFV Strukturproteinen und einem SP6-Promotor gebildet. Das Helferplasmid und der Expressionsvektor werden zunächst linearisiert, anschließend *in vitro* in die RNA transkribiert und schließlich in eukaryote Zellen kotransfiziert, die rekombinantes SFV ins Medium abgeben.

3.1.2 Expression der Konstrukte in BHK

Um sicherzustellen, dass alle Konstrukte exprimiert werden, wurden zunächst BHK-Zellen mit dem pR4-Vektor transfiziert, nach 24 Stunden ein Zelllysate hergestellt und anschließend ein Westernblot mit dem monoklonalen myc-Antikörper durchgeführt. BHK-Zellen sind eine Fibroblastenzelllinie, die keine endogenen Myelinproteine bilden und leicht mit Fugene zu transfizieren sind. Bei 20 bzw. 24 kDa waren Banden zu sehen, die den Grössen von PLP und DM20 entsprachen. Als Negativkontrolle wurde ein nicht transfiziertes Zelllysate verwendet.

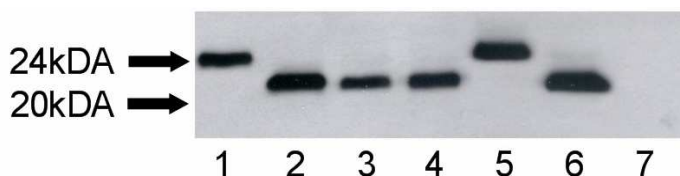


Abb. 3.2: Westernblot mit den sechs Plasmiden in transfizierten BHK-Zellen

BHK-Zellen wurden mit den sechs Plasmiden transfiziert, ein Zelllysate hergestellt und ein Westernblot mit myc-Antikörper und anschließend dem Anti-Mouse-Antikörper durchgeführt. Konstrukte 1 und 5 sind PLP-Plasmide, die auf der Höhe von 24 kDa wandern. 2,3,4 und 6 sind DM20-Konstrukte, die sich etwa auf der Höhe von 22 kDa befinden (siehe Abb. 3.1). Nummer 7 ist die Negativkontrolle mit untransfizierten Zellen.

Die Ergebnisse der Immunfluoreszenz zeigten ebenso wie der Westernblot, dass alle sechs Konstrukte exprimiert werden (siehe Abb. 3.3). Für den Versuch wurden BHK-Zellen mit den sechs Plasmiden transfiziert und nach 24 Stunden immungefärbt. Nicht transfizierte Zellen dienten als Negativkontrolle.

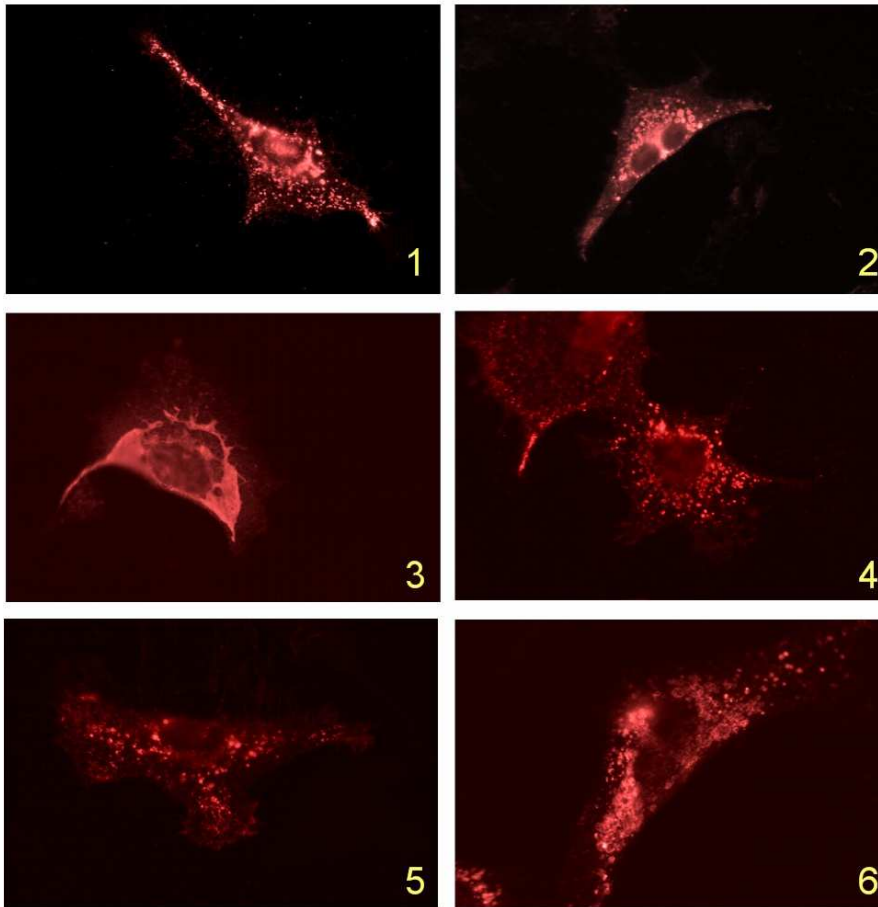


Abb. 3.3 Immunfluoreszenz mit den sechs Plasmiden in BHK-Zellen

Die sechs Konstrukte wurden in BHK-Zellen transfeziert und nach 24 Stunden immungefärbt. myc-Antikörper wurde als Primärantikörper verwendet, Anti-mouse-cy3 als Sekundärantikörper. Eine Negativkontrolle mit nicht-transfezierten Zellen zeigte keine Färbung. Bilder 1 und 5 zeigen wieder die PLP-Konstrukte, Bilder 2, 3, 4 und 6 die jeweiligen DM20-Konstrukte.

3.1.3 Lokalisation der unterschiedlichen PLP-Mutanten in BHK-Zellen

In der Immunfluoreszenz (siehe Abb. 3.3) fand sich eine unterschiedliche Verteilung der Mutanten innerhalb der Zelle. Die genaue Verteilung der unterschiedlichen Konstrukte innerhalb der Zelle wurde nun mit Ko-Färbungen untersucht, um Differenzen zwischen den Mutationen in der Sortierung auf morphologischer Ebene zu erkennen.

Dazu wurden BHK-Zellen transfeziert und 24 Stunden später die Versuche durchgeführt. Für die Darstellung der PLP/DM20-Konstrukte wurde der monoklonale myc-Antikörper verwendet und zusätzlich einzelne Zellkompartimente

mit spezifischen Markern angefärbt. Calnexin ist ein Marker für das ER, während mit Dextran das Endosomale/Lysosomale System sichtbar gemacht werden kann. Das Antibiotikum Filipin färbt Cholesterin. Oberflächliches PLP wird mit dem O10-Antikörper gezeigt.

Es fand sich folgende Verteilung (siehe Tab. 3.1): PLP-wt-myc (Konstrukt 1) und DM20-wt-myc (Konstrukt 2) sind wie erwartet in Endosomen, Lysosomen und an der Zelloberfläche zu finden und kolokalisieren außerdem mit Cholesterin. Die myc-„getaggte“ Form von PLP und DM20 zeigte eine ähnliche Verteilung wie die nicht-„getaggte“ Form. Damit konnte ausgeschlossen werden, dass der myc-Tag den Transport beeinträchtigt. DM20- Δ cys108-myc (Konstrukt 4) und PLP- Δ cys3-myc (Konstrukt 5) kolokalisieren genau wie die Wildtyp-Formen mit Dextran und Filipin und konnten mit dem O10-Antikörper an der Oberfläche angefärbt werden. Im Gegensatz dazu bleibt DM20- Δ cys3-myc (Konstrukt 3) im ER und wird nicht weitertransportiert. Das ER sieht verändert aus: Es verliert seine retikuläre Struktur und stellt sich flächig dar. DM20- Δ cys3-myc zeigt keinerlei Kolokalisierung mit den anderen Markern. Dagegen wird DM20- Δ cys3- Δ cys108-myc (Konstrukt 6) bis an die Oberfläche transportiert und ist ebenfalls in Endosomen und Lysosomen nachzuweisen.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die N-terminale Palmitoylierung von DM20 für die Faltung des Proteins entscheidend ist. Erstaunlicherweise kommt es jedoch durch die Entfernung einer zusätzlichen Palmitoylierungsstelle (cys108) wieder zu einer korrekten Faltung.

Tab. 3.1: Verteilung der PLP/DM20-Proteine in transfezierten BHK-Zellen

BHK-Zellen wurden transfeziert und nach 24 Stunden mit myc-Antikörpern und einem jeweiligen anderen Primärantikörper angefärbt bzw. mit anderen Reagenzien inkubiert, um mögliche unterschiedliche Lokalisationen der jeweiligen Proteine innerhalb der Zelle zu untersuchen. Für das ER wurden Calnexin-Antikörper verwendet. Filipin färbt Cholesterin an und wurde nach Fixation und Inkubation mit Primär- und Sekundärantikörper für 20 min den Zellen zugesetzt. Der O10-Antikörper zeigt PLP/DM20 an der Zelloberfläche. Für die Darstellung des endozytischen Kompartimentes wurden die Zellen vor dem Fixieren für zwei Stunden mit Dextran inkubiert.

+ : Kolokalsierung

- : Keine Kolokalsierung

Δ cys3 / Δ cys108: Mutation an der jeweiligen Position von Zystein nach Serin

myc: angehängter myc-Tag

wt: Wildtypform der Proteine

	Dextran	Calnexin	O10	Filipin
1 PLP-wt-myc	+	-	+	+
2 DM20-wt-myc	+	-	+	+
3 DM20- Δ cys3-myc	-	+	-	-
4 DM20- Δ cys108-myc	+	-	+	+
5 PLP- Δ cys3-myc	+	-	+	+
6 DM20- Δ cys3- Δ cys108-myc	+	-	+	+

3.1.4 CHAPS-Extraktion in Oli-neu-Zellen

Um zu untersuchen, ob die Palmitoylierung von PLP und DM20 die Löslichkeit in CHAPS und damit die Assoziation mit „Myelinrafts“ ändert, wurden Oli-neu-Zellen mit den hergestellten Konstrukten in SFV infiziert. Anschließend wurde nach 12 Stunden post-Infektionszeit die CHAPS-Extraktion durchgeführt. CHAPS ist ein nichtionisches Detergens, mit dem man detergentenunlösliche Membrandomänen (DRM's) bei 4°C isolieren kann. Man nimmt an, dass diese CHAPS-DRMs „Myelinrafts“ entsprechen, und CHAPS somit die Protein-Lipid-Interaktion zwischen PLP/DM20 und den Myelinlipiden nicht auflösen kann. Oli-neu-Zellen entsprechen zwar nicht-differenzierten primären Oligodendrozyten, besitzen jedoch Myelinlipide und sind somit ein geeignetes Zellkulturmodell.

Die CHAPS-Extraktionen wurden nach einer 30-minütigen Extraktionszeit zentrifugiert und damit in eine detergensunlösliche (Pellet) und detergenslösliche Fraktion getrennt (Überstand). Danach wurden die Fraktionen elektrophoretisch aufgetrennt und im Westernblot angefärbt. Das Pellet enthält die unlöslichen Anteile und das Zytoskelett, der Überstand dagegen die CHAPS-löslichen Proteine.

Da für PLP schon gezeigt wurde, dass es CHAPS-unlöslich ist und im Dichtegradienten flottiert, war es nicht mehr notwendig, die Optiprep-Dichtezentrifugation durchzuführen. Der Vorteil, die CHAPS-Extraktion mit der hier verwendeten einfachen Zentrifugation in nur zwei Fraktionen zu teilen, besteht darin, dass in den einzelnen Fraktionen mehr Protein vorhanden ist, und sie somit besser vergleichbar sind.

Die Abbildung 3.4 zeigt einen repräsentativen Versuch. Das Experiment wurde für die vorliegende Doktorarbeit in dieser Form viermal durchgeführt. Zusätzlich wurden in unserem Labor CHAPS-Extraktionen mit denselben Konstrukten sowohl in Oli-neu-Zellen (mit anschließendem Dichtegradienten) als auch an primären Zellen mehrfach wiederholt.

Das Pellet wurde in Verhältnis gesetzt zu Überstand und Pellet zusammen. Der somit erhaltene prozentuale Anteil von unlöslichem PLP/DM20 wurde zwischen den einzelnen Konstrukten verglichen. Es zeigte sich kein wesentlicher Unterschied. Insgesamt scheint die Palmitoylierung keine bedeutende Rolle in der Assoziation von PLP mit DRMs zu haben.

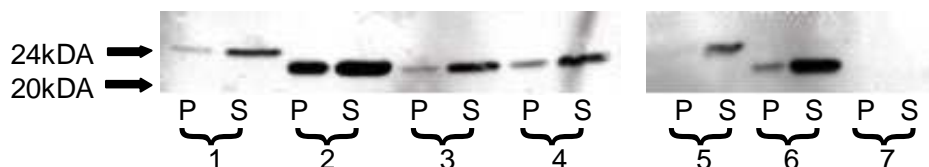


Abb. 3.4 CHAPS-Extraktion in Oli-neu-Zellen

Oli-neu-Zellen wurden mit dem SFV mit den jeweiligen Konstrukten 1 Stunde infiziert, nach 12 Stunden wurde ein Zelllysate hergestellt, 30 min mit CHAPS bei 4°C extrahiert und anschließend 30 min zentrifugiert. Das Pellet (P) und der Überstand (S) wurden auf ein Gel aufgetragen und ein Westernblot mit myc-Antikörpern durchgeführt. Nummer 1 - 6 sind die jeweiligen Konstrukte, Nummer 7 ist ein nicht transfeziertes Zelllysate.

3.2 Weitere Sortierungssignale

3.2.1 Dileucin-Signal in der Sortierung von PLP

Bei den Immunfluoreszenzen (siehe Abb. 3.3) zeigte sich, dass PLP/DM20 in BHK-Zellen hauptsächlich in Endosomen/Lysosomen zu finden ist. Ein bekanntes lysosomales Sortierungssignal ist ein Dileucin-Motiv am N-terminalen Ende eines Proteins. Auch PLP/DM20 haben an Position 2 und 3 Leucine. Um zu untersuchen, ob der Transport der beiden Proteine durch das Dileucin verändert wird, wurden zwei weitere Konstrukte hergestellt. Sowohl bei PLP-wt-myc als auch bei DM20-wt-myc wurde mit einer PCR die Leucine in Alanine verändert und wieder von pGemt in pR4-Vektor kloniert (siehe Abb. 3.5).

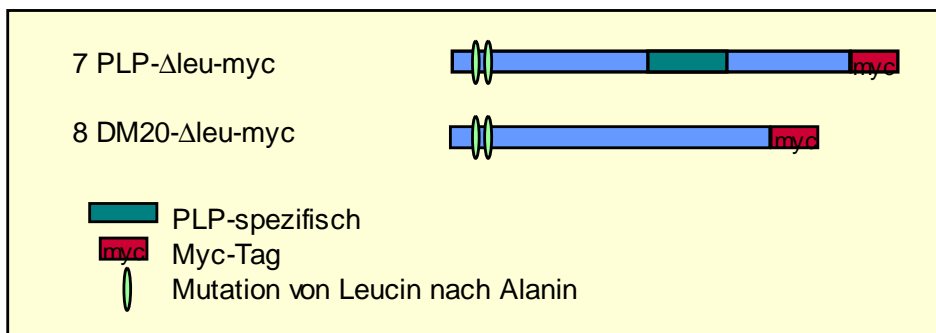


Abb. 3.5: Hergestellte Konstrukte mit Δ Leu-Mutation

Mittels PCR wurden in PLP-wildtyp-myc und DM20-wildtyp-myc die Leucine an Position 2 und 3 in Alanine verändert. Die Konstrukte wurden zuerst in pGemt kloniert und anschließend in den pR4-Vektor eingebracht.

Um Veränderungen in der Verteilung herauszufinden, wurden die zwei Konstrukte in BHK-Zellen transfeziert und mit den wildtyp-Konstrukten verglichen. Nach 24 Stunden wurden Immunfluoreszenzen mit myc-Antikörper und Ko-Färbungen durchgeführt: Beide Konstrukte wurden exprimiert. Ko-Färbungen mit allen Markern zeigten, dass beide mit Dextran, O10 und Filipin, jedoch nicht mit Calnexin kolokalisieren. Somit ergab sich eine ähnliche und von den wildtyp-Formen nicht unterscheidbare Verteilung.

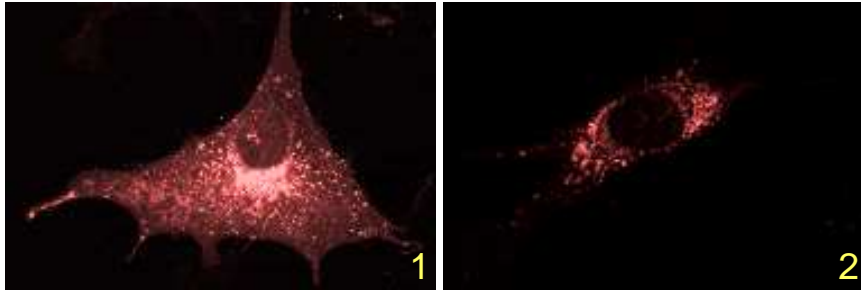


Abb. 3.6: Immunfluoreszenz mit PLP/DM20-Δleu-myc

BHK-Zellen wurden transfeziert und nach 24 Stunden mit myc-Antikörpern angefärbt. Nicht transfezierte Zellen zeigten nach der Färbung kein Signal.

1= PLP-Δleu-myc

2= DM20-Δleu-myc

Tab. 3.2: Verteilung von PLP/DM20-Δleu-myc

BHK-Zellen wurden wieder mit PLP-Δleu-myc und DM20-Δleu-myc transfeziert, nach 24 Stunden mit myc-Antikörper angefärbt und zusätzlich noch mit anderen Antikörpern/Reagenzien inkubiert. Dextran zeigt das endozytische Kompartiment, Calnexin das ER. O10 färbt PLP an der Zelloberfläche und Filipin stellt Cholesterin dar.

+ : Kolo-kalisierung

- : Keine Kolo-kalisierung

Δleu: Mutation von Leucin nach Alanin

myc: angehängter myc-Tag

	Dextran	Calnexin	O10	Filipin
7 PLP-Δleu-myc	+	-	+	+
8 DM20-Δleu-myc	+	-	+	+

3.3 Protein-Protein-Interaktionen in der Sortierung von PLP

3.3.1 MOG und PLP bilden spezifische Komplexe in Oligodendrozyten

Um herauszufinden, ob Protein-Protein-Interaktionen eine Rolle in der Sortierung von PLP spielen, wurde zuerst getestet, ob PLP mit anderen Myelinproteinen interagiert. Das zweite Myelinhauptprotein ist MBP (~35% aller Myelinproteine). Um zu sehen, ob die beiden einen Komplex bilden, wurden Ko-Immunopräzipitationen (IP) an primären Oligodendrozyten durchgeführt.

Zuerst wurden aus 4 - 6 Tage alten Zellen Zelllysate hergestellt, über Nacht mit dem polyklonalen P6 Antikörper (anti-PLP) und Sepharose A inkubiert, am nächsten Tag gewaschen und die anschließenden Westernblots mit unterschiedlichen Antikörpern angefärbt.

Es zeigte sich, dass PLP und MBP in diesen Zellen nicht ko-immunopräzipitieren, aber überraschenderweise ko-immunopräzipitieren PLP und MOG (Abb. 3.7 A). Um unspezifische Interaktionen mit der Sepharose oder Hintergrund durch den Antikörper auszuschließen, wurden die IP's sowohl mit als auch ohne Antikörper und Zelllysate durchgeführt (in der Abbildung durch +/- angezeigt).

PLP und MOG sind beide in CHAPS-DRM's zu finden. Um herauszufinden, ob es sich um eine Lipid-Protein- oder Protein-Protein-Interaktion handelt, wurden in Abb. 3.7 B die Zellen vor der IP mit 5 mM Methyl- β -Cyclodextrin für 30 Minuten behandelt. Dieser Stoff entzieht den Zellen Cholesterin und zerstört die vorhandenen Rafts. Auch hier ko-immunopräzipitieren MOG und PLP. Dies legt nahe, dass es sich um eine spezifische Protein-Protein-Interaktion und nicht um eine Lipid-Protein-Interaktion handelt.

Um festzustellen, ob beide Proteine auch in einer Zelllinie interagieren, wurden PLP und MOG in BHK-Zellen kotransfiziert und 24 Stunden später eine Ko-IP durchgeführt (Abb.7 C). Auch hier zeigte sich wieder eine deutliche Interaktion von MOG und PLP.

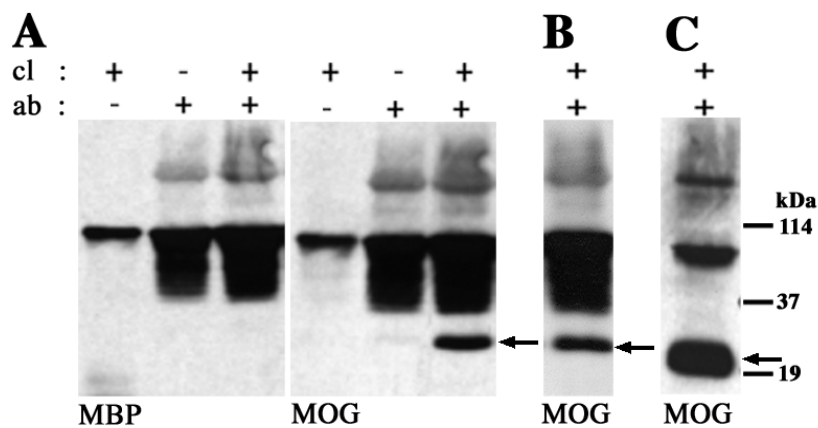


Abb. 3.7: Ko-Immunopräzipitation von PLP und MOG

A Mit Zelllysaten aus primären Oligodendrozyten wurden Ko-Immunopräzipitationen durchgeführt. Für die IP wurde der P6-Antikörper gegen PLP verwendet, die anschließenden Westernblots jeweils mit MBP- oder MOG-Antikörpern angefärbt. Um unspezifische Färbung zu unterscheiden, wurden die IP's jeweils mit und ohne Antikörpern und Zelllysate (wie über den Banden angegeben) durchgeführt. Der Pfeil zeigt die MOG-Bande.

B Hier wurde den Zellen vor der IP mit 5mM Cyclodextrin für 30 Minuten Cholesterin entzogen. Der Pfeil zeigt auch hier auf die MOG-Bande.

C BHK-Zellen wurden vor der Ko-IP mit MOG und PLP kotransfiziert. Die IP wurde mit P6 durchgeführt, der Westernblot mit MOG-Antikörper. Der Pfeil deutet wieder auf die MOG-Bande.

Cl: Zelllysate; ab: Antikörper

In einem weiteren Versuch wurde an 4 - 6 Tage alten primären Oligodendrozyten eine Ko-Immunopräzipitation durchgeführt, jedoch in umgekehrter Form: Die IP wurde mit dem MOG-Antikörper durchgeführt, der Westernblot mit P6-Antikörper. Über Nacht wurden die Zelllysate mit MOG-Antikörper und Beads inkubiert und der Westernblot mit Antikörpern gegen PLP (P6-Antikörper) durchgeführt. Um den Hintergrund, der durch unspezifische Interaktion mit der Agarose entsteht, von den eigentlichen Banden zu unterscheiden, wurde wieder eine IP mit Beads und Zelllysate ohne Antikörper durchgeführt. Als Positivkontrolle diente ein Zelllysate ohne IP. Auch in diesem umgekehrten Versuch zeigt sich eine deutliche PLP-Bande im Vergleich zur Kontrolle: Ein weiterer Hinweis auf eine Interaktion.

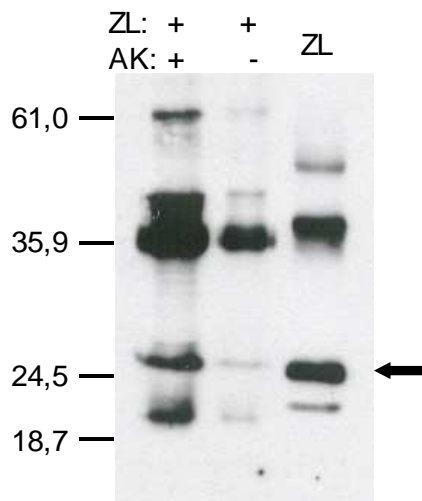


Abb. 3.8: Ko-Immunopräzipitation mit MOG- und P6-Antikörpern

Aus primären 4 - 6 Tage alten Oligodendrozyten wurden Zelllysate hergestellt, IP's mit und ohne MOG-Antikörper (wie angegeben) durchgeführt und im Westernblot mit P6-Antikörper angefärbt. Der Pfeil zeigt auf die PLP-Bande. Als Positivkontrolle diente ein Zelllysate.

ZL: Zelllysate; AK: Antikörper

Nachdem die IP's deutliche Hinweise auf eine Interaktion zwischen PLP und MOG gaben, wurde überprüft, ob diese in Oligodendrozyten kolokalisieren. Dazu wurden primäre Oligodendrozyten fixiert und mit MOG und PLP-Antikörpern angefärbt. Zuvor wurde in transfezierten BHK-Zellen ausgeschlossen, dass die beiden Antikörper kreuzreagieren. Es zeigte sich hier eine partielle Kolokalisation zwischen PLP und MOG (Abb. 3.9 A).

Auffällig war, dass sich diese Komplexe vor allem an Verzweigungsstellen als lokale Anreicherungen fanden. Weitere Versuche mit Phalloidin-Rhodamin zeigten, dass in diesen Stellen auch Aktin vorhanden ist (Abb. 3.9 B). Phalloidin bindet an Aktin und verhindert dessen Depolymerisation. Rhodamin ist ein roter Farbstoff, der im Fluoreszenzmikroskop dargestellt werden kann.

Insgesamt zeigen diese Immunofluoreszenzen, dass PLP und MOG mit Aktin kolokalisieren.

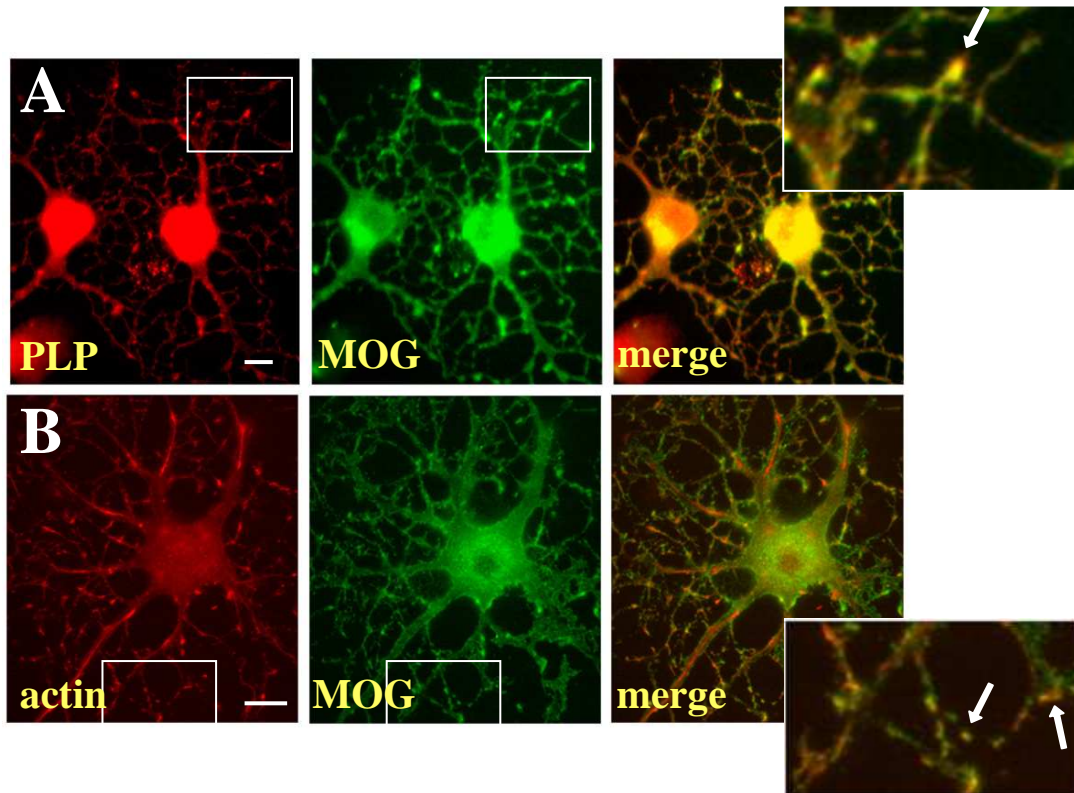


Abb. 3.9: Ko-Immunfluoreszenz an primären Oligodendrozyten mit MOG/PLP-Antikörpern und Aktin-Färbung

4 - 6 Tage alte Oligodendrozyten wurden fixiert, und mit den jeweiligen Antikörpern – wie in den Abbildungen angegeben – ko-gefärbt.

Für die Darstellung des Aktins wurde Phalloidin-Rhodamin verwendet. Die Ausschnitte zeigen in der Vergrößerung die Kolokalisation zwischen PLP und MOG (A) und MOG und Aktin (B). Der Balken entspricht 5 µm.

3.3.2 PLP wird durch MOG in aktinreiche Membrandomänen sortiert

Um festzustellen, ob MOG und PLP auch in einer Zelllinie kolokalisieren, wurden PLP und MOG in BHK-Zellen kotransfiziert und anschließend mit den jeweiligen Antikörpern angefärbt. In BHK-Zellen zeigte sich eine fast vollständige Überlappung der beiden Proteine. Beide Proteine finden sich sowohl in großen Mengen um den Zellkern, als auch in lokalen Anreicherungen („Patches“) an der Zellmembran (Abb. 3.10A). In der anschließenden Phalloidin-Rhodamin-Färbung (Abb. 3.10 B) konnte man, ebenso wie in den Oligodendrozyten, eine Anreicherung von Aktin in diesen „Patches“ beobachten. α -Aktinin, ein Aktin-Cosslinking-Protein, konnte ebenfalls in den „Patches“ nachgewiesen werden (Abb. 3.10 C).

Als nächstes stellte sich die Frage, ob die MOG/PLP/Aktin-Patches intrazellulär oder an der Zelloberfläche lokalisiert sind. Um dies zu untersuchen, wurden nicht fixierte Zellen bei 4°C mit MOG-Antikörper inkubiert, um ausschließlich auf der Oberfläche lokalisiertes Protein anzufärben. Anschließend wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und das Aktin angefärbt. In Abb. 3.10 C sieht man, dass MOG an der Zelloberfläche in Patches mit Aktin vorzufinden ist.

Nachdem MOG und PLP in aktinreichen Membranpatches kolokalisieren, wurde untersucht, ob sich beide Proteine in der Sortierung gegenseitig beeinflussen. Dazu wurde folgendes experimentelle Protokoll gewählt: Zellen wurden entweder mit MOG oder PLP einzeln oder doppelt transfiziert. Anschließend wurde der Anteil der Zellen gezählt, bei denen die Proteine in „Patches“ an der Zelloberfläche vorzufinden waren.

In Zellen, die nur mit PLP transfiziert wurden, befand sich in 4,8 % aller Zellen PLP auf der Oberfläche in „Patches“. Im Gegensatz dazu befand sich MOG in Zellen, die ausschließlich mit MOG transfiziert worden waren, in 93% der Fälle in diesen Anreicherungen. Als beide Proteine jedoch gemeinsam in einer Zelle exprimiert wurden, war PLP überraschenderweise in 35 % aller Zellen in den „Membranpatches“ lokalisiert.

Dieses Experiment deutet darauf hin, dass MOG den Transport von PLP an die Zelloberfläche beeinflusst. Eine andere Erklärung wäre, dass MOG PLP an der Zelloberfläche verankert und damit die Endozytose von PLP verhindert.

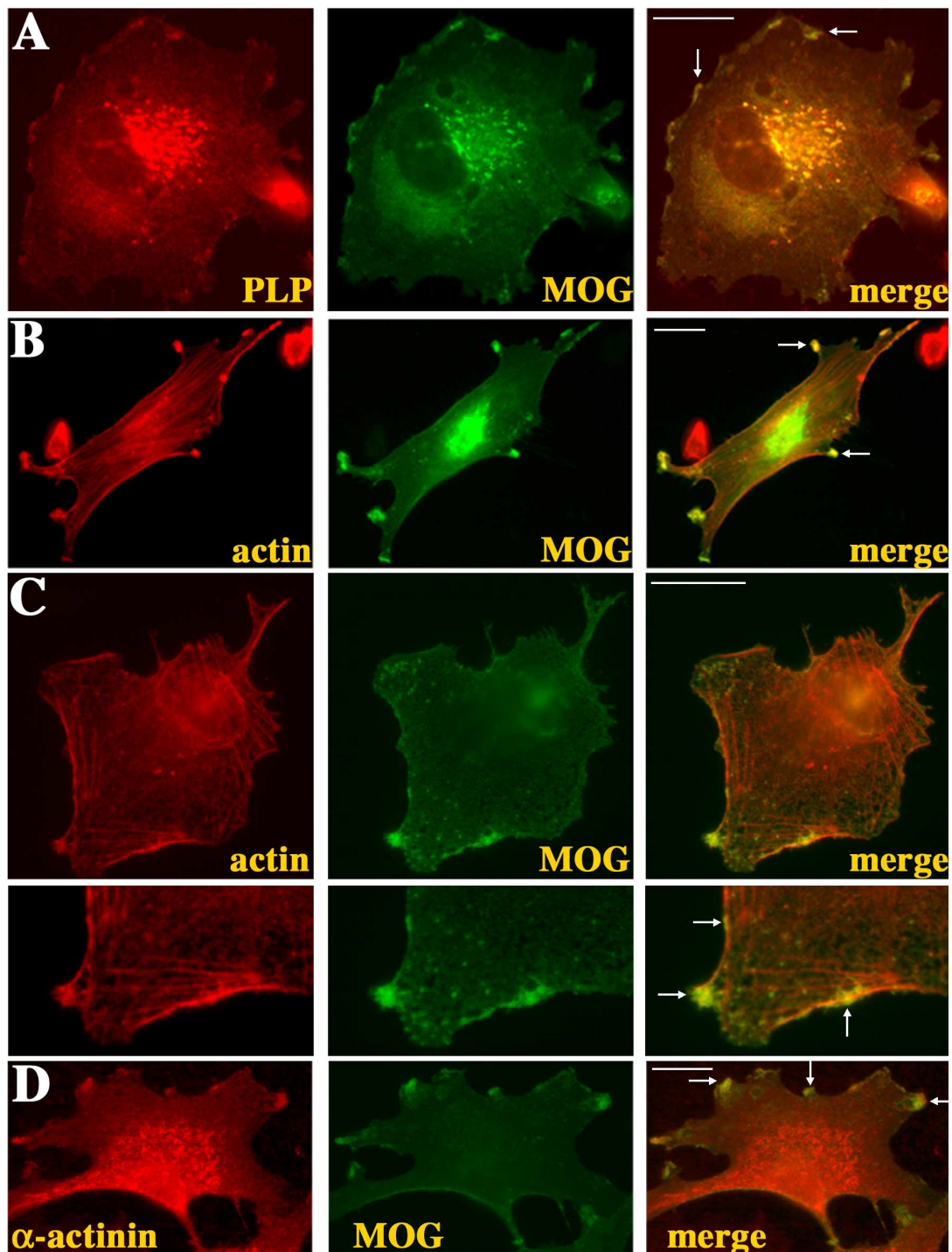


Abb. 3.10 : Immunfluoreszenzfärbungen in transfezierten BHK-Zellen

Mit BHK-Zellen wurden Immunfluoreszenzstudien durchgeführt. In Abschnitt **A** wurde zuvor mit PLP und MOG kotransfeziert, in Abschnitt **B-D** wurde nur MOG transfeziert. Die Kofärbungen wurden mit den jeweils in den Abbildungen angegebenen Antikörpern durchgeführt. Die Pfeile deuten auf Kolokalitionen.

In Abschnitt **C** wurden lebende Zellen mit dem MOG-Antikörper bei 4°C inkubiert, bevor sie fixiert und permeabilisiert wurden, um nur das MOG auf der Zelloberfläche anzufärben. Darunter befindet sich ein vergrößerter Ausschnitt.

„merge“ sind die jeweils übereinandergelegten Aufnahmen.

Der Balken entspricht 10 µm.

3.3.3 Mutationen in PLP behindern den Transport von MOG aus dem ER

Die Ursachen der Pelizaeus-Merzbacher-Krankheit können Mutationen, Deletion oder Duplikation des PLP-Gens sein. Für die Krankheit gibt es unterschiedliche Tiermodelle. Die Rumpshaker- (rsh) und Jimpy^{msd}-Mutation führen zu einer Fehlfaltung von PLP. Dies hat zur Folge, dass PLP im ER akkumuliert und nicht ins Myelin transportiert werden kann. Bei der Jimpy^{msd}-Mutation ist der Transport stärker beeinträchtigt als bei der rsh-Mutation.

Um festzustellen, ob Störungen im Transport von PLP auch die Sortierung von MOG mit beeinflussen, wurden BHK-Zellen mit MOG und PLP^{msd} bzw PLP^{rsh} ko-transfeziert (Abb. 3.11). Es zeigte sich wie erwartet, dass PLP^{msd} in einem retikulären Muster um den Zellkern zu finden war. Überraschenderweise kolokalisierte ein großer Anteil von MOG mit PLP^{msd} in einem ER-typischen Muster ebenfalls um den Zellkern. Durch eine Färbung mit einem ER-Marker (Calnexin) wurde die Kolokalsation von MOG und PLP^{msd} im ER bestätigt. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich nach Kotransfektion mit PLP^{rsh} und MOG. Eine Kolokalisierung war jedoch in einem deutlich kleineren Anteil der Zellen nachzuweisen. Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass die PMD-verursachenden PLP-Mutationen den Transport von MOG beeinflussen. Möglicherweise ist die spezifische Interaktion von MOG und PLP Ursache dafür, dass MOG nicht aus dem ER transportiert werden kann.

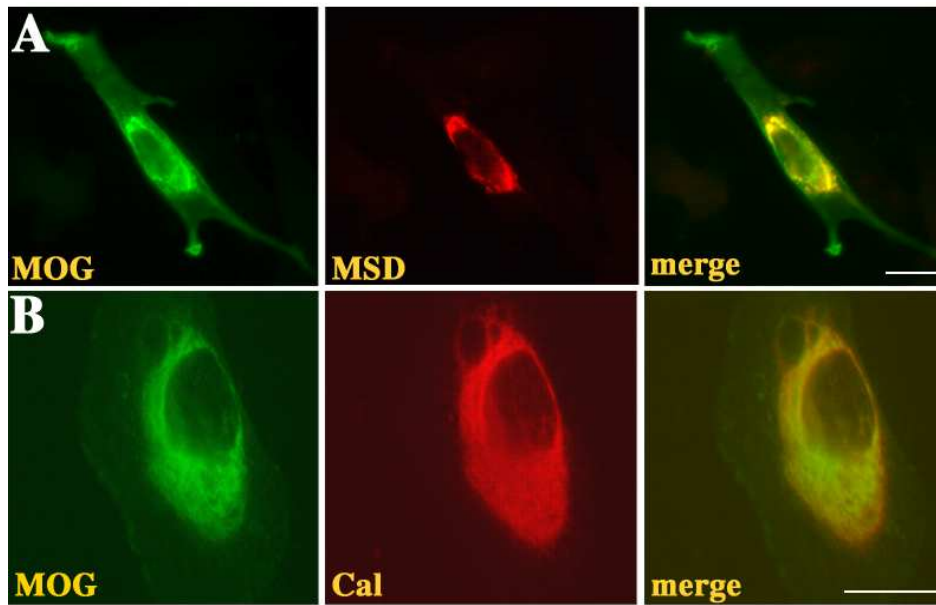


Abb. 3.11: Immunfluoreszenz in BHK-Zellen mit MOG, P6 und Calnexin

In beiden Versuchen wurden BHK-Zellen mit MOG und PLP-jimpy^{msd} kotransfiziert. In Abschnitt **A** wurde die Immunfluoreszenz mit MOG und P6-Antikörper durchgeführt, in Abschnitt **B** mit MOG und Calnexin (Cal), einem Marker für das ER.

„merge“ sind die übereinandergelegten Aufnahmen.

Der Balken entspricht 10 µm.

4 Diskussion

4.1 Lipidmodifikation an PLP spielt keine Rolle für dessen Sortierung in „Myelinrafts“

Vorarbeiten hatten gezeigt, dass PLP in spezialisierten Rafts, so genannten „Myelinrafts“, ins Myelin transportiert werden. Ziel der Arbeit war nun zu untersuchen, ob die Palmitoylierung von PLP die Sortierung in Myelinrafts vermittelt. Eine interessante Eigenschaft von Raft-Proteinen sind post-translatorische Lipidmodifikationen, wie z. B. GPI-Anker oder Palmitoylierungen (Simons und Toomre, 2000). Da PLP an sechs Zysteine palmitoyliert ist (Weimbs und Stoffel, 1992), lag es nahe, zu untersuchen, ob diese für den Transport in Rafts wichtig sind. Mittels Mutationen wurden unterschiedliche PLP/DM20-Konstrukte hergestellt, an die weniger bzw. keine Palmitoyle Säure mehr binden kann. Diese Methode ist gut etabliert, um die Auswirkung von Lipidmodifikationen an Proteinen auf deren Assoziation mit Rafts zu untersuchen (Zhang et al., 1998; Arni et al., 1998; Melkonian et al., 1999).

Dabei wurden an verschiedenen Positionen Serine anstelle der ursprünglichen Zysteine in das Protein eingeführt. Dies verhindert eine Thiolbindung zwischen PLP und den Fettsäuren. Mit den insgesamt sechs verschiedenen PLP/DM20-Konstrukten wurden anschließend CHAPS-Extraktionen bei 4°C durchgeführt, um Rafts biochemisch zu isolieren. Vor den Detergens-Extraktionen wurde die Sequenz der Konstrukte überprüft und deren Expression im Westernblot sichergestellt.

Eine offensichtliche Fehlerquelle des Austausches einzelner Aminosäuren besteht darin, dass das Protein falsch gefaltet und somit im ER zurückgehalten wird. Um diese Möglichkeit auszuschließen, wurden die einzelnen Konstrukte in BHK-Zellen transfeziert und deren Lokalisation innerhalb der Zelle mit Immunfluoreszenz-Färbungen bestimmt.

Dabei zeigte sich, dass DM20- Δ cys3-myc (Konstrukt 3: Zysteine an Position 5, 6 und 9 in Serin umgeändert) nicht aus dem ER weitertransportiert wird. Zusätzlich verliert das ER seine retikuläre Struktur und bekommt ein flächiges Ausse-

hen. Eine mögliche Erklärung für die Veränderung des ER könnte darin bestehen, dass das falsch gefaltete DM20- Δ cys3-myc Aggregate bildet, welche die Morphologie des ER verändern. Interessanterweise weisen dagegen DM20- Δ cys3- Δ cys 108-myc (Konstrukt 6: Zysteine an Position 5,6 und 9 und 108 in Serin verändert) transfizierte Zellen nicht die Veränderungen wie DM20- Δ cys3-myc auf. Da die einzelnen Konstrukte sequenziert und somit auf mögliche PCR-induzierte Mutationen hin überprüft wurden, muss die fehlende Palmitoylsäure an Position 108 für die korrekte Faltung von DM20- Δ cys3- Δ cys108-myc verantwortlich gemacht werden.

Anhand der Detergens-Extraktionen an Oli-neu-Zellen konnten keine Unterschiede in der Assoziation der Palmitoylierungs-defizienten Formen von PLP/DM20 mit Rafts festgestellt werden.

Überraschenderweise war DM20- Δ cys3-myc, welches im ER lokalisiert ist, ebenfalls im Pellet (= unlösliche Fraktion). Da Rafts erst im Golgi-Apparat gebildet werden, wäre eine mögliche Erklärung, dass falsch gefaltetes DM20- Δ cys3-myc (Konstrukt 3) Aggregate bildet und deshalb ins Pellet zentrifugiert werden kann. Das Pellet enthält nicht nur die unlöslichen Raftanteile, sondern auch Zytoskelett und größere Proteinaggregate. Um eine saubere Auftrennung zu erhalten, müssten Dichtezentrifugationen durchgeführt werden. In weiteren Experimenten in Oli-neu-Zellen und primären Oligodendrozyten in denen DM20-wt-myc mit DM20- Δ cys3- Δ cys108-myc verglichen wurde, konnte auch in der Dichtezentrifugation kein wesentlicher Unterschied festgestellt werden. Aus diesen Experimenten schließen wir, dass PLP/DM20 nicht durch Palmitoylierung mit Rafts assoziiert.

Wie ist dieses negative Ergebnis zu beurteilen?

Es muss davon ausgegangen werden, dass weitere Signale in der Sequenz des Proteins vorhanden sein müssen. Übereinstimmend zeigte McCabe et al. (2001), dass verschiedene GFP-Konstrukte mit doppelter Palmitoylierung nur in die unmittelbare Umgebung von DRM's transportiert, jedoch nicht unlöslich werden. Auch für Caveolin-1 spielt die Palmitoylierung für die Assoziation mit Rafts eine geringe Rolle (Dietzen et al., 1995)

Was könnte anstelle der Palmitoylierung für die Sortierung von PLP in „Myelinrafts“ verantwortlich sein?

Das Influenza virus haemagglutinin Protein wird z. B. durch seine Transmembrandomäne Rafts zugeordnet (Scheiffele et al., 1997). Es wäre deshalb möglich, dass die vier Transmembrandomänen von PLP das entscheidende Sortierungssignal darstellen.

Panchal et al. (2003) haben kürzlich gezeigt, dass Ebola virus protein VP40 hauptsächlich in seiner oligomerisierten Form dagegen nicht als Monomer in Rafts lokalisiert ist. Da PLP ebenfalls Oligomere bilden, wäre auch möglich, dass die Oligomerisierung für die Assoziation mit Rafts wichtig ist.

Zusätzliche Experimente sind nötig, um diese beiden weiteren Möglichkeiten zu untersuchen.

4.2 MOG und PLP bilden Komplexe und beeinflussen sich gegenseitig in ihrer Lokalisation innerhalb der Zellen

Ein weiteres Ziel der Arbeit war es, für die Sortierung notwendige Protein-Protein-Interaktionen von PLP mit anderen Myelinproteinen zu identifizieren.

Dazu wurden unterschiedliche Experimente durchgeführt, in denen eine Interaktion zwischen MOG und PLP gezeigt werden konnte. Diese wurde zuerst auf biochemischer Ebene nicht nur an primären Oligodendrozyten, sondern auch in transfezierten BHK-Zellen gefunden: MOG und PLP ko-immunopräzipitieren in beide Richtungen, im Gegensatz zu MBP und PLP. Daraufhin wurde in Immunfluoreszenzstudien überprüft, ob die Interaktion auch auf zellulärer Ebene nachzuweisen ist. In primären Oligodendrozyten und BHK-Zellen kolokalisieren die Proteine.

Viel mehr noch: es konnte in BHK-Zellen gezeigt werden, dass PLP und MOG sich sogar gegenseitig im Transport beeinflussen. PLP wird durch MOG in aktinreiche Membrandomänen sortiert. In COS-Zellen, ebenfalls eine Fibroblastenzelllinie, wurde PLP ohne Myelinproteine zuvor schon in aktinreichen Membrandomänen beobachtet (Kalway et al., 1997). Die Versuchsergebnisse ergaben hier indessen, dass MOG den Anteil an PLP in diesen Domänen

deutlich erhöht. Ferner wird der Transport von MOG aus dem ER beeinträchtigt, wenn die BHK-Zellen gleichzeitig mit PLP^{msd} und MOG transfeziert wurden. PLP^{msd} ist eine PLP-Mutation, die dazu führt, dass PLP im ER zurückgehalten wird. All diese Daten legen eine Interaktion zwischen PLP und MOG nahe.

In dieser Arbeit konnte die zuvor beobachtete Interaktion zwischen PLP und MBP nicht nachgewiesen werden (Golds und Brown, 1978; Wood et al., 1984; Arvanitis et al., 2002). Eine mögliche Erklärung hierfür besteht darin, dass junge, nicht voll ausdifferenzierte Oligodendrozytenkulturen (4 - 6 Tage alt) für die Experimente verwendet wurden. Eventuell wird die Interaktion der beiden Proteine erst im reifen Myelin ausgebildet. Für die korrekte Bildung von Myelin könnten Proteininteraktionen zu unterschiedlichen Zeitpunkten bedeutsam sein.

Welche Funktion könnte die Interaktion von MOG und PLP haben?

Myelin verfügt über unterschiedliche Domänen, die wichtig für seine Funktion sind: Kompaktes Myelin, äußeres und inneres Mesaxon und die Paranodien. PLP ist im kompakten Myelin angereichert. MOG findet sich vor allem im äußeren Mesaxon (Brunner et al., 1989). Dennoch werden beide Proteine in „Myelinrafts“ (=CHAPS-DRMs) sortiert (Kim und Pfeiffer, 1999; Simons et al., 2000; Taylor et al., 2002). Bis jetzt ist unbekannt, wie MOG im Gegensatz zu PLP vor allem in das äußere Mesaxon transportiert wird.

MOG ist in polaren, epithelialen MDCK-Zellen ausschließlich basolateral zu finden. Wird jedoch das C-terminale membranassoziierte Ende entfernt, wird es apikal transportiert. Kroepfl und Gardinier (2001a) bewiesen, dass MOG im C-terminalen Ende ein basolaterales Sortierungssignal besitzt.

Ein mögliches Erklärungsmodell wäre, sich mehrere unterschiedliche Proteinpools vorzustellen: Bekannt ist, dass in Oligodendrozyten viel PLP vorhanden ist, aber deutlich weniger MOG. Vorstellbar wäre, dass viele „Myelinrafts“ (als Proteinpools) mit PLP beladen sind, aber nur ein kleiner Teil davon zusätzlich mit MOG. Dies würde erklären, warum man in primären Oligodendrozyten nur stellenweise eine Kolo-kalisation von MOG und PLP beobachten kann. In BHK-

Zellen dagegen ist diese hier beobachtete Kolokalisierung fast vollständig, weil ähnliche Mengen MOG und PLP vorhanden waren.

Das basolaterale Sortierungssignal in MOG würde nach dieser Vorstellung nun die „Myelinrafts“, die sowohl MOG als auch PLP enthalten, statt ins kompakte Myelin in das äußere Mesaxon sortieren. Die Interaktion zwischen PLP und MOG könnte somit für den Aufbau der unterschiedlichen Myelindomänen von Bedeutung sein.

In dieser Arbeit wird gezeigt, dass PLP-MOG-Komplexe in aktinreichen Membrandomänen an der Zelloberfläche zu finden sind. Welche Bedeutung könnten diese Komplexe haben?

Zu Beginn der Myelinisierung bilden Oligodendrozyten dünne Zellfortsätze, die mit Aktin angereichert sind. Werden diese Zellfortsätze größer und breiter, wird Aktin daraus entfernt und durch Mikrotubuli ersetzt (Richter-Landsberg, 2001). Es ist eher unwahrscheinlich, dass die PLP-MOG-Komplexe dabei eine Rolle spielen, da MOG sehr spät exprimiert wird. Im reifen Myelin lokalisiert Aktin vor allem im inneren und äußeren Mesaxon (wo sich auch MOG befindet) und in den Paranodien.

Weitere Experimente zeigten, dass sich in diesen PLP-MOG-Aktin-Komplexen α -Actinin befindet. α -Actinin ist ein Aktin-Crosslinking-Protein, welches unter anderem Aktin-Stressfasern in „focal contacts“ an der Zellmembran verankert. Eine Hypothese für die Funktion dieser Komplexe könnte sein, dass die PLP-MOG-Aktin-Komplexe die Adhäsion von intrazellulärem Zytoskelett und extrazellulärer Matrix vermitteln. MOG würde dabei als Bindeglied zwischen beiden fungieren. Auch andere Autoren haben eine Beteiligung von MOG an der Adhäsion von Oligodendrozyten vorgeschlagen. MOG hat ein „L2/HNK-1 carbohydrate epitope“ und gehört zur Ig-Superfamilie (Gardinier et al., 1992; Burger et al., 1993). Eine Möglichkeit wäre, dass MOG benachbarte Nervenfasern verbindet (Burger et al., 1993; Bernard et al., 1997). Bis jetzt konnte diese Hypothese weder bewiesen noch ein möglicher Ligand für MOG identifiziert werden. Es wurde lediglich in Versuchen an COS-Zellen ausgeschlossen, dass MOG mit sich selbst assoziiert (Hilton et al., 1995).

Welche Konsequenz haben die Ergebnisse dieser Arbeit für PMD/SPG2?

In dieser Doktorarbeit wurde gezeigt, dass PLP^{msd} und zu einem geringeren Anteil auch PLP^{rsh} den Transport von MOG aus dem ER behindern. Beides sind Mutationen von PLP, die aufgrund ihrer falschen Faltung nicht aus dem ER transportiert werden. Die Retention von MOG ist nicht vollständig: im Myelin von Jimpy-Mäusen ist weiterhin MOG vorhanden (Thomson et al., 1997). Aber die Versuche dieser Arbeit zeigen, dass dennoch ein großer Anteil von MOG im ER zurückgehalten wird.

Auslöser der PMD ist weniger ein Verlust der Funktion von PLP, sondern viel mehr ein „gain of toxic function“. Eine PLP-Nullmutation beeinträchtigt Oligodendrozyten in geringem Ausmaß, während Mutationen oder Duplikationen schwerwiegende Folgen nach sich ziehen. Duplikationen bewirken eine Umsortierung von PLP und Cholesterin in Lysosomen (Simons et al., 2002). Für Mutationen wurde gezeigt, dass sie falsch gefaltet im ER zurückgehalten werden und zum Zelltod der Oligodendrozyten führen (Gow und Lazzarini, 1996).

Eine Hypothese für das Entstehen dieser toxischen Eigenschaften von PLP ist, dass Protein-Protein-/Protein-Lipid-Interaktionen, die für die normale Myelinbildung notwendig sind, nun den Oligodendrozyten zum Verhängnis werden: Wenn PLP in einem Zellkompartiment zurückgehalten wird, führt dies nun zu intrazellulärer Umsortierung von weiteren Myelinkomponenten.

Ein Beispiel eines solchen Pathomechanismus ist die Charcot-Marie-Tooth-Krankheit Typ 1A (CMT1). Diese dysmyelinisierende Krankheit des peripheren Myelins wird durch das Tetraspan-protein PMP22 ausgelöst (Suter und Snipes, 1995). Auch hier kommt es zu einer „gain of toxic function“-Mutation und zur Umsortierung anderer Proteine. Dickson et al. (2002) berichteten von einer Lokalisation von mutiertem PMP22 mit Lamp, einem lysosomalen Marker. Auch das ER-Protein Calnexin war in Lysosomen zu finden. Zusätzlich bildet PMP22 „intrazelluläre myelin-ähnliche Strukturen“, die möglicherweise toxisch für die Zellen sein könnten.

Die in dieser Arbeit gezeigte zusätzliche Retention von MOG kann ein Hinweis darauf sein, dass in Oligodendrozyten ebenfalls intrazelluläre Aggregate mit

eventuell noch weiteren Myelinbausteinen gebildet werden (damit bestände eine Analogie zu CMT1). Die Myelinbausteine stehen den Oligodendrozyten dann nicht nur in geringerem Maße zur Verfügung, sondern verursachen auch eine Aggregation des ER. Dies könnte in letzter Konsequenz zur Apoptose führen. Weitere Experimente müssen zeigen, ob dieser Mechanismus zutrifft.

Schlussfolgerung

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Studie, dass die Palmitoylierung von PLP keine Bedeutung für die Assoziation mit „Myelinrafts“ hat. Ferner spielt die Dileucinsequenz keine Rolle in der Sortierung von PLP/DM20 in Lysosomen/Endosomen. Es bleibt weiter zu erforschen, ob die Transmembrandomänen oder die Oligomerisierung für die Protein-Lipid-Interaktion von PLP verantwortlich sind und damit für dessen Sortierung in „Myelinrafts“.

Protein-Protein-Interaktionen dagegen haben Einfluss auf die Verteilung von PLP innerhalb der Zelle. Es wurde hier gezeigt, dass PLP einen Komplex mit MOG eingeht und durch MOG in Aktin-reiche Membrandomänen sortiert wird. Außerdem wird MOG durch PLP^{msd} und PLP^{rsh} im ER zurückgehalten.

Weitere Studien sind notwendig, um die Funktion dieser Interaktion in der Myelingenese und Aufrechterhaltung der Myelinscheide genauer zu charakterisieren bzw. deren Rolle in dysmyelinisierenden Erkrankungen zu klären.

5 Zusammenfassung

Myelin ist eine um Nervenaxone gewundene, spezialisierte Membran, die durch ihre isolierende Eigenschaft die Nervenleitungsgeschwindigkeit beschleunigt. Oligodendrozyten bilden das Myelin im ZNS und gehören zu den metabolisch aktivsten Zellen des menschlichen Körpers. Sie erzeugen in den ersten Lebenswochen große Mengen an Myelinmembran, wozu ausgefeilte Protein- und Lipidsortierungsmechanismen erforderlich sind. Obwohl die Struktur und die Zusammensetzung von Myelin schon seit langem bekannt sind, weiß man wenig über die molekularen Mechanismen der Myelingenese. In dieser Arbeit wurden für die Myelinsortierung wichtige Interaktionen des Myelinhauptproteins Proteolipid-Protein (PLP) näher untersucht. PLP geht eine Protein-Lipid-Interaktion mit Detergens-unlöslichen Membranfraktionen (DRM; „Myelinrafts“) ein. Analog zu anderen polaren Zellen wird angenommen, dass Oligodendrozyten diese DRM's als Sortierungsweg für Proteine in die Myelinmembrandomäne verwenden. Bekannt ist nicht, wie die Assoziation von PLP mit „Myelinrafts“ zustande kommt. Die Struktur von PLP weist mit seinen Palmitoylierungen jedoch ein gut erforschtes Signal für die Zuordnung zu DRMs auf. Um den Einfluss der Palmitoylierungen zu prüfen, wurden für dieses Projekt zunächst mehrere unterschiedlich mutierte PLP-Konstrukte hergestellt, die weniger bzw. nicht mehr palmitoyliert werden und anschließend deren Anteil in „Myelinrafts“ bestimmt. Ein wichtiges Ergebnis war, dass die Palmitoylierung die Assoziation von PLP mit „Myelinrafts“ nicht verändert. Ferner wurde untersucht, ob Protein-Interaktionen Einfluss auf die Sortierung von PLP nehmen. Es konnte hier nun gezeigt werden, dass PLP mit Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG), Komplexe bildet, welche sich hauptsächlich in Aktin/ α -Aktinin-reichen Membrandomänen an der Zelloberfläche befinden. MOG erhöht den Anteil an PLP in diesen Domänen. Vor allem aber wird MOG von mutiertem PLP (PLP^{msd} und PLP^{rsh}) im Endoplasmatischen Retikulum (ER) zurückgehalten. PLP^{msd} und PLP^{rsh} werden wegen ihrer falschen Struktur nicht aus dem ER transportiert und lösen u.a. die Pelizäus-Merzbacher-Krankheit aus. Die Ergebnisse dieser Arbeit können somit zum weiteren Verständnis der Myelinerkrankungen beitragen.

6 Literaturverzeichnis

Abo S, Bernard CCA, Webb M, Johns TG, Alafaci A, Waed LD, Simpson RJ, Kerlero de Rosbo N: Preparation of highly purified human myelin oligodendrocyte glycoprotein in quantities sufficient for encephalitogenicity and immunogenicity studies. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 1993; 30:945-958

Agranoff BW, Hajra AK: Neural membranes: Lipids. in *Basic Neurochemistry* 5th edition (eds. G.J. Siegel et al.). 1994; Raven Press, New York, USA. pp. 97-116

Anderson TJ, Schneider A, Barrie JA, Klugmann M, McCulloch MC, Kirkham D, Kyriakides E, Nave KA, Griffiths IR: Late-onset neurodegeneration in mice with increased dosage of the proteolipid protein gene. *J. Comp. Neurol.* 1998; 394:506-519

Arni S, Keilbaugh SA, Ostermeyer AG, Brown DA: Association of GAP-43 with detergent-resistant Membranes requires two palmitoylated cysteine residues. *J. Biol. Chem.* 1998; 273:28478-28485

Arroyo EJ, Scherer SS: On the molecular architecture of myelinated fibers. *Histochem. Cell Biol.* 2000; 113:1-18

Arvanitis DN, Yang W, Boggs JM: Myelin proteolipid protein, basic protein, the small isoform of myelin-associated glycoprotein, and p42MAPK are associated in the Triton X-100 extracts of central nervous system myelin. *J. Neurosci. Res.* 2002; 70:8-23

Barkocich AJ: Concepts of myelin and myelination in neuroradiology. *Am. J. Neuroradiol.* 2000; 21:1099-1109

Baron W, Decker L, Colognato H, French-Constant C: Regulation of integrin growth factor interactions in oligodendrocytes by lipid raft microdomains. *Curr Biol.* 2003; 13:151-155

Barres BA, Raff MC: Proliferation of oligodendrocyte precursor cells depends on electrical activity in axons. *Nature* 1993; 361:258-260

Barres BA, Lazar MA, Raff MC: A novel role for thyroid hormone, glucocorticoids and retinoic acid in timing oligodendrocyte development. *Development* 1994; 120:1097-1108

Bernard CCA, Johns TG, Slavin AJ, Ichikawa M, Ewing C, Liu J, Bettadaoura J: Myelin oligodendrocyte glycoprotein: a novel candidate autoantigen in multiple sclerosis. *J. Mol. Med.* 1997; 75:77-88

Bhat S, Silberberg DH: Oligodendrocyte cell adhesion molecules are related to neural cell adhesion molecule (N-CAM). *J. Neurosci.* 1986; 6:3348-3354

Bögler O, Wren D, Barnett SC, Land H, Noble M: Cooperation between two growth factors promotes extended self renewal and inhibits differentiation of oligodendrocyte-type-2 astrocyte (O-2A) progenitor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1990; 87:6368-6372

Boison D, Stoffel W: Disruption of the compacted myelin sheath of axons of the central nervous system in proteolipid protein deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994; 91:11709-11713

Bongarzone ER, Campagnoni CW, Kampf K, Jacobs EC, Handley VW, Schonmann V, Campagnoni AT: Identification of a new exon in the myelin proteolipid protein gene encoding novel protein isoforms that are restricted to the somata of oligodendrocytes and neurons. *J. Neurosci.* 1999; 19:8349-8357

Bongarzone ER, Jacobs EC, Schonmann V, Campagnoni AT: Classic and soma-restricted proteolipids are targeted to different subcellular compartments in oligodendrocytes. *J. Neurosci. Res.* 2001; 65:477-484

Bonifacino JS, Dell'Angelica EC: Molecular bases for the recognition of tyrosine-based sorting signals. *J. Cell Biol.* 1999; 145:923-926

Bosio A, Binczek E, Stoffel W: Functional breakdown of the lipid bilayer of the myelin membrane in central and peripheral nervous system by disrupted galactocerebroside synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996; 93:13280-13285

Boucher SEM, Carlock LR, Skoff RP: PLP gene modulates neuron viability and morphology. *J. Neurochem.* 2000; 74 (Suppl):S31

Braun PE: Molecular organization of myelin. in *Myelin*. 2nd edition (ed P. Morell). 1984; Plenum Press, New York, USA. pp. 97-116

Braun PE, Sandillon F, Edwards A, Matthieu JM, Privat A: Immunocytochemical localization by electron microscopy of 2'3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase in developing oligodendrocytes of normal and mutant brain. *J. Neurosci.* 1988; 3057-3066

Brophy PJ, Gillespie S, Kelly BM, Vouyiouklis DA: The cytoskeleton in the differentiation of myelin-forming cells. in *A multidisciplinary approach to myelin diseases II* (ed. S. Salvati). 1994; Plenum Press, New York, USA. pp. 71-82

Brown DA, Rose JK: Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell* 1992; 68:533-544

Brown DA, London E: Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 1998; 14:111-136

Brown DA, London E: Structure and Function of Sphingolipid- and Cholesterol-rich Membrane Rafts. *J. Biol. Chem.* 2000; 275:17221-17224

Brown RE: Sphinglipid organization in biomembranes: what physical studies of model membranes reveal. *J. Cell Sci.* 1998; 111:1-9

Brunner C, Lassmann H, Waehnel TV, Matthieu JM, Linington C: 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.* 1989; 53:296-304

Bunge RP, Bunge MB, Bates M: Movements of the Schwann cell nucleus implicate progression of the inner (axon-related) Schwann cell process during myelination. *J. Cell Biol.* 1989; 109:273-284

Burger C, Steck AJC, Bernard CCA, Kerlero De Rosbo N: Human myelin/oligodendrocyte glycoprotein: a new member of the L2/HNK-1 family. *J. Neurochem.* 1993; 61:1822-1827

Campagnoni AT: Molecular biology of myelination. in *Neuroglia* (eds. H. Kettenmann und B. Ransom). 1995; Oxford University Press, New York, USA. pp. 555-570

Campagnoni AT, Skoff RP: The pathobiology of myelin mutants reveal novel biological functions of the MBP and PLP genes. *Brain Pathol.* 2001; 11:74-91

Campagnoni CW, Garbay B, Micevych P, Pribyl T, Kampf K, Handley VW, Campagnoni AT: DM20 mRNA splice product of the myelin proteolipid protein gene is expressed in the murine heart. *J. Neurosci. Res.* 1992; 33:148-155

Chen SJ, DeVries GH: Mitogenic effect of an axolemma-enriched fraction on cultured oligodendrocytes. *J. Neurochem.* 1989; 52:325-327

Coleman DR, Kreibich G, Frey AB, Sabatini DD: Synthesis and incorporation of myelin polypeptides into CNS myelin. *J. Cell Biol.* 1982; 95:598-608

Coetzee T, Fujita M, Dupree J, Shi R, Blight A, Suzuki K, Popko B: Myelination in the absence of galactocerebroside and sulfatide: normal structure with abnormal function and regional instability. *Cell* 1996; 86:209-219

Dickson KM, Bergeron JJM, Shames I, Colby J, Nguyen DT, Chevet E, Thomas DY, Snipes GJ: Association of calnexin with mutant peripheral myelin protein-22 *ex vivo*: A basis for "gain of function" ER diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2002; 99:9852-9857

Dietzen DJ, Hastings WR, Lublin DM: Caveolin is palmitoylated on multiple cysteine residues. Palmitoylation is not necessary for localization of caveolin to caveolae. *J Biol Chem.* 1995; 270(12):6838-42.

Ellis D, Malcolm S: Proteolipid protein gene dosage effect in Pelizaeus-Merzbacher disease. *Nature Genet.* 1994; 6:333-334

Erne B, Sansano S, Frank M, Schaeren-Wiemers N: Rafts in adult peripheral nerve myelin contain major structure myelin proteins and myelin and lymphocyte protein (MAL) and CD59 as specific markers. *J. Neurochem.* 2002; 82:550-562

Frank M: MAL, a proteolipid in glycosphingolipid enriched domains: functional implications in myelin and beyond. *Prog. Neurobiol.* 2000; 60:531-544

Franklin RJM, Blakemore WF: Glial-cell transplantation and plasticity in the O-2A lineage – implications for CNS repair. *Trends Neurosci.* 1995; 18:151-156

Friedrichson T, Kurzchalia TV: Microdomains of GPI-anchored proteins in living cells revealed by crosslinking. *Nature* 1998; 394:802-805

Garbern J, Cambi F, Shy M, Kamholz J: The molecular pathogenesis of Pelizaeus-Merzbacher disease. *Arch. Neurol.* 1999; 56:1210-1214

Garbern JY, Cambi F, Tang XM, Sima AA, Vallat JM, Bosch EP, Lewis R, Shy M, Sohi J, Kraft G, Chen KL, Joshi I, Leonard DG, Johnson W, Raskind W, Dlouhy SR, Pratt V, Hodes ME, Bird T, Kamholz J: Proteolipid protein is necessary in peripheral as well as central myelin. *Neuron* 1997; 19:205-218

Gardinier MV, Amiguet P, Linigton C, Matthieu JM: Myelin/Oligodendrocyte glycoprotein is a unique member of immunoglobulin superfamily. *J. Neurosci. Res.* 1992; 33:177-187

Gencic S, Hudson LD: Conservative amino acid substitution in the myelin proteolipid protein of jimpy^{msd} mice. *J. Neurosci.* 1990; 10:117-124

Golds EE, Brown PE: Protein associations and basic protein conformation in the myelin membrane. *J. Biol. Chem.* 1978; 253:8162-8170

Gow A, Friedrich VL, Lazzarini RA: Intracellular transport and sorting of the oligodendrocyte transmembrane proteolipid protein. *J. Neurosci. Res.* 1994a; 37:563-573

Gow A, Friedrich VL, Lazzarini RA: Many naturally occurring mutations of myelin proteolipid protein impair its intracellular transport. *J. Neurosci. Res.* 1994b; 37:574-583

Gow A, Lazzarini RA: A cellular mechanism governing the severity of Pelizaeus-Merzbacher disease. *Nature Gen.* 1996; 13:442-428

Gow A, Southwood CM, Lazzarini RA: Disrupted proteolipid protein trafficking results in oligodendrocyte apoptosis in an animal model of Pelizaeus-Merzbacher disease. *J. Cell Biol.* 1998; 140:925-934

Griffiths IR, Scott I, McCulloch MC, Barrie JA, McPhilemy K, Cattanach BM: Rumpshaker mouse: a new X-linked mutation affecting myelination: evidence for a defect in PLP expression. *J. Neurocytol.* 1990; 19:273-283

Griffiths I, Klugmann M, Anderson T, Yool D, Thomson C, Schwab MH, Schneider A, Zimmermann F, McCulloch M, Nadon N, Nave KA: Axonal swellings and degeneration in mice lacking the major proteolipid of myelin. *Science* 1998a; 280:1610-1613

Griffiths IR, Klugmann M, Anderson TJ, Thomson C, Vouyiouklis D, Nave KA: Current concepts of PLP and its role in the nervous system. *Microsc. Res. Tech.* 1998b; 41:344-358

Harder T, Scheiffele P, Verkade P, Simons K: Lipid domain structure of the plasma membrane revealed by patching of membrane components. *J. Cell Biol.* 1998; 141:929-942

Hilton AA, Slavin AJ, Hilton DJ, Bernard CCA: Characterization of cDNA and genomic clones encoding human myelin oligodendrocyte glycoprotein. *J. Neurochem.* 1995; 65:309-318

Hodes ME, Dlouhy SR: The Proteolipid protein gene: double, double, ... and trouble. *Am. J. Hum. Genet.* 1996; 59:12-15

Hooper, N: Detergent-insoluble glycosphingolipid/cholesterol-rich membrane domains, lipid rafts and caveolae. *Mol. Membr. Biol.* 1999; 16:145-156

Jacobson M (ed.): Neural ontogeny. in *Developmental Biology* 3rd edition. 1991; Plenum Press New York, USA

Jacobson S: *J. Comp. Neurol.* 1963; 121:5-29

Johns TG, Bernard CCA: The structure and function of myelin oligodendrocyte glycoprotein. *J. Neurochem.* 1999; 72:1-9

Jung M, Sommer I, Schachner M, Nave KA: Monoclonal antibody O10 defines a conformationally sensitive cell-surface epitope of proteolipid protein (PLP): evidence that PLP misfolding underlies dysmyelination in mutant mice. *J. Neurosci.* 1996; 16:7920-7929

- Jurevics H, Hostettler J, Sammond DW, Nave KA, Toews AD, Morell P: Normal metabolism but different physical properties of myelin from mice deficient in proteolipid protein. *J. Neurosci. Res.* 2003; 71:826-834
- Kagawa T, Ikenaka K, Inoue Y, Kuriyama S, Tsujii T, Nakao J, Nakajima K, Aruga J, Okano H, Mikoshiba K: Glial cell degeneration and hypomyelination caused by overexpression of myelin proteolipid protein gene. *Neuron* 1994; 13:427-442
- Kalway SA, Smith R, Kidd GJ: Myelin proteolipid protein expressed in COS-1 cells is targeted to actin-associated surfaces. *J. Neurosci. Res.* 1997; 48:201-211
- Keller P, Simons K: Post-Golgi biosynthetic trafficking. *J Cell Sci.* 1997; 110:3001-3009
- Kidd GJ, Hauer PE, Trapp BD: Axons modulate myelin protein messenger RNA levels during central nervous system myelination in vivo. *J. Neurosci. Res.* 1990; 26: 409-418
- Kim T, Pfeiffer SE: Myelin glycosphingolipid/cholesterol-enriched microdomains selectively sequester the non-compact myelin proteins CNP and MOG. *J. Neurocytol.* 1999; 28:281-293
- Kim T, Pfeiffer SE: Subcellular localization and detergent solubility of MVP17/rMAL, a lipid raft-associated protein in oligodendrocytes and myelin. *J. Neurosci. Res.* 2002; 69:217-26
- Klugmann M, Schwab MH, Puehlhofer A, Schneider A, Zimmermann F, Griffiths IR, Nave KA: Assembly of CNS myelin in the absence of proteolipid-protein. *Neuron* 1997; 18:59-70
- Kobayashi H, Hoffman EP, Marks HG: The rumpshaker mutation in spastic paraplegia. *Nature Genet.* 1994; 7:351-352
- Koeppen AH, Ronca NA, Greenfield EA, Hans MB: Defective biosynthesis of proteolipid protein in Pelizaeus-Merzbacher disease. *Ann. Neurol.* 1987; 21:159-170
- Koeppen AH, Robitaille Y: Pelizaeus-Merzbacher Disease. *J. Neuropath. Experim. Neurol.* 2002; 61:747-759
- Koynova R, Caffrey M: Phases and phase transitions of the sphingolipids. *Biochim. Biophys. Acta* 1995; 1255:213-236
- Krämer EM, Koch T, Niehaus A, Trotter J: Oligodendrocytes direct glycosyl phosphatidylinositol-anchored proteins to the myelin sheath in glycosphingolipid-rich complexes. *J. Biol. Chem.* 1997; 272:8937-8945

Krämer EM, Klein C, Koch T, Boytinck M, Trotter J: Compartmentation of Fyn kinase with glycosylphosphatidylinositol-anchored molecules in oligodendrocytes facilitates kinase activation during myelination. *J. Biol. Chem.* 1999; 274:29042-29049

Krämer EM, Schardt A, Nave KA: Membrane traffic in myelinating oligodendrocytes. *Microscop. Res. Tech.* 2001; 52:656-671

Kröpfel JF, Viise LR, Charron AJ, Linington C, Gardinier MV: Investigation of myelin/oligodendrocyte glycoprotein membrane topology. *J. Neurochem.* 1996; 67:2219-2222

Kröpfel JF, Gardinier MV: Identification of a basolateral membrane targeting signal within the cytoplasmic domain of myelin/oligodendrocyte glycoprotein. *J. Neurochem.* 2001a; 77:1301-1309

Kröpfel JF, Gardinier MV: Mutually exclusive apicobasolateral sorting of two oligodendroglial membrane proteins, proteolipid protein and myelin/oligodendrocyte glycoprotein, in Madin-Darby Canine Kidney cells. *J. Neurosci. Res.* 2001b; 66:1140-1148

Lees MB, Brostoff SW in *Myelin*. 2nd edition (ed P. Morell). 1984; Plenum Press, New York, USA. pp. 147-195

Lemke G: Myelin and Myelination. in *Molekular Neurobiology* (ed. Zach W. Hall). 1992; Sinauer Associates, Inc. Sunderland MA, USA. pp. 281-309

Linington C, Webb M, Woodhams PL: A novel myelin-associated glycoprotein defined by a mouse monoclonal antibody. *J. Neuroimmunol.* 1984; 6:387-396

Macklin WB, Weill CL, Deininger PL: Expression of myelin proteolipid and basic protein mRNAs in cultured cells. *J. Neurosci. Res.* 1986; 16:217-230

Marta CB, Taylor CM, Coetzee T, Kim T, Winkler S, Bansal R, Pfeiffer SE: Antibody crosslinking of myelin oligodendrocyte glycoprotein leads to its rapid re-partitioning into detergent-insoluble fractions, and altered protein phosphorylation and cell morphology. *J. Neurosci.* 2003; 23:5461-5471

McCabe JB, Berthiaume LG: N-terminal protein acylation confers localization to cholesterol, sphingolipid-enriched membranes but not to lipid rafts/caveolae. *Mol. Biol. Cell* 2001; 12:3601-3617

McKinnon RD, Piras G, Ida JA, Dubois-Dalcq M: A role for TGF- β in oligodendrocyte differentiation. *J. Cell Biol.* 1993; 121: 1397-1407

Melkonian KA, Ostermeyer AC, Chen JZ, Roth MG, Brown DA: Role of lipid modifications in targeting proteins to detergent-resistant membrane rafts. Many

- raft proteins are acylated, while few are prenylated. *J. Biol. Chem.* 1999; 274:3910-3917
- Mellman I: Endocytosis and molecular sorting. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 1996; 12:575-625
- Merzbacher L: Eine eigenartige familiär-hereditäre Erkrankungsform (Aplasia axialis extracorticalis congenita). *Zeitschr. Ges. Neurol. Psychiat.* 1910; 3:1-138
- Mikol DD, Stefansson K: A phosphatidylinositol-linked peanut agglutinin binding glycoprotein in central nervous system myelin and in oligodendrocytes. *J. Cell Biol.* 1988; 106:1273-1279
- Morell P, Quarles RH, Norton WT: Neural membranes: myelin formation, structure, and biochemistry. in *Basic Neurochemistry* 5th edition (eds. G.J. Siegel et al.). 1994; Raven Press, New York, USA. pp. 118-143
- Nave KA, Suter U: Störungen der Myelinbildung. In *Klinische Neurobiologie* (ed. Herdegen T et al.). 1997; Spektrum Akademischer Verlag, Deutschland. pp. 101-128
- Nave KA, Lai C; Bloom FE, Milner RJ: Splice site selection in the proteolipid protein (PLP) gene transcript and primary structure of the DM-20 protein of central nervous system myelin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1987; 84:5665-5669
- Nezu A, Kimura S, Takeshita S: An MRI and MRS study of Pelizaeus-Merzbacher disease. *Pediatr. Neurol.* 1998; 18:334-337
- Nordlund M, Hong D, Fei X, Ratner N: Schwann cells and cells in the oligodendrocyte lineage proliferate in response to a 50,000 Dalton membrane-associated mitogen present in the developing brain. *Glia* 1992; 5:182-192
- Norton WT, Cammer W: Isolation and characterization of myelin. in *Myelin*. 2nd edition (ed P. Morell). 1984; Plenum Press, New York, USA. pp. 147-195
- Norton WT und Poduslo SE: Myelination in rat brain: method of myelin isolation. *J. Neurochem.* 1973; 21:749-757
- Nussbaum JL, Roussel G: Immunocytochemical demonstration of the transport of myelin proteins through the golgi apparatus. *Dell Tissue Res.* 1983; 234:547-559
- Panchal RG, Ruthel G, Kenny TA, Kallstrom GH, Lane D, Badie SS, Li L, Bavari S, Aman MJ: In vivo oligomerization and raft localization of Ebola virus protein VP40 during vesicular budding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2003; 100:15936-15941

Peles E, Salzer JL: Molecular domains of myelinated axons. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2000; 10:558-565

Pelizaeus F: Ueber eine eigenthümliche Form spastischer Lähmung mit Cerebraleerscheinungen auf hereditärer Grundlage (Multiple Sklerose). *Arch Psychiat. Nervenkrankh.* 1885; 16:698-710

Pfeiffer SE, Warrington AE, Bansal R: The oligodendrocyte and its many cellular processes. *Trends Cell Biol.* 1993; 3:191-197

Popot JL, Pham Dinh D, Dautigny A: Major Myelin Proteolipid: the 4-alpha-helix topology. *J Membr Biol.* 1991; 120:233-246

Pralle A, Keller P, Florin EL, Simons K, Hoerber JKH: Sphingolipid-cholesterol rafts diffuse as small entities in the plasma membrane of mammalian cells. *J. Cell Biol.* 2000; 148:997-1008

Pribyl TM, Campagnoni CW, Kampf K, Kashima T, Handley VW, McMahon J, Campagnoni AT: Expression of the myelin proteolipid protein gene in the human fetal thymus. *J. Neuroimmunol.* 1996; 67:125-130

Price J: Glial cell lineage and development. *Curr. Opin. Neurobiol.* 1994; 4:680-686

Puckett C, Hudson L, Ono K: Myelin-specific proteolipid protein is expressed in myelinating Schwann cells but is not incorporated into myelin sheaths. *J. Neurosci. Res.* 1987;18:511-518

Raff MC, Lillien LE, Richardson WD, Burne JF, Noble MD: Platelet-derived growth factor from astrocytes drives the clock that times Oligodendrocyte development in culture. *Nature* 1988; 333:562-565

Raine CS: Morphology of myelin and myelination. in *Myelin*. 2nd edition (ed. P. Morell). 1984; Plenum Press, New York, USA. pp. 1-50

Readhead C, Schneider A, Griffiths IR, Nave KA: Premature arrest of myelin formation in transgenic mice with increased proteolipid protein gene dosage. *Neuron* 1994; 12:583-595

Richter-Landsberg C: The oligodendroglia cytoskeleton in health and disease. *J. Neurosci. Res.* 2000; 59:11-18

Richter-Landsberg C: Organization and functional roles of the cytoskeleton in oligodendrocytes. *Microsc. Res. Tech.* 2001; 52:628-636

Rietveld A, Neutz S, Simons K, Eaton S: Association of sterol- and glycosylphosphatidylinositol-linked proteins with *Drosophila* raft lipid microdomains. *J. Biol. Chem.* 1999; 274:12049-12054

Rodriguez-Boulan E, Zurzolo C: Polarity signals in epithelial cells. *J. Cell Sci. Suppl.* 1993; 17:9-12

Roussel G, Neskovic NM, Trifilieff E, Artaulf JC, Nussbaum JL: Arrest of proteolipid transport through the Golgi apparatus in Jimpy brain. *J. Neurocytol.* 1987; 16:195-204

Salzer JL, Holmes WP, Colman DR: The amino acid sequences of the myelin-associated glycoproteins: homology to the immunoglobulin gene superfamily. *J. Cell Biol.* 1987; 104: 957-965

Saugier-Veber P, Munnich A, Bonneau D: X-linked spastic paraplegia and Pelizaeus-Merzbacher disease are allelic disorders at the proteolipid protein locus. *Nature Genet.* 1994; 6:257-262

Scheiffele P, Roth MG, Simons K: Interaction of influenza virus haemagglutinin with sphingolipid-cholesterol membrane domains via its transmembrane domain. *EMBO (Eur. Mol. Biol. Organ.)* 1997; 16:5501-5508

Schneider A, Montague P, Griffiths IR, Fanarraga ML, Kennedy PGE, Brophy PJ, Nave KA: Uncoupling of hypomyelination and glial cell death by a mutation in the proteolipid protein gene. *Nature* 1992; 358:758-761

Schroeder R, London E, Brown D: Interactions between saturated acyl chains confer detergent resistance on lipids and glycosylphosphatidyl-inositol (GPI)-anchored proteins: GPI-anchored proteins in liposomes and cells show similar behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994; 91:12130-12134

Schwob VS, Clark HB, Agrawal D, Agrawal HG: Electron microscopic immunocytochemical localization of myelin proteolipid protein and myelin basic protein in rat brain during myelination. *J. Neurochem.* 1985; 45:559-571

Scolding NJ, Frith S, Lington C, Morgan BP, Campbell AK, Compston DAS: Myelin-oligodendrocyte glycoprotein (MOG) is a surface marker of oligodendrocyte maturation. *J. Neuroimmunol.* 1989; 22:169-176

Simons K, van Meer G: Lipid sorting in epithelial cells. *Biochemistry* 1988; 27:6197-6202

Simons K, Ikonen E: Functional rafts in cell membranes. *Nature* 1997; 387:569-572

Simons K, Toomre D: Lipid rafts and signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2000; 1:31-39

Simons M, Krämer EM, Thiele C, Stoffel W, Trotter J: Assembly of myelin by association of proteolipid protein with cholesterol- and galactosylceramide-rich membrane domains. *J. Cell. Biol.* 2000; 151:143-154

Simons M, Krämer EM, Macchi P, Rathke-Hartlieb S, Trotter J, Nave KA, Schulz JB: 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.* 2002; 157:327-336

Sistermans EA, De Wijs IJ, De Coo RFM, Smit LME, Menko FH, Van Oost BA : A (G to A) mutation in the initiation codon of the proteolipid protein gene causing a relatively mild form of Pelizaeus-Merzbacher disease in a Dutch family. *Hum. Genet.* 1996; 97:337-339

Sistermans EA, De Coo RFM, De Wijs IJ, Van Oost BA: Duplication of the proteolipid protein gene is the major cause of Pelizaeus-Merzbacher disease. *Neurology* 1998; 50:1749-1754

Slavin A, Johns T, Orian J, Bernard CCA: Regulation of myelin oligodendrocyte glycoprotein in different species throughout development. *Dev. Neurosci.* 1997; 19:69-78

Smith, ME: An in vitro system for the study of myelin synthesis. *J. Neurochem.* 1969; 16:83-92

Solly SK, Thomas JL, Monge M, Demerens C, Lubetzki C, Gardinier MV, Matthieu JM, Zale B: Myelin/oligodendrocyte glycoprotein (MOG) expression is associated with myelin deposition. *Glia* 1996; 18:39-48

Sternberger NH, Itoyama Y, Kies NW, Webster HDF: Myelin basic protein demonstrated immunocytochemically in oligodendroglia prior to myelin sheath formation. *J. Neurocytol.* 1979; 7:251-263

Stoffel W, Bosio A: Myelin glycolipids and their functions. *Curr Opin Neurobiol.* 1997; 7:654-661

Suter U, Snipes GJ: Biology and genetics of hereditary motor and sensory neuropathies. *Annu. Rev. Neurosci.* 1995; 18:45-75

Taylor CM, Coetzee T, Pfeiffer SE: Detergent-insoluble glycosphingolipid/cholesterol microdomains of the myelin membrane. *J. Neurochem.* 2002; 81:993-1004

Temple S, Raff MC: Clonal Analysis of oligodendrocyte development in culture: evidence for a developmental clock that counts divisions. *Cell* 1986; 44:773-779

Thomson CE, Montague P, Jung M, Nave KA, Griffiths IR: Phenotypic severity of murine PLP mutants reflects in vivo and in vitro variations in transport of PLP isoproteins. *Glia* 1997; 20:322-332

Trapp BD, Bernier L, Andrews SB, Colman DR: Cellular and subcellular distribution of 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase and its mRNA in the rat central nervous system. *J. Neurochem.* 1988; 51:859-868

Trotter J, Bitter-Suermann D, Schachner M: 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. *U. Neuro. Res.* 1989; 22:369-383

Trotter J, Klein C, Krämer EM: GPI-anchored proteins and glycosphingolipid-rich rafts: Platforms for adhesion and signaling. *Neuroscientist* 2000; 6:271-284

Varma R, Mayor S: GPI-anchored proteins are organized in submicron domains at the cell surface. *Nature* 1998; 394:798-801

Vinson M, Rausch O, Maycox PR, Prinjha RK, Chapman D, Morrow ?,Harper AJ, Dingwall C, Walsh FS, Burbridge SA, Riddell DR : Lipid rafts mediate the interaction between myelin-associated glycoprotein (MAG) on myelin and MAG-receptors on neurons. *Mol. Cell Neurosci.* 2003; 22:344-352

Warrington AE, Pfeiffer SE: Proliferation and differentiation of O4+ oligodendrocytes in postnatal cerebellum: Analysis in unfixed tissue slices using anti-glycolipid antibodies. *J. Neurosci. Res.* 1992; 33:338-353

Waxmann SG, Sims TJ: Specificity in central myelination: evidence for local regulation of myelin thickness. *Brain Res.* 1984; 292:179-185

Weimbs T, Stoffel W: Proteolipid protein (PLP) of CNS myelin: position of free, disulfide-bonded, and fatty acid thioester-linked cysteine residues and implications for the membrane topology of PLP. *Biochemistry* 1992; 31:12289-12296

Werner H, Jung M, Klugmann M, Sereda M, Griffiths IR, Nave KA: Mouse models of myelin diseases. *Brain Pathol.* 1998; 8:771-793

Whight PA, Duchala CS, Readhead C, Macklin WB: A myelin proteolipid protein-LacZ fusion protein is developmentally regulated and targeted to the myelin membrane in transgenic mice. *J. Cell Biol.* 1993; 123:443-454

Willard HJ, Riordan JR: Assignment of the gene for myelin proteolipid protein to the X chromosome: Implications for X-linked myelin disorders. *Science* 1985; 230:940-942

Wood DD, Vella GJ, Moscarello MA: Interaction between human myelin basic protein and lipophilin. *Neurochem. Res.* 1984; 9:1523-1531

Wood PM, Bunge RP: The biology of the oligodendrocyte. in *Oligodendroglia* (ed. WT Norton). 1984; Plenum Press, New York, USA. pp. 1-46

Yamamoto T, Nanba E, Zhang HD, Sasaki M, Komaki H, Takeshita K: Jimpy^{msd} mouse mutation and connatal Pelizaeus-Merzbacher disease. *Am. J. Med. Genet.* 1998; 75:439-440

Yang X, Skoff RP: Proteolipid protein regulates the survival and differentiation of oligodendrocytes. *J. Neurosci.* 1997; 17:2056-2070

Yool DA, Edgar JM, Montague P, Malcolm S: The proteolipid protein gene and myelin disorders in man and animal models. *Hum. Mol. Gen.* 2000; 9:987-992

Yool DA, Klugmann M, McLaughlin M, Vouyiouklis DA, Dimou L, Barrie JA, McCulloch MC, Nave KA, Griffiths IR: Myelin proteolipid proteins promote the interaction of oligodendrocytes and axons. *J. Neurosci. Res.* 2001; 28:75-78

Zhang W, Tribble RP, Samelson LE: LAT palmitoylation: Its Essential Role in membrane microdomain targeting and tyrosine phosphorylation during T cell activation. *Immunity* 1998; 9:239-246

Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn PD Dr. Schulz für die Übernahme der Doktorarbeit und für die zur Verfügungstellung seines Labors bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Mika Simons für die Bereitstellung des interessanten und herausfordernden Themas und vor allem für die gute Zusammenarbeit, viele Ideen, ständige Ansprechbarkeit und sehr gute Betreuung.

Für die freundliche, unkomplizierte Aufnahme in die Arbeitsgruppe und Schaffung sehr guter Arbeitsbedingungen danke ich Dr. Michael Kiebler und dem gesamten Labor Kiebler. Ich danke vor allem Dr. Paolo Macchi und Dr. Massimo Mallardo für das geduldige Beibringen der experimentellen Methoden und der vielen kleinen Tipps und Tricks zum Überleben im Labor.

Volker und Claudia danke ich fürs immer wieder aufmuntern und das gründliche Korrekturlesen.

Hauptsächlich möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mir dieses Studium ermöglicht und mich in jeder Hinsicht immer unterstützt haben, für ihr Interesse an dieser Doktorarbeit und dass sie allen Frust und alle Freude dieser Arbeit mitgetragen haben.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Hanna Länder
Geburtstag	22.10.1976
Geburtsort	Leonberg
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig

Schulbesuch

1983-1987	Theodor-Heuss-Grundschule, Rutesheim
1987-1996	Johannes-Kepler-Gymnasium, Leonberg
1996	Abitur

Freiwilliges Soziales Jahr

Sept. 1996- Juli 1997	Peterhouse School (Heim für autistische Kinder und Jugendliche) in Liverpool/ England
-----------------------	---

Studium

Seit Oktober 1997	Medizinstudium in Tübingen
August 1999	Physikum
August 2000	1. Staatsexamen
April 2003	2. Staatsexamen
Okt. 03 - Sept. 04	Praktisches Jahr am Universitätsklinikum Tübingen und Dundee/Schottland
12.11.2004	3. Staatsexamen