

II. Ergebnisse

1. Lokalisation von M6B

1.1 M6B-Expression in primären Zellen

Die Mitglieder der PLP/DM20-Familie werden in unterschiedlichen neuronalen Zelltypen exprimiert (Abb. 6, 7 und 8). Das Proteolipid Protein (PLP) ist im Zentralnervensystem (ZNS) auf Oligodendrozyten (Lees & Brostoff, 1984; Nave & Milner, 1989) und M6A auf Neuronen beschränkt (Baumrind et al., 1985; Lund et al., 1986), während M6B in beiden Zelltypen exprimiert wird. Expressionsanalysen von M6B basieren bisher nur auf mRNA-Daten (Yan et al., 1996). Mit einem von H. Werner zur Verfügung gestellten M6B-Antiserum (H. Werner, 1996) gegen einen C-Terminus von M6B, die ω -Domäne (Serum M6B ω 1), sollte die endogene Expression des M6B-Proteins in neuronalen Zellen untersucht werden.

Die Spezifität des Antiserums wurde durch Vorinkubation mit dem Immunisierungspeptid getestet. Das Ausbleiben der M6B-Immunfärbung durch das Peptid wird in Abb. 4D gezeigt. Das Immunisierungspeptid weist 72% Sequenz-Identität zum M6A-C-Terminus auf. Die fehlende Kreuzreaktivität des Serums mit M6A wurde durch Immunfärbungen von M6A und M6B überexprimierenden COS-7 Zellen untersucht. Nur M6B einzeltransfizierte COS-7 Zellen zeigen eine Färbung durch das Antiserum (nicht gezeigt).

Um die endogene Expression von M6B *in vitro* untersuchen zu können, sollte im Rahmen dieser Arbeit die Erhaltung von primären Kulturen von Hippocampus-, kortikalen und Kleinhirnnuronen der Ratte und der Maus etabliert werden. Weiterhin sollte die Kultivierung von primären Oligodendrozyten der Maus optimiert werden. In primären Einzelkulturen der Ratte und des Mausgehirns reagiert das M6B ω 1-Antiserum mit dissoziierten Neuronen (Abb. 6, 7) und Oligodendrozyten (Abb. 8). Astrozyten exprimieren kein M6B wie es nach Doppelfärbung mit dem entsprechenden zelltypspezifischen Marker GFAP zu erkennen ist (Abb. 5). Dieses Ergebnis stimmt mit den *in situ* Hybridisierungsdaten von Yan et al. (1996) überein, die M6B-mRNA in der weißen und grauen Substanz detektieren konnten.

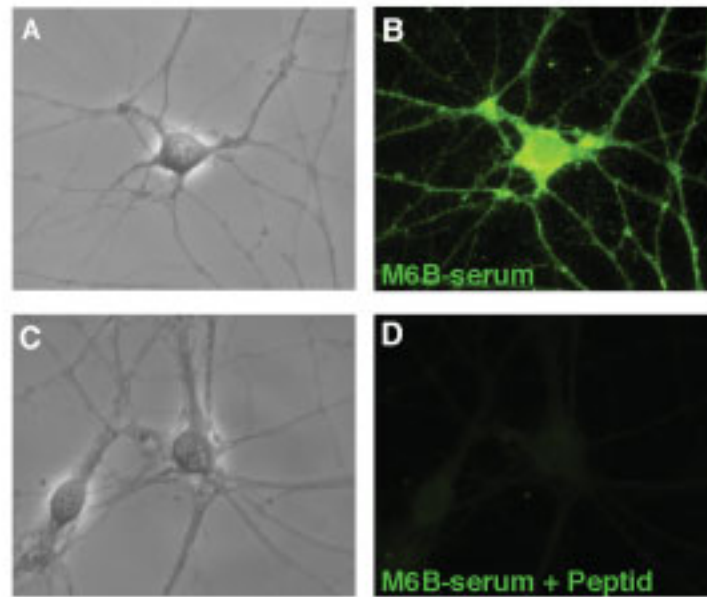


Abb. 4: M6B-Antiserum erkennt spezifisch nur das M6B-Protein. Hippocampus-Neuronen der Ratte wurden mit dem M6B-spezifischen anti-M6B ω 1-Serum gefärbt (B). Das M6B ω 1-Antiserum wurde für eine halbe Stunde mit 100 ng/ml des Immunisierungspeptids geblockt und damit wurde die Färbung durchgeführt (D). Ein Immunsignal war in diesen Zellen nicht nachweisbar, was für eine Spezifität des Antiserums spricht. A, C: Durchlichtaufnahmen.

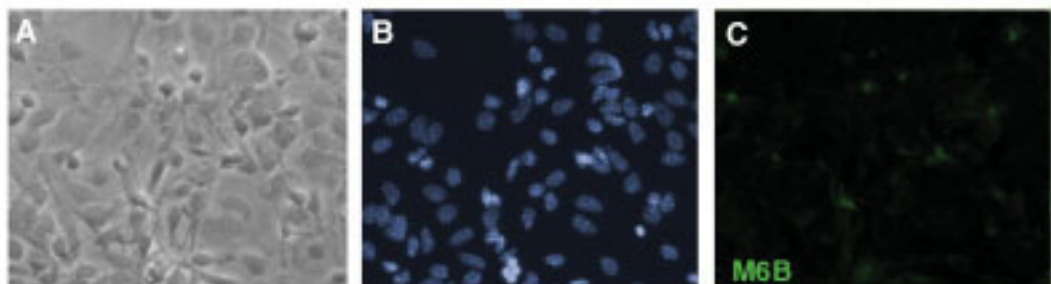


Abb. 5: M6B wird nicht in Astrozyten exprimiert. Immunzytochemische Färbung von primären Astrozyten der Maus mit dem M6B ω 1-Antiserum (C). Alle Zellen sind negativ für dieses Epitop. A: Durchlichtaufnahme; B: Hoechst-Färbung (Kernfärbung).

1.1.1 M6B-Expression in Neuronen

Primäre Kulturen von hippocampalen Neuronen der Ratte wurden angelegt und nach 13 bzw. 16 Tagen *in vitro* mit dem M6B ω 1-Antiserum und verschiedenen neuronalen Markern (z.B. M6A, Map-2, NeuN) zur Identifizierung des Zelltyps immungefärbt. M6B ist in intrazellulären Kompartimenten abundant, in retikulären Strukturen sowie an der Zelloberfläche und in den langen und stark verzweigten Neuriten lokalisiert (Abb. 6).

M6B ist auch stark in den Wachstumskegeln vertreten (s. Vergrößerung der Abb. 6B), eine Lokalisation, die bereits für das andere neuronale Proteolipid, M6A, beschrieben wurde (Baumrind et al., 1992). Bei Doppelfärbungen dieser Zellen mit dem M6B ω 1-Serum und dem M6-Antikörper, der spezifisch M6A erkennt, kann man eine unterschiedliche Lokalisation der zwei neuronalen Proteolipide erkennen (Abb. 6B,C,D). M6A ist im Gegensatz zu M6B nur schwach im Zellinneren zu detektieren, während es an der Zelloberfläche mit M6B kolokalisiert. Bemerkenswert ist auch, dass M6A nicht in allen hippocampalen Neuronen zu finden ist (Pfeil in 6G), während M6B (Abb. 6F) in jeder Map-2-positiven und somit in jeder neuronalen Zelle detektierbar ist.

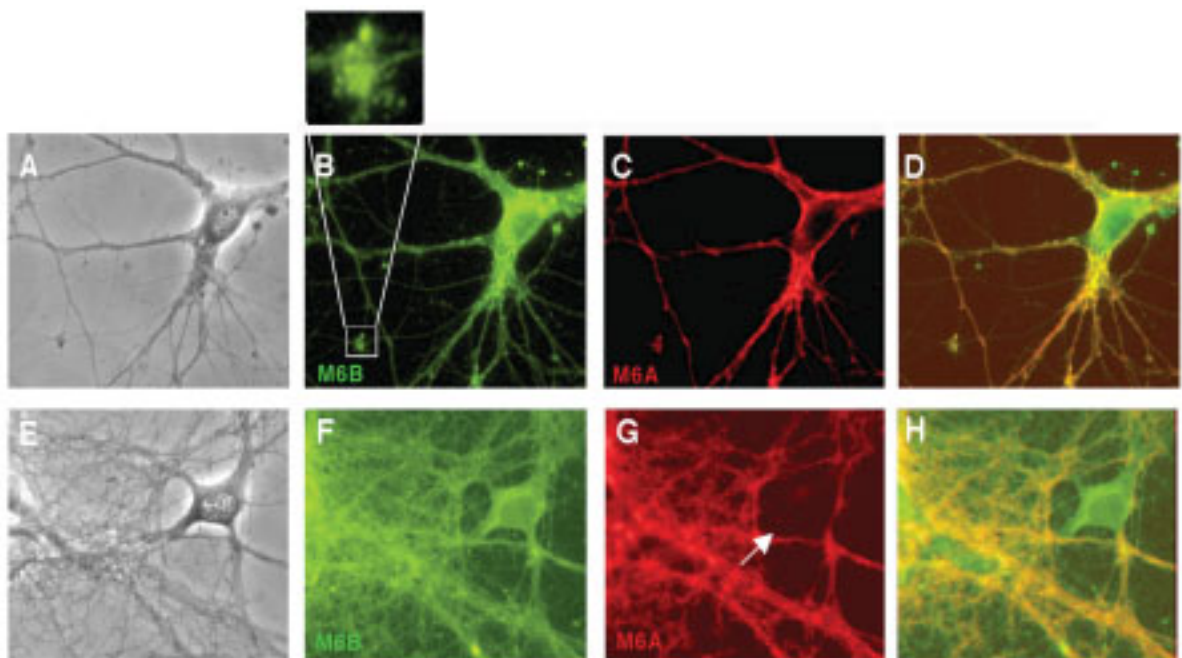


Abb. 6: M6B und M6A werden in primären Hippocampus-Neuronen exprimiert. Primäre Kulturen von hippocampalen Neuronen der Ratte wurde mit dem M6B ω 1-Antiserum (B, F) und dem M6A-spezifischen M6-Antikörper (C, G) gefärbt. M6B ist abundant in retikulären Strukturen sowie an der Zelloberfläche, in den langen und stark verzweigten Neuriten (B) und in den Wachstumskegeln (Vergrößerung von B). M6A ist wiederum hauptsächlich an der Zellmembran lokalisiert (C). M6B wird in jedem hippocampalen Neuron exprimiert (F), während M6A in einer kleinen Subpopulation nicht detektierbar ist (Pfeil in G). A, E: Durchlichtaufnahmen; D, H: Überlagerung.

Immunfärbungen mit dem M6B ω 1-Antiserum zeigen die gleiche Lokalisation von M6B in allen Neuronen, auch in denen der Maus, unabhängig von der Region des Gehirns, aus der sie isoliert wurden. Es werden Färbungen von embryonalen kortikalen Kulturen (Abb. 7C) und von Kleinhirnneuronen (Abb. 7F) der Maus gezeigt.

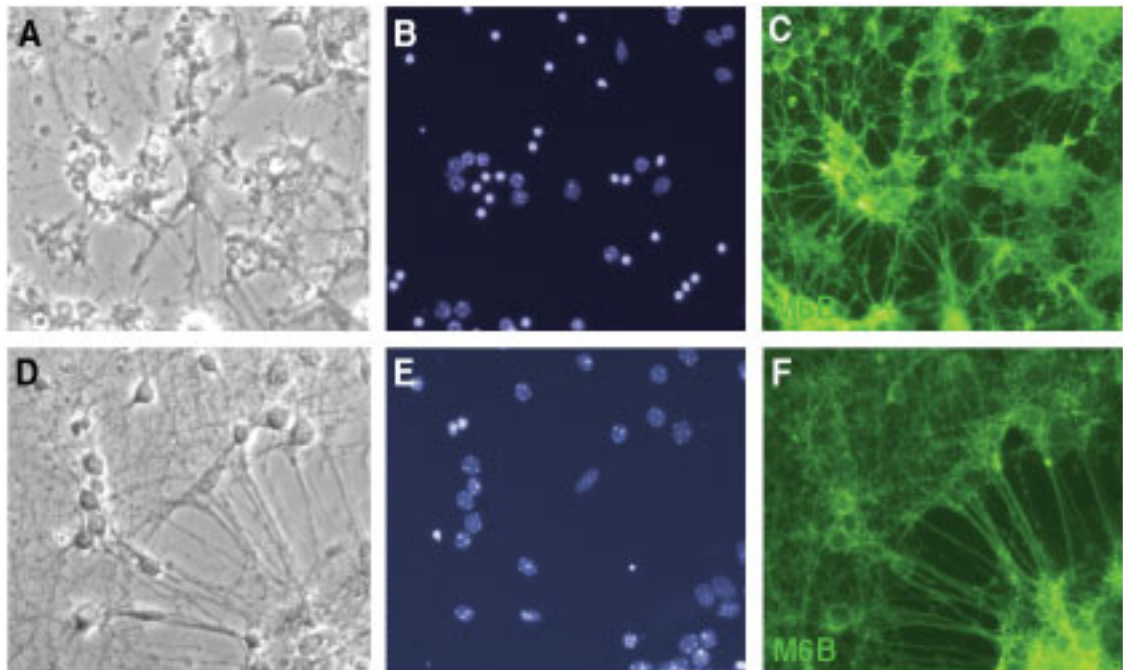


Abb. 7: M6B-Proteinexpression in Neuronen aus verschiedenen Gehirnarealen. Immunzytochemische Färbung von embryonalen cortikalen (A-C) und postnatalen Kleinhirnnuronen (D-F) der Maus mit dem anti-M6B ω 1-Serum. M6B wird in jeder dieser Zellen exprimiert (C und F). A, D: Durchlichtaufnahmen; B, E: Hoechst-Färbung.

1.1.2 M6B-Expression während der Oligodendrozyten-Differenzierung

Postnatale primäre Kulturen von Oligodendrozyten der Maus wurden mit Hilfe der Abschüttelmethode nach Gard *et al.* (1988) angelegt. Die isolierten Zellen sind in der Lage, *in vitro* aus Vorläuferzellen zu reifen Oligodendrozyten zu differenzieren, wenn sie in einem Medium mit den entsprechenden Faktoren kultiviert werden (Sato-Medium, Bottenstein and Sato, 1979; Bögl et al., 1990; Barres et al., 1992). Oligodendrozyten-Vorläuferzellen wurden für 12h, 24h und 72h in Differenzierungsmedium inkubiert und dann fixiert. Somit wurden unterschiedliche Differenzierungsstadien der Zellen erhalten. Diese Zellen wurden dann mit dem M6B-Antiserum (Abb. 8B,E,H) sowie mit verschiedenen Oligodendrozyten-Differenzierungsmarkern (Abb. 8A,D,G) immungefärbt: O4⁺ für Oligodendroblasten (Abb. 8A), O1⁺ für unreife Oligodendrozyten (Abb. 8D) und O10⁺ für reife Oligodendrozyten (Abb. 8G). M6B wird während des gesamten Verlaufs der Oligodendrozytendifferenzierung stark exprimiert (Abb. 8B,E,H) und ist sogar in bipolaren Vorläuferzellen nachzuweisen (nicht gezeigt). Hieraus lässt sich schließen, dass M6B-Expression der Expression des anderen Vertreters der PLP/DM20-Familie, PLP (Abb. 8G), vorausgeht.