

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Die Rolle von B-Raf im Nervensystem und der Myelinisierung

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag. rer.nat.)

Verfasserin / Verfasser:	Christine Wasinger
Matrikel-Nummer:	0247347
Studienrichtung / Studienzweig (lt. Studienblatt):	Biologie / Genetik und Mikrobiologie
Betreuerin / Betreuer:	Univ.-Prof. Dr. Manuela Baccarini, Dr. Gergana Galabova-Kovacs

Wien, März 2010

Diese Diplomarbeit wurde erstellt an der

Universität von Wien

Department für Mikrobiologie und Immunbiologie

Max F. Perutz Laboratorien

und betreut durch

Dr. Gergana Galabova-Kovacs und

Univ.-Prof. Dr. Manuela Baccarini

DANKSAGUNG:

Ich danke herzlich Univ.-Prof. Dr. Manuela Baccarini für die Ermöglichung und die Finanzierung meiner Themenstellung. Für den anregenden und aufregenden Wissensaustausch mit ihr und die Möglichkeit meinen Horizont zu erweitern.

Ein sehr großes Dankeschön möchte ich an Dr. Gergana Galabova-Kovacs richten für die geduldige und hervorragende Einführung und das tolle Anleiten in die wissenschaftliche Arbeit. Ihre ruhige Art bei meiner Betreuung durch die Diplomarbeit und dessen Beibehaltung auch wenn es manchmal ein wenig turbulenter wurde.

Ebenso ein großes Dankeschön an meine Arbeitskollegen im Labor, die mir oft mit Rat weiter helfen konnten und ein nettes Arbeitsklima ermöglichten in dem ich mich wohl fühlte.

Ein tiefer Danke richtet sich an meine Familie, die mit ihrer Vielfalt mir mit Rat und Tat zur Seite standen, mir meine Grenzen zeigten und mich darüber hinaus wachsen liessen. Den Rücken stärkten, wenn ich für die Aufgaben, die vor mir lagen mich doch noch nicht bereit fühlte und mich so durch die stürmischen, und ruhigen Phasen meines Studiums und Lebens begleiten.

Danke möchte ich Caroline und Sandra sagen, die mit ihrer tiefen Freundschaft mich seit Jahren begleiten, mich menschlich wachsen liessen und großartige moralische Unterstützung leisteten in den vergangenen Monaten um mein Studiumsabschluss zu erreichen. Danke euch vielmals ihr Süßen.

Inhaltsverzeichnis

I. Zusammenfassung.....	8
II. Einleitung.....	12
MAPK- Signalweg.....	12
<i>Raf</i>	13
B-Raf im zentralen Nervensystem.....	14
B-Raf im peripheren Nervensystem.....	15
Das Nervensystem.....	17
<i>Das zentrale Nervensystem (ZNS)</i>	17
<i>Das periphere Nervensystem (PNS)</i>	17
<i>Zellen des Nervensystems</i>	18
Neuronen.....	18
Gliazellen.....	20
<i>Der Ursprung der Zellen im Nervensystem</i>	21
Entwicklung von Zellen der Neuralleiste zu reifen Schwann-Zellen.....	21
Myelinhülle.....	24
<i>Aufbau der Myelinhülle:</i>	24
<i>Myelinhüllen-spezifische Proteine im PNS</i>	25
Protein Zero (P0).....	27
Peripheral myelin protein 22 (PMP22).....	27
Myelin basic protein (MBP).....	27
Myelin associated glycoprotein (MAG).....	27
Connexin 32 (Cx32):.....	28
E-Cadherin (E-cad):.....	28
<i>Entwicklung der Myelinhülle im PNS:</i>	29
Transkriptionsfaktoren und Signale für die Etablierung der Myelinhülle:.....	30
Ziele dieser Diplomarbeit.....	31
III. Ergebnisse.....	32
B-Raf Deletion in Neuronalen Vorläuferzellen führt zu einem Phänotyp im PNS.32	
<i>Kontrolle der b-raf Deletion in NestinCre;b-raf^{fl/f}(b-rafΔ/ΔN) Tieren.....</i>	37
b-raf Deletion in Schwann-Zellen erzeugt einen anderen Phänotypen als im Fall der b-raf Deletion in neuronalen Vorläuferzellen.....	40
<i>Kontrolle der b-raf Deletion in P0Cre;b-raf^{fl/f}(b-rafΔ/ΔSC) Mäusen.....</i>	43
Experimente zur Myelinhüllen Entwicklung.....	47
Studie zur Myelinhüllen Protein Zusammensetzung.....	52
<i>Einfluss von B-Raf auf die Myelin spezifischen Proteine:</i>	55

IV.Diskussion.....	58
b-raf Deletion in neuronalen Vorläuferzellen und die daraus folgenden Konsequenzen	58
b-raf Deletion in Schwann-Zellen und die resultierende Schlussfolgerungen.....	63
V.Material und Methoden.....	64
Mauslinien.....	64
Primäre Schwann-Zellen/Neuronen Co-Kulturen aus Spinalganglien.....	64
Immunohistochemische Färbung von den Schwann-Zellen/Neuronen Co-Kulturen auf	
Objektträgern.....	67
Genotypisierung der Mäuse.....	70
Western-Blot Analyse.....	71
Elektronenmikroskopische Untersuchung.....	75
VI.Referenzen.....	76
VII.Lebenslauf.....	80
Persönliche Daten:.....	80
Ausbildung:.....	80

I Zusammenfassung

B-Raf ist jene Raf-Kinase, welche im neurologischen Gewebe am stärksten exprimiert wird (Wojnowski L. et al. 2000). Als Teil des MAPK-Signalweges trägt es somit zur Regulierung von Überleben, Migration, Wachstum, Differenzierung und Apoptose der Zelle bei (Kolch W. 2000). All diese Eigenschaften einer Zelle spielen eine zentrale Rolle in der normalen Entwicklung des Nervensystems (Jessen K. 2005).

Galabova-Kovacs et al. (2008) fand heraus, dass die Deletion von B-Raf in neuronalen Vorläuferzellen zu einem Arrest in der Entwicklung von Oligodendrozyten führt. Dieser Entwicklungsstopp ist durch eine Ausprägung von zahlreichen neurologischen Symptomen im zentralen Nervensystem (ZNS) bemerkbar und mündet in einen frühzeitigen Tod, 21 Tage nach der Geburt.

In dieser Arbeit wurde über *in vitro* und *in vivo* Experimente, die Auswirkung von der B-Raf Deletion in neuronalen Vorläuferzellen auf das periphere Nervensystem (PNS) untersucht. Dazu wurde zusätzlich zu der Mauslinie mit der Deletion in neuronalen Vorläuferzellen (NestinCre⁺; b-raf^{f/f} (b-raf^{Δ/ΔN})), auch eine Mauslinie, (P0Cre⁺; b-raf^{f/f} (b-raf^{Δ/Δ SC})), in der B-Raf in Schwann-Zellen Precursors deletiert wird, verwendet.

NestinCre⁺; b-raf^{f/f} (b-raf^{Δ/ΔN}) Tiere zeigten keine Entwicklungsstörung im PNS. Ihre Schwann-Zellen waren von der Deletion nicht betroffen, lediglich ihre Neuronen waren B-Raf negativ. Dennoch hatte die Abwesenheit von B-Raf in den Neuronen auf Schwann-Zellen einen dramatischen Einfluss: die gebildeten Myelinscheiden begannen zu degradieren. Auf der molekularen Ebene konnte, sowohl eine erhöhte Expression von Connexin 32 und pERK gezeigt werden, als auch eine Deregulation in der Proteinmenge andere Myelinhüllen Proteine.

Daraus konnten nun folgende Schlussfolgerungen abgeleitet werden. Die Deletion von B-Raf in neuronalen Vorläuferzellen kommt in den Neuronen, nicht aber in Schwann-Zellen zu tragen, auch wenn beide Zelllinien von diesen Vorläuferzellen abstammen. Dennoch führt es dazu, dass im PNS die Stabilität und Aufrechterhaltung der Myelinhülle nicht gewährleistet werden kann. Der neurologische Phänotyp im ZNS ging aus einer Entwicklungsstörung der Oligodendrozyten hervor. Der Phänotyp im PNS hingegen dürfte durch ein Kommunikations-

problem zwischen Neuronen und Schwann-Zellen entstehen. Diesem Problem versucht die Schwann-Zelle durch eine erhöhte Gap-Junction Bildung, sowohl in der Myelinhülle, als auch zwischen Myelinhülle und Neuron, entgegen zu wirken. Dennoch kann die erhöhte Expression von Connexin 32, als Baustein der Gap-Junction, diesem nicht entgegen wirken und es kommt durch Erhöhung des pERK-Gehalts in der Schwann-Zelle zur Induktion der Dedifferenzierung. Dieses führt zum Abbau der Myelinscheide.

Die Tiere der $P0Cre^+; b\text{-raf}^{ff/f}(b\text{-raf}^{\Delta/\Delta SC})$ Linie konnten sich normal entwickeln. Auch sie wiesen einen Unterschied in der Expression von Myelin-Proteinen auf. Dieses geschah aber in einem anderem Entwicklungsstadium, auf Grund der erst spät greifenden Deletion in den Schwann-Zellen, wodurch auch kein Vergleich zwischen den Mauslinien gezogen werden konnte oder Rückschlüsse auf die B-Raf Funktion in Schwann-Zellen in deren Entwicklung.

Abstract

B-Raf is the main Raf-kinase, expressed in neurological tissues (Wojnowski L. et al. 2000). As part of the MAPK pathway, Raf contributes to the regulation of survival, differentiation, proliferation and apoptosis of cells (Kolch W. 2000). All these properties of a cell play a critical role in normal nervous system development (Kolch W. 2005).

Galabova-Kovacs et al. (2008) found out, that deletion of b-raf in neuronal precursor cells leads to an arrest in the development of oligodendrocytes. That stop is evidenced by numerous neurological symptoms in the central nervous system (CNS), and results in a premature death at day 21 after birth.

In this thesis the influence of b-raf deletion in neural precursor cells of the peripheral nervous system (PNS) was investigated by *in vitro* and *in vivo* experiments. In addition to the mouse line with the deletion in neural progenitor cells (NestinCre⁺; b-raf^{f/f} (b-raf^{Δ/ΔN})), also a mouse line, (P0Cre⁺; b-raf^{f/f} (b-raf^{Δ/Δ SC})), in which B-Raf was deleted in Schwann cell precursors, is used.

NestinCre⁺; b-raf^{f/f} (b-raf^{Δ/ΔN}) animals did not showed development problems in the PNS. Their Schwann cells were not affected from the deletion, only their neurons were B-Raf negative. However, the absence of B-raf in the neurons leaded to a dramatical influences in the schwann cells; the myelin sheath started to degrade. At the molecular level a higher expression of connexin 32 and pERK was detected, and also a deregulation of proteins of the myelin sheath was found.

The following conclusions are derived from these results. Deletion of B-Raf in neuronal precursors occurs in the neurons, but not in Schwann cells, even though both cell lines arise from these progenitor cells. Nevertheless, the stability and maintenance of the myelin sheath can not be guaranteed in the PNS. The neurological phenotype in the CNS has emerged from a developmental disorder of oligodendrocytes. However, the phenotype in the PNS is likely caused by a problem of communication between neurons and Schwann cells. The Schwann cell tries to counteract this issue by increasing the gap-junction formation, both in the myelin sheath and between the myelin sheath and neuron. Despite the increased expression of con-

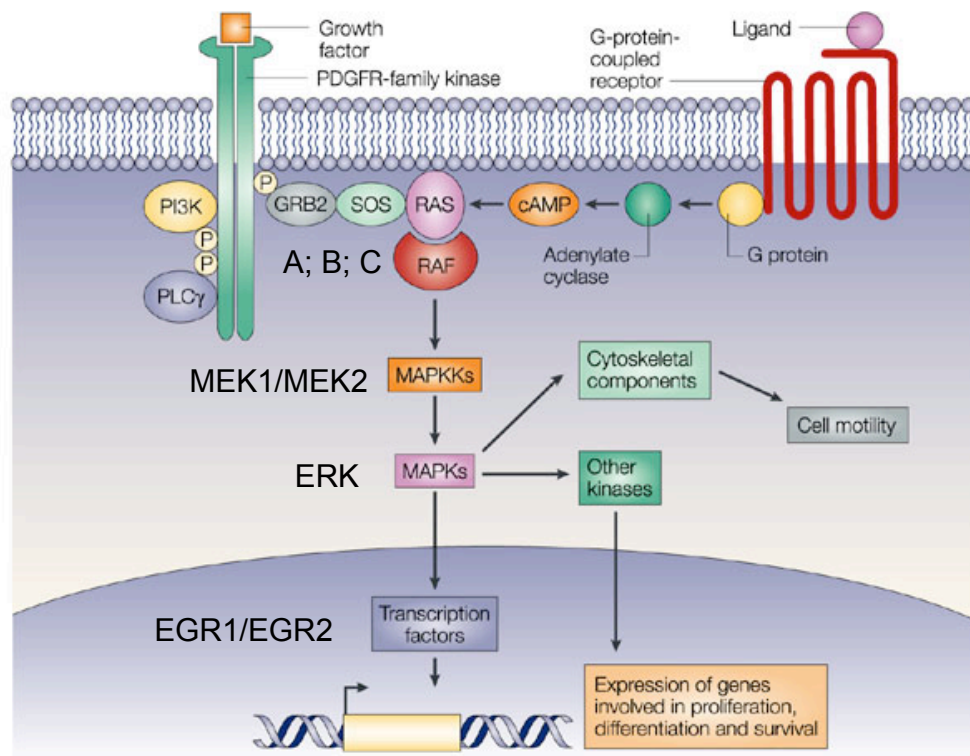
nexin 32, as part of the gap-junctional can not counteract this and it comes by increasing the level of pERK in the Schwann cell to dedifferentiation, which leads to the degradation of the myelin sheath.

The animals of the $P0Cre^{+}; b\text{-raf}^{f/f}(b\text{-raf}^{\Delta/\Delta SC})$ line had a normal development, although these animals showed a difference in their expression of the myelin specific proteins but this shift was in another development stage. The reason for this, may lie in the delay of the b-raf deletion. Because of this, it is not possible to compare these mouse lines.

II. Einleitung

II.1. MAPK- Signalweg

Der **mitogen-activated-protein-kinase** (MAPK) Signalweg (Fig. 1) ist in allen Eukarionten vorhanden und hat eine tragende Rolle in der Zelle. So wurde seine Mitwirkung bei Überleben, Differenzierung, Proliferation oder aber auch Apoptose in verschiedenen Zellen gezeigt. Das Grundprinzip in dieser Signaltransduktion ist, dass ein eintretendes Signal aus der Umwelt mittelst eines G-Proteins und einer Kinase-Kaskade, sowohl in seiner Stärke als auch in seiner Dauer modifiziert wird und schließlich so das Verhalten der Zelle verändert. Die beteiligten Proteine in diesem Signalweg bieten verschiedene Interaktionspunkte für andere Proteine als auch Regulationsmöglichkeiten für den Signalweg (Kolch W. 2000).



1.Figur: Schematische Darstellung des MAPK-Signalweges (Dibb N. et al. 2004)

Eine Vielzahl von Hormonen, Wachstumsfaktoren sowie Tumor-Promoting Faktoren wirken als Stimulus auf einen Rezeptor, der dann Ras (**rat sarcomar**) aktiviert. Ras zählt zur Gruppe der G-Proteine, welche durch einen Austausch von GDP mit GTP in ihre aktive Form ge-

bracht werden können (Kolch W. 2000).

Viele extrazelluläre Stimuli wirken über eine Rezeptor-Tyrosin-Kinase, die nach Bindung ihres Ligandens Autophosphorylierung unterläuft. Einige dieser Phosphorylierungsstellen werden dann von dem Adaptor Protein, GRB2 (**g**rowth factor **r**eceptor **b**ound protein **2**), erkannt. Dieser Adaptor trägt eine SH2 Domäne, wodurch er den Rezeptor bindet und eine SH3 Domäne, die diesem die Interaktion mit SOS (**s**on **o**f **s**evenless) erlaubt. SOS ist ein cytosolischer Guanin-Exchanging Faktor, der durch die Bindung an die SH3 Domäne von GRB2 zur Membran transloziert wird. Die dadurch entstandene räumliche Nähe zum membrangebundenen Ras erlaubt SOS den Austausch von GDP zu GTP bei Ras zu katalysieren (Bivona T. 2003). Ras in seiner GTP-gebundenen Form kann nun seinerseits die Aktivierung von Raf (**r**apidly growing **f**ibrosarcomas) bewerkstelligen. Raf, als erster der drei Kinasen von der ERK-Kaskade, transferiert eine Phosphatgruppe auf MEK (mitogen-activated protein kinase/ ERK kinase), die so aktiviert wird und in der Lage ist ERK (extra-cellular signal regulated kinase) zu phosphorylieren. ERK in seiner aktiven Form wiederum wandert dann vom Cytoplasma in den Zellkern und kann dort verschiedene Transkriptionsfaktoren, wie EGR1 oder Krox20 (EGR2), aktivieren oder inaktivieren. Die Änderung in der Aktivität der Transkriptionsfaktoren führt zu einem veränderten Expressionsmuster und die daraus resultierenden Proteine wiederum beeinflussen Wachstum, Überleben, Differenzierung oder Migration der Zelle (Wellbrock C. et al. 2004). Der gesamte Signalweg ist ATP abhängig (Kolch W. 2000).

II.1.1.Raf

Es existieren drei verschiedene Raf Proteine in Säugetieren; A-Raf, B-Raf und Raf1 (C-Raf). Raf1 wird im gesamten Organismus gleichmässig exprimiert, während A-Raf und B-Raf ein etwas gewebespezifischeres Expressionsmuster aufweisen. Jede dieser Kinasen bewerkstelligt, obwohl sie im gleichen Signalweg mitwirken, eine andere Aufgabe in der Zelle und dadurch ist die Kompensation bei Ausfall einer der Kinasen nicht völlig gewährleistet (Kolch W. 2000).

Man fand heraus, dass alle drei Raf Proteine einen ähnlichen Strukturaufbau haben und drei konservierte Regionen tragen. Zwei dieser Regionen liegen im N-terminalen Teil, welche die Ras Bindungsstelle inkludiert und eine im C-terminalen Teil des Proteins. (Wellbrock C. et al. 2004; Kolch W. 2000). Aktivierung dieser Kinasen erfolgt durch Phosphorylierung und/oder

einer Konformationsänderung, wodurch intra-molekulare Interaktionen aufgehoben werden und so das Kinase-Segment zugänglich für die Interaktion mit anderen Proteinen wird (Kolch W. 2000).

Weiters wurde gezeigt, dass die Deletion von einem der drei Raf Proteine in der Keimbahn unterschiedliche Folgen hat. Während a-raf Deletion in Mäusen zu einem vorzeitigen Tod zwischen dem 7 bis 21 Tag nach der Geburt führt, ist die Deletion von b-raf oder c-raf schon embryonal letal, und zwar zwischen dem 10,5 und 12,5 Tag nach der Befruchtung. A-raf Abwesenheit in der Keimbahn führt zu gastrointestinalen und neurologischen Defekten bei den Tieren (Pritchard CA. et al. 1996). Hingegen führt b-raf Deletion in der Keimbahn zu Wachstumsretardierung, Problemen in der Vaskularisierung (Galabova-Kovacs G. et al. 2006) und erzeugt neurologische Defekte in den Embryos (Wojnowski L et al. 1997). C-Raf Abwesenheit erzeugt massive Apoptose in der Leber, wodurch die Embryonen frühzeitig sterben (Mikula M. et al. 2001). Deletion nach diesem Zeitpunkt in der Entwicklung führt trotzdem zu einem frühzeitigen Tod kurz nach der Geburt. In diesem Fall kämpfen die Tiere aber mit Entwicklungsproblemen der Lunge und der Haut und nicht mit Apoptose in der Leber (Wojnowski L et al. 1998).

II.1.1.a. B-Raf im zentralen Nervensystem

Die B-Raf Kinase wird verstärkt in neurologischen Gewebe exprimiert und ist dort der Hauptaktivator von MEK, wobei MEK Aktivierung entweder direkt oder indirekt über Rekrutierung von C-Raf bewerkstelligt wird. Frühere Studien zeigten dass konventionelle b-raf Deletion im Embryo letal ist, auf Grund von Vaskularisierungsproblemen der Plazenta (Galabova-Kovacs G. et al.; 2006). Deletion vom b-raf Allel im Epiblast hingegen hatte keine Auswirkung auf die Embryonalentwicklung. Jedoch entwickelten die Tiere in den drei Wochen nach der Geburt extreme Wachstumsprobleme, Tremore, Koordinationsprobleme, und starben 21 (P21) Tage nach der Geburt (Galabova-Kovacs G. et al.; 2008).

Angetrieben durch diese Hinweise wurden weitere Experimente gemacht, in denen b-raf spezifisch in neuronalen Vorläuferzellen deletiert war. Tatsächlich konnte der gesamte beobachtete Phänotyp der Epiblast gerichteten b-raf Deletion rekapituliert werden. Es zeigte sich, dass das Wachstum der Mäuse um den postnatalen Tag 10 aussetzte und die Mäuse ebenfalls frühzei-

tig am 21. Tag starben. Zu diesem Zeitpunkt hatten sich bereits Koordinationsprobleme, Tremore, Ataxia und Muskelschwächen eingestellt. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass in diesen Mäusen eine Akkumulation von Granulazellen im Kleinhirn statt fand, welche im Zusammenhang mit der beobachteten Ataxia steht. Durch verschiedene Techniken konnten weiters eine signifikante Reduzierung in myelinisierten Axonen als auch im Myelinisierungsprozess selbst gezeigt werden.

Um für diese Tatsachen eine Erklärung zu finden wurden Entwicklungsstudien vorgenommen, da von den neuronalen Vorläuferzellen, sowohl Neuronen als auch Gliazellen sich entwickeln, und Gliazellen verantwortlich für die Bildung von den Myelinhüllen sind. Die *in vitro* Studien von Mixkulturen aus Neuronen und Gliazellen, lieferten eine entscheidende Erklärung. Es fand sich, dass die B-Raf Abwesenheit keinen Einfluss auf A-Raf hatte, jedoch zu einer erhöhten Expression von C-Raf führte. Dennoch konnten diese Raf Kinasen die Lücke von B-Raf in den Gliazellen nicht füllen, und die Aktivität von ERK aufrecht erhalten. Dieses wiederum machte sich in einer reduzierten Aktivität von EGR1 bemerkbar (Galabova-Kovacs G. et al.; 2008). Aus der Literatur war bekannt, dass die Aktivierung von EGR1 in unreifen Oligodendrozyten das Programm für die Differenzierung anschaltet und somit letztendlich die Bildung der Myelinhülle (Harada et al. 2001). In den *in vitro* Experimenten mit b-raf Knockout Kulturen konnte gezeigt werden, dass diese nur unzureichend differenzierten (Galabova-Kovacs G. et al.; 2008).

Diese Studie zeigte deutlich, dass B-Raf für die Teilung oder das Überleben von Neuron und Oligodendrozyten nicht essentiell ist, aber dass es eine entscheidende Rolle in der Oligodendrozyten Reifung trägt. Da erhöhte Expression von C-Raf den pERK Level nicht halten konnte, ist B-Raf der Hauptaktivator von ERK in Oligodendrozyten. Somit dient dieses Protein als Angelpunkt für Oligodendrozyten Entwicklung, direkt oder via einem anderem Signal (Galabova-Kovacs G. et al.; 2008).

II.1.1.b. B-Raf im peripheren Nervensystem

Im PNS sind Schwann-Zellen für die Myelinhüllen Bildung verantwortlichen Gliazellen. Reife Schwann-Zellen arretieren in der G1-Phase, und sind teilungsaktiv. Die teilungsaktiven, unreifen Schwann-Zellen zeigen eine robuste PI3-Kinase und MEK Aktivität, induziert durch

Axon Kontakt und Glia-Wachstumsfaktoren (Maurel P. et al. 2000). Selbst bei Inhibierung von MEK haben Schwann-Zellen kein Problem in ihrer Proliferation, Elongation oder Reifung (die Schwann-Zellen Entwicklung wird in der nachstehenden Einleitung noch genauer erläutert). Wird die PI3-Kinase inhibiert bevor sich zwischen Schwann-Zellen und Axonen ein eins-zu-eins Verhältnis eingestellt hat, zeigen Schwann-Zellen ein abnormales Elongationsverhalten, welches zu Abnormalitäten in der Myelinisierung führt. Wenn hingegen PI3 erst nach diesem Zeitpunkt inaktiviert wird in Schwann-Zellen, können diese zwar die Myelinisierung induzieren, aber die erzeugten Myelinscheiden sind kürzer als es normalerweise der Fall ist und weisen eine geringere Protein Konzentration auf (Maurel P. et al. 2000).

Schwannomas sind Tumore, die sich aus Schwann-Zellen entwickeln. In diesen Tumoren wurde eine erhöhte Aktivität der Raf/MEK/ERK- Kaskade gefunden, welche im Zusammenhang mit der vermehrten Proliferation der tumorösen Schwann-Zellen steht. Wird in diesen Tumoren die Phosphorylierung von ERK inhibiert, kehren die Schwann-Zellen zurück in ein normales Maß an Zellteilungen (Ammoun S. et al. 2008). In anderen malignen peripheren Nervenhäuten Tumoren, wurde ebenfalls eine erhöhte B-Raf Expression bewiesen. Diese induziert vermehrte Aktivität von MEK und ERK, wodurch die Transkription von Cyclin D1 angehoben wird. Dieses wiederum aktiviert dann die CDK, die pRb phosphoryliert, welches dann den Übertritt der Schwann-Zelle aus ihrem Zellzyklusarrest in der G1-Phase in die S-Phase induziert (Abrosini G. et al. 2008).

Dies zeigt deutlich, dass B-Raf und der MAPK-Signalweg eine tragende Rolle in der Proliferation von Schwann-Zellen hat. Während seine Involvierung in der Myelinisierung immer noch in vielen Fragen sehr unklar ist.

II.2. Das Nervensystem

Das Nervensystem vollzieht drei Hauptaufgaben in Vertebraten: (Campbell et al. 2003)

- Input von sensorischen Informationen
- Integration dieser Informationen
- Output von Information in Form von motorischen Impulsen.

Das Nervensystem an sich ist aus zwei Zelltypen aufgebaut; den Neuronen und den Gliazellen. Beide Zellarten sind wichtig für die Ausführung der oben genannten Aufgaben (Jessen K. 2004). Weiters wird das Nervensystem selbst noch in zwei Teile gegliedert, das zentrale Nervensystem, zu dem das Gehirn und Rückenmark zählen und das periphere Nervensystem.

II.2.1. Das zentrale Nervensystem (ZNS)

Das Hirn hat integrative Funktionen und ist hauptsächlich für das komplexe Verhalten von Vertebraten verantwortlich. Es analysiert Signale aus der Umwelt, integriert diese Informationen und erzeugt chemische und elektrische Signale, die eine Reaktion auf die Umwelt ermöglichen. Das Rückenmark hingegen, ist die Kommunikationsachse zwischen zentralen und peripheren Nervensystem und leitet die entsprechenden elektrischen Impulse weiter. Es ist zusätzlich noch für die Erzeugung von einfachen Reflexen, wie dem Kniesehnen Reflex, verantwortlich. Bei einem Reflex kommt es ohne Beteiligung des Hirnes zu einer automatischen motorischen Reaktion auf einen Reiz. Da das ZNS selbst eine tragende Rolle im Körper spielt und das Leben mit Defekten dieses Systems meist unvereinbar ist, sind in der Evolution einige Schutzmechanismen entwickelt worden. So ist das ZNS umgeben von der Hirnhaut, welche aus drei Membranen besteht, von denen jede eine andere Funktion innehat. Zusätzlich wird das ZNS vor mechanischen Schäden noch mit einer Knochenummantelung geschützt. Zu guter letzt sorgt die Blut-Hirn-Schranke für Schutz gegen Bakterien, Viren und andere chemische Stoffe, die aus dem Körper oder von der Umwelt her in das Nervensystem eindringen wollen (Campbell et al. 2003).

II.2.2. Das periphere Nervensystem (PNS)

Als PNS werden all jene Teil des Nervensystems gezählt, die nicht zum zentralen Nervensystem gehören und somit weder durch Knochen, Hirnhaut noch Blut-Hirn-Schranke vom restli-

chen Körper abgeschirmt sind. Diese sind sowohl Nerven als auch Ganglien. Als Ganglion (Nervenknoten), wird die Akkumulation von neuronalen Zellkörpern, umgeben von einer Gewebekapsel im Körper, bezeichnet. Dabei unterscheidet man Spinalganglien, auch als Dorsalwurzelganglien (DRG) bezeichnet, welche beim Rückenmark aufsitzen, und autonome Ganglien, welche im umgebenden Gewebe von Organen liegen. Die Hauptfunktion des PNS ist das Sammeln von Informationen aus den diversen sensorischen Rezeptorzellen, wie von Sinnesorganen, das Einspeisen dieser Information in das Rückenmark, und die Umsetzung der vom Rückenmark erhaltenen Signale in Muskelkontraktionen und Drüsenfunktionen. (Campbell et al. 2003).

II.2.3.Zellen des Nervensystems

Das Neuron (Nervenzelle) ist verantwortlich für die Erzeugung von chemischen oder elektrischen Impulsen und leitet so Informationen weiter im Nervensystem. Damit bildet es die strukturelle und funktionelle Einheit dieses Systems. Die Gliazellen hingegen sind die Nährzellen der Neuronen und ermöglichen den Nervenzellen ihre Funktionsausübung (Campbell et al. 2003).

II.2.3.a. Neuronen

Neuronen bestehen aus einem Zellkörper, dem Soma, und vielen Zellfortsätzen, wobei die breiten, kurzen Fortsätze als Dendriten bezeichnet werden. Diese nehmen Informationen von der Umgebung auf und leiten die Impulse zum Zellkörper weiter, dort wird das Signal dann verarbeitet und über das Axon zu anderen Neuronen oder Effektorzellen, wie Muskel- oder Drüsenzellen, weiter geleitet. Jedes Neuron besitzt nur ein Axon, dieses ist der längste Fortsatz der Zelle und kann bis zu einem Meter lang werden, wie es der Fall ist bei den Neuronen, die bis zu den Zehen reichen müssen. Um mit mehreren Zielzellen kommunizieren zu können, spaltet sich das Ende eines Axons in zahlreiche synaptische Endigungen auf (Campbell et al. 2003).

Kommunikation zwischen Neuronen:

Die Information im Nervensystem wird auf zwei Arten weitergeleitet: innerhalb eines Neurons in Form von elektrischer Transmission und von einem Neuron zum nächsten über chemischer Transmission über die Synapse. Die elektrische Signalleitung wird durch das Membran-

potenzial einer Zelle erst ermöglicht. Jede Zelle hat ein Membranpotenzial, das über die Zusammensetzung der Ionen im Cytoplasma und den Ionen außerhalb der Zelle erzeugt wird, jedoch sind nur Neuronen und Muskelzellen in der Lage, das Membranpotenzial aktiv zu ändern. Dafür werden bei Reizung eines Neurons die spannungsabhängigen Ionenkanäle zum Öffnen oder Schließen stimuliert, je nachdem können positive Ionen über ihren Ionenkanal in oder aus der Zelle strömen, wodurch partiell das Membranpotenzial erhöht oder herabgesetzt wird. Dadurch werden die daneben lokalisierten spannungsabhängigen Ionenkanäle wiederum geöffnet oder geschlossen, und es kommt erneut zu einem Ionenstrom, auch als Aktionspotenzial bekannt. So gelangt das Signal zu den synaptischen Endigungen, in deren Cytoplasma sich eine Vielzahl von Vesikeln befindet, die mit einer chemischen Substanz, dem Neurotransmitter, gefüllt sind. Gelangt schließlich das Signal zum Axonende wird ein Mechanismus aktiviert, der das Verschmelzen der Vesikel mit der Cytoplasmamembran erlaubt, dadurch gelangt der Neurotransmitter in den synaptischen Spalt. Nach dessen Durchquerung bindet die Substanz an einen Rezeptor auf der Zelloberfläche des nächsten Neurons, wodurch wieder ein elektrischer Impuls ausgelöst wird und eine elektrische Transmission im nächsten Neuron stattfinden kann (Campbell et al. 2003).

Das Grundprinzip der elektrischen Transmission ist über spannungsabhängige Ionenkanäle und die damit einhergehende Veränderung des Membranpotenzials. Dennoch existieren zwei Arten davon, die kontinuierliche elektrische Erregungsleitung und die saltatorische Erregungsleitung. Bei der kontinuierlichen Erregungsleitung sind die spannungsabhängigen Ionenkanäle über die gesamte Cytoplasmamembran verteilt, wodurch die Induktion des Aktionspotentials entlang der gesamten Membran erfolgt. Dadurch bewegt sich ein Signal nur mit zirka 3m/sec fort. Diese Art der Transmission findet man bei Dendriten und einigen Axonen (Campbell et al. 2003).

Die saltatorische Erregungsleitung hingegen ist um ein 10 Faches schneller (Jessen K. 2004), so wird ein Signal in derselben Nervenfasern statt mit 3m/sec durch eine 15µm dicke Myelinhülle um die Faser schon mit 150m/sec weiter geleitet. Die Myelinhülle ist eine spezialisierte Cytoplasmamembran von Gliazellen, die eine Art elektrischen Isolator, der dicht um ein Axon liegt, bildet. Durch diese elektrische Abschottung von Axonabschnitten werden die spannungsabhängigen Ionenkanäle nur mehr zwischen zwei Myelinhüllen lokalisiert, bekannt auch als Ranviersche-Schnürringe. Aktionspotenziale werden daher nur mehr an diesen Ran-

viorsche-Schnürringen re-induziert, dazwischen wird das Signal durch das Cytoplasma des Neurons weitergeleitet (Campbell et al. 2003).

II.2.3.b. Gliazellen

Gliazellen sind die zweite Art von Zellen im Nervensystem. Ihre Aufgabe besteht darin, die Homeostase im Nervensystem zu erhalten, die Myelinhülle zu bilden und eine immunologische Verteidigung für das Nervensystem bereit zu stellen. Im ZNS gehören Oligodendrozyten, Astrozyten, und Mikroglia zu dieser Zellklasse. Während Oligodendrozyten für die Bildung der Myelinhülle verantwortlich sind (Jessen K.2004), findet man Astrozyten als Teil der Blut-Hirn-Schranke um Blutgefäße lokalisiert, aber auch um einzelne Synapsen oder Ranvierscher Schnürringen. In allen Fällen sind sie jeweils für die Homeostase zuständig in dem sie das extrazelluläre Milieu um Neuronen konstant halten, entfernen Neurotransmitter aus dem synaptischen Spalt, und versorgen Neuronen mit Nährstoffen. Oligodendrozyten und Astrozyten stellen den größten Anteil an Gliazellen im ZNS, während Mikroglia nur eine kleine aber wichtige Gruppe bilden. Diese Zellen sind makrophagen-ähnliche Zellen, die zur immunologischen Verteidigung des ZNS beitragen (Jessen K. 2004; Campbell et al. 2003).

Im PNS hingegen gibt es nur eine Art von Gliazellen, die Schwann-Zellen. Diese können in myelinisierende und nicht-myelinisierende Schwann-Zellen, unterteilt werden. Die myelinisierenden Schwann-Zellen bilden, wie die Oligodendrozyten im ZNS, die Myelinhüllen im PNS. Doch im Kontrast zu diesen, die 30 bis 40 Myelinscheiden um Axone bilden, können Schwann-Zellen nur ein Axon umhüllen. Die nicht-myelinisierenden Schwann-Zellen üben die Aufgabe der Astrozyten in Form von metabolischer und mechanischer Unterstützung der Neuronen aus. Mikroglia werden nicht benötigt, da das PNS immunologisch nicht abgeschottet ist und so das Immunsystem seiner Aufgabe nachkommen kann (Jessen K. 2004).

II.2.4. Der Ursprung der Zellen im Nervensystem

Während der embryonalen Entwicklung von Vertebraten bildet sich aus dem Ektoderm dorsal die Neuralplatte aus. Diese Zellschicht beginnt sich dann zu verdicken, einzufalten, und bildet schließlich das Neuralrohr. Der gesamte Prozess wird als Neurulation bezeichnet. Dabei wandern kurz vor dem Zusammentreffen der beiden Enden der Neuralplatte oligopotente Zellen aus und bilden die Neuralleiste (Campbell et al. 2003, Bronner-Fraser M. 1994).

Das Neuralrohr entwickelt sich weiter zum ZNS, dafür bilden sich im vorderen Teil des Neuralrohres vier Ventrikel, die sich dann zum Vorderhirn, Mittelhirn, Rautenhirn und Rückenmark weiter entwickeln. Vorderhirn, Mittelhirn und Rautenhirn durchlaufen einige weitere morphologische Veränderungen bis der adulte strukturelle Aufbau des Gehirns erreicht wird (Campbell et al. 2003, Bronner-Fraser M. 1994). Weiters entsteht im Gehirn eine subventriculäre Zone, die neuronale Stammzellen (neuronale Vorläuferzellen) liefert, aus denen sich Neuronen und Gliazellen entwickeln können (Jessen K. 2004).

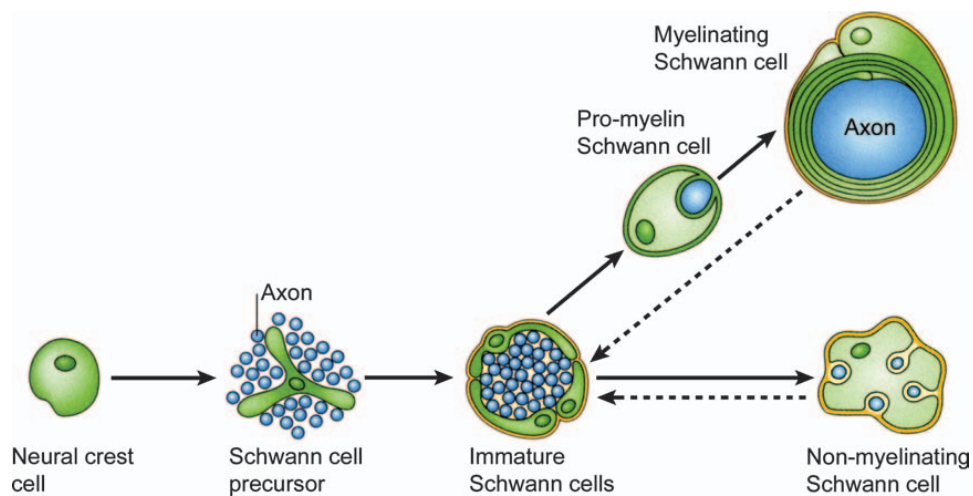
Schwann-Zellen und Neuronen des PNS stammen von Zellen der Neuralleiste ab. Es sind ebenfalls oligopotente Zellen. Sie sind nicht nur Ursprung für das PNS sondern liefern auch die Vorläuferzellen für Pigmentzellen in der Haut, für die glatte Muskulatur, und für das Bindegewebe (Jessen K. 2004). Das Auswandern der Neuralleisten Zellen in den Körper ist innerhalb von 24-36 Stunden abgeschlossen, dabei ist die Wanderrichtung Kopf-Schwanz (Bronner-Fraser M. 1994). Diese Richtung wird über einige Integrin-Rezeptoren, die eine Vielzahl von extrazellulären Matrixmolekülen erkennen, bestimmt (Bronner-Fraser M. 1994). Die wichtigsten dieser Matrixmoleküle sind Fibronectin, Laminin und Collagen, welche vermutlich das erste Anlagern der Neuralleisten Zellen an andere Strukturen vermitteln (Bronner-Fraser M. 1994).

II.2.4.1. Entwicklung von Zellen der Neuralleiste zu reifen Schwann-Zellen

Es dauert einige Zeit in der embryonalen Entwicklung bis sich aus den oligopotenten Zellen reife Schwann-Zellen gebildet haben. Diese Entwicklung geht über drei verschiedene Zellstadien. Zwischen Tag 12. und 13 bildet sich im Mausembryo aus Zellen der Neuralleiste die Schwann-Zellen Precursors (SCPs). Diese SCPs entwickeln sich weiter zu unreifen Schwann-Zellen (zwischen dem 13. und 14. Tag). Ob die daraus später entstehenden reifen Schwann-Zellen eine Myelinhülle bilden oder nicht ist schließlich abhängig von dem Axon in ihrer

Nachbarschaft (Jessen K. 2005). Die Myelinisierung selbst wird erst um dem Zeitpunkt der Geburt in den Schwann-Zellen induziert, aber nur wenn Schwann-Zellen mit einem Axon interagieren, welches einen Durchmesser von über 1µm aufweist (Garbay B. et al. 2000).

Die embryonale Schwann-Zellen Entwicklung und die Nerven Entwicklung sind in Nagetieren zeitlich mit einander gekoppelt. So durchwandern Neuralleisten Zellen am Tag 10. und 11. den Körper. Am 12. Tag haben Neuronen schon ein Axon entwickelt und sind umgeben von SCPs. Diese embryonalen Nerven sind nicht mit Blutgefäßen versorgt und noch nicht von dem umliegenden Gewebe abgegrenzt. Am 16. Tag der embryonalen Entwicklung bestehen die Nerven nun mehr aus unregelmässig verteilten Bündeln von Axonen, umgeben von unreifen Schwann-Zellen, sowie von Bindegewebe und Blutgefäßen. Mittlerweile wurde der Nerv auch vom umliegenden Gewebe abgegrenzt durch das Perineurium und erreicht so annähernd den adulten Nerven Aufbau. Die Myelinisierung des einzelnen Axons startet erst um den Zeitpunkt der Geburt, durch eine radikale Änderung im Expressionsmuster der Schwann-Zellen, nach dem eine radiale Sortierung statt gefunden hatte (Jessen K. 2005), (Fig. 2).



2. Figur: Schematische Darstellung der Schwann-Zellen Entwicklung (Mirsky R. et al. 2008)

Schwann-Zellen erfüllen in jedem Stadium ihrer Entwicklung eine unterschiedliche Funktion. Ihre Transformation von einem in das nächste Stadium wird stimuliert und reguliert durch verschiedene Faktoren, wovon viele vom Axon, mit dem die Schwann-Zellen zu erst nur locker und im späteren Entwicklungsverlauf fest assoziiert sind, stammen. Die Faktoren können Mitogene, Überlebenssignale oder Differenzierungssignalen darstellen (Jessen K. 2005).

SCPs sind völlig abhängig vom Kontakt zu einem Axon, da dieses Überlebenssignale ausschüttet, wovon der wichtigste dieser Faktoren, Neuregulin 1 (NRG1), ist. Eine parakrine Abhängigkeit der SCPs von Axonen ermöglicht eine Abstimmung der Zellzahl dieser beiden Zelltypen. So präsentieren zum Beispiel Neuronen Faktoren wie Neuregulin an ihrer Zelloberfläche, SCPs interagieren mit diesem und so wird ihr Überleben stimuliert. Andererseits wird die Interaktion über die intrazelluläre Domäne des Neuregulins im Neuron registriert, wodurch das Überleben des Neurons gewährleistet wird. Zusätzlich leisten SCPs noch Hilfe und versorgen das Neuron teilweise mit Nährstoffen und Energie (Jessen K. 2005).

Mit der Differenzierung zur unreifen Schwann-Zelle scheiden die Zellen Material aus, das zur Bildung einer basal Lamina führt. Weiters ist ihr Überleben nicht mehr von axonalen Faktoren abhängig, sondern wird durch autocrine Faktoren geregelt. Dieses ist wichtig, da die späteren reifen Schwann-Zellen bei einer Verletzung des Nervens wieder in unreife Schwann-Zellen dedifferenzieren können und so die Regeneration des Nervens ermöglichen, auch wenn das Axon selbst schon anfängt zu degenerieren (Jessen K. 2005).

Während reife Schwann-Zellen vor allem ihre Aufgaben in der Myelinisierung der Nerven und der Aufrechterhaltung der Funktion des Nervensystems haben, sind SCPs und unreife Schwann-Zellen für die Korrekte Positionierung der Neuronen und Verknüpfung der Nerven mit den Muskeln verantwortlich (Jessen K. 2005)

II.3. Myelinhülle

Die Myelinhülle oder Myelinscheide bildet sich aus der Cytoplasmamembran von Oligodendrozyten oder Schwann-Zellen. Diese Gliazellen wickeln sich dafür spiralförmig um ein Axon, mit einem Durchmesser über 1 µm (Arroyo E. et al. 2000).

Dafür wird die Cytoplasmamembran der Gliazelle so verändert, dass sie zu 70-80% aus Lipiden besteht und spezielle Proteinen integriert hat, die den mehrschichtigen Hüllenaufbau ermöglichen. Dies führt dazu, dass die Kapazität für den Ionenaustausch über die Membran des Axons herabgesetzt und so eine elektrische Isolierung erzeugt wird, wodurch die Erregungsleitung nur mehr an den Ranvierschen-Schnürringen möglich ist (Arroyo E. et al. 2000). Lipide wie Cholesterol und Mono-Galactosyl-Sphingolipide, modifiziert mit Cerebrosiden oder Sulfatiden, ermöglichen erst die elektrische Isolierung (Garbay B. et al. 2000).

II.3.1. Aufbau der Myelinhülle:

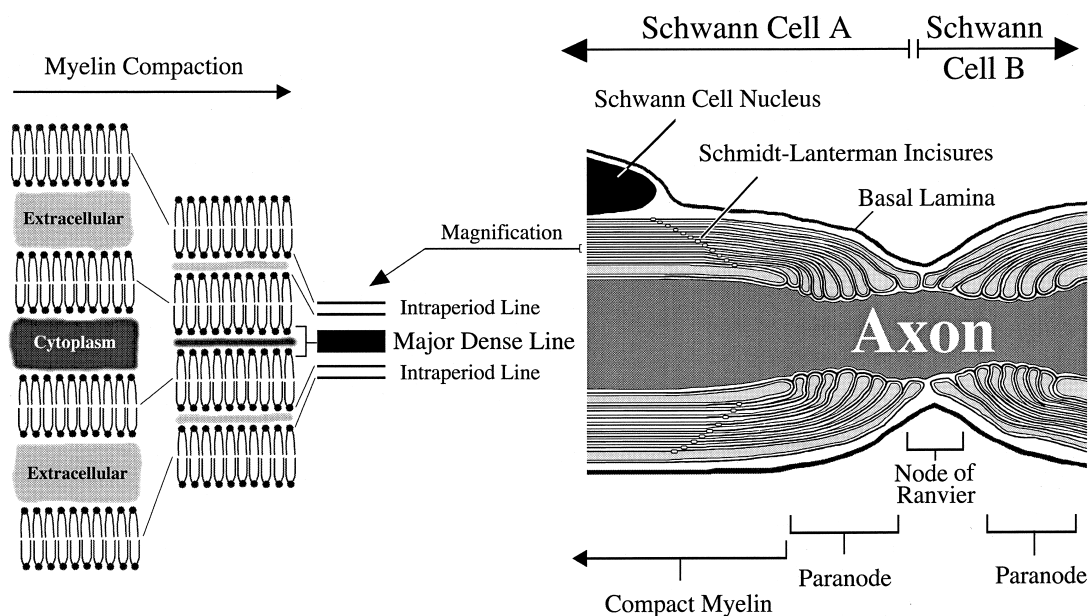
Die Myelinscheide kann in zwei Regionen gegliedert werden; der paranodalen Region (Paranod) und der internodalen Region (Internod). Die paranodale Region befindet sich an beiden Enden der Hülle. Hier ist jede Membranlage von der darüber befindlichen Lamelle so bedeckt, dass sie in Kontakt mit dem Axon treten kann, und damit den Abschluss für die elektrische Isolierung bildet. In der internodalen Region verlaufen die Membranschichten parallel zu einander. Histologisch können die „major dense line“, welche sich aus zwei Membranen und dem eingeschlossenen Cytoplasma bildet, und die „intraperiod line“, welche sich aus zwei Membranen und dem extrazellulären Raum zusammen setzt, unterschieden werden (Arroyo E. et al. 2000, Garbay B. et al. 2000).

Das Myelin muss in diesen verschiedenen Regionen unterschiedlich zusammengesetzt werden, für die variierende Kompaktierung der Membranen. Daher kann es in kompaktes und nicht-kompaktes Myelin gegliedert werden (Quarles R. 2002).

Kompaktes Myelin besitzt nur 2 nm große extra-zelluläre zwischen Räume. Die intrazellulären Zwischenräume sind arm an Cytoplasma, was praktisch zu einem verschmelzen der Zellmembran führt. Dadurch können sich in diesen Bereich der Zelle auch keine Organellen aufhalten. Kompaktes Myelin ist der Hauptanteil in Myelinscheiden und befindet sich vor allem in der internodalen Region.

Das nicht-kompakte Myelin ist hingegen diffuser über die Myelinhülle verteilt. Nicht-kompaktes Myelin weist einen extrazellulären Zwischenraum von 12-14 nm auf, und der intrazelluläre Zwischenraum ist ausreichend um Organellen Platz zu bieten. Zu finden ist dieses, vor allem in der paranodalen Region und bei der innersten und äußersten Windung der Myelinhülle, die auch als inneres Mesaxon oder äußeres Mesaxon bezeichnet wird (Kursula P. 2008).

Da die Zelle nur Mittels ihrer Organellen Energie und Nährstoffe aufbauen kann, muss das kompakte Myelin der Gliazellen über ein Kanalsystem, den Schmidt-Lanterman Inzisuren, mit den lebenswichtigen Dingen versorgt werden. Auch diese Strukturen werden aus nicht-kompaktem Myelin gebildet (Kursula P. 2008) (Fig. 3).

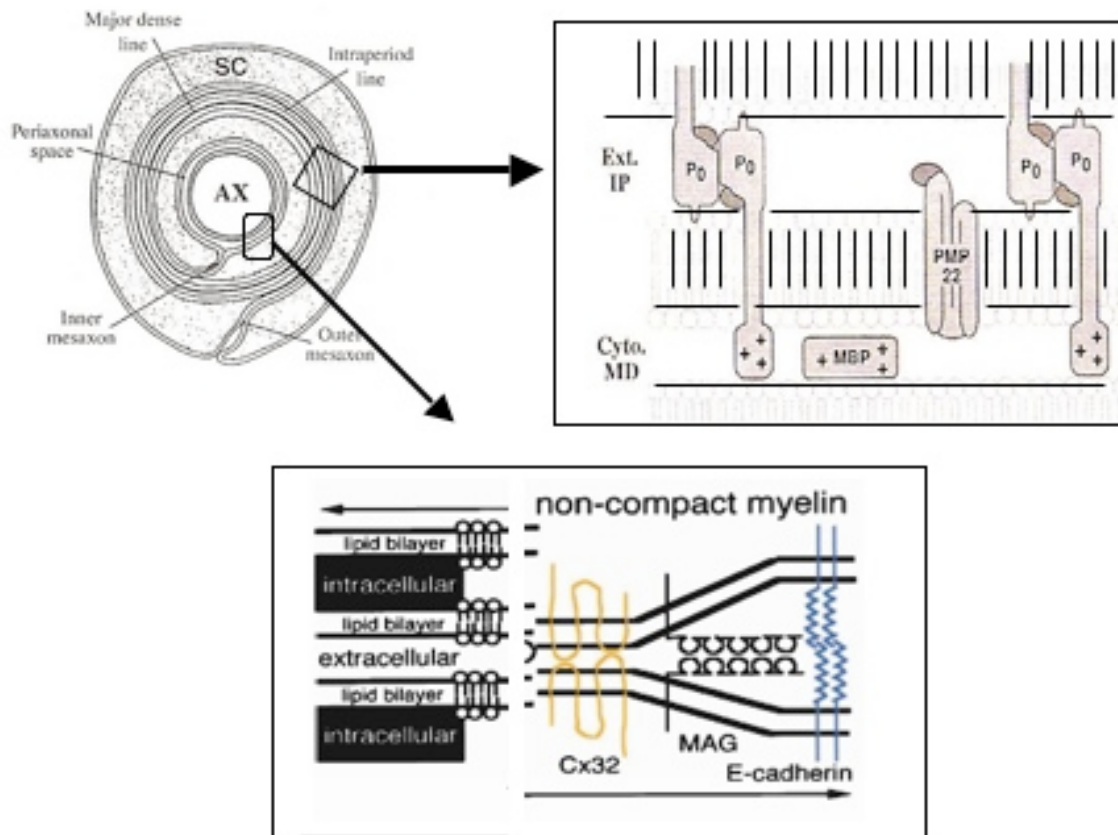


3. Figur: schematische Darstellung einer Myelinhülle um ein Axon (longitudinal Schnitt) (Garbay B. et al. 2000)

II.3.2. Myelinhüllen-spezifische Proteine im PNS

Spezielle Proteine sorgen im PNS für die ordnungsgemäße Funktion der Myelinhülle. So befinden sich im kompakten Myelin, die Proteine „myelin protein zero“ (P0), „peripheral myelin protein“ (PMP 22) und „myelin basic protein“ (MBP), währenden im nicht-kompakten Myelin die Proteine E-cadherin, „myelin associated glycoprotein“ (MAG) und Connexin 32

(Cx32) in die Membran integriert sind (Arroyo E. et al. 2000) (Fig. 4). Bis auf MBP sind alle Myelinhüllen-spezifischen Proteine transmembran Proteine.



4. Figur: Schematische Darstellung der spezifischen Myelinproteine so wie ihrer Verteilung in der Myelinhülle (Quarles R. 2002 und E. Arroyo et al. 2000).

Viele der neurologischen Krankheiten im Menschen entstehen im Zusammenhang mit einer Veränderung bei der Protein-Zusammensetzung in der Myelinhülle. So wurde bei der Charcot-Marie-Tooth Krankheit festgestellt, dass PLP beeinflusst ist, während bei Multiple Sklerose gezeigt werden konnte, dass MAG verloren geht (Quarles R. 2005). Studien an Tieren mit veränderter Gendosis oder Protein-Level eines der Myelinproteine, zeigten meist schwere Defekte in der Myelinisierung. Es kam zur Hyper- oder Hypomyelinisierung, oder zum Abbau der gebildeten Myelinhülle. Einige der neurologischen Phänotypen korrelierten mit menschlichen Krankheitsbildern und lieferten wertvolle Informationen über die Funktion des Proteins in der Myelinhülle und über die Folgen einer Fehlfunktion (Arroyo E. et al. 2000, Quarles R. 2002, Kursula P. 2008).

II.3.2.a. Protein Zero (P0)

Protein Zero, auch „Myelin Protein Zero“ genannt, ist ein 30 kDa großes Protein. Es besitzt eine glykosilierte extrazelluläre Ig-Domäne und eine transmembrane Helix Region sowie eine kleine cytoplasmatische Domäne. Das Protein ist spezifisch für das Myelin des PNS und macht 50% der Proteine in der Myelinhülle aus (Kursula P. 2008). P0 ist als Tetramer in die Membran eingebettet und kann über seine extrazelluläre Ig-Domäne mit einem P0-Tetramer der gegenüberliegenden Membran interagieren, wodurch das Membransystem im Myelin kompakter wird. Zusätzlich stabilisiert P0 durch seine cytoplasmatische Domäne, die als Interaktionsstelle für die innen liegende Lipidschicht der Membran fungiert, die interperidonale Linie (Quarles R. 2002). Weiters spielt P0 bei der normalen Spiralisierung der Schwann-Zellen, sowie bei der Komprimierung und Aufrechterhaltung der Myelinhülle eine Rolle (Garbay B. et al. 2000).

II.3.2.b. Peripheral myelin protein 22 (PMP22)

PMP 22 ist 22 kDa groß, und macht 5% der Proteine im Myelin des PNS aus, was darauf hin deutet, dass das Protein keine strukturelle sondern eher eine dynamische Funktion hat (Quarles R. 2002), und spielt bei der Induktion der Myelinisierung, sowie bei der Festlegung der Myelinstärke und bei der Stabilität der Myelinhülle eine Rolle (Garbay B. et al. 2000).

II.3.2.c. Myelin basic protein (MBP)

MBP ist ein cytosolisches Protein mit einem ausgeprägten basischen Charakter und kann so durch elektrostatische Interaktionen Adhäsion zwischen den Membranen bewirken. Es werden durch alternatives Splicing verschiedene Isoformen dieses Proteins erzeugt, die zudem noch eine Vielzahl von post-translationalen Modifikationen aufweisen (Kursula P. 2008). MBP macht 30% des Myelins im ZNS aus, wogegen sein Anteil im PNS nur bei 5-15% liegt (Quarles R. 2005). Knockout Studien zeigten, dass MBP im ZNS zur Bildung der „major dense line“ beiträgt, während der Verlust von MBP im PNS durch erhöhten P0 Gehalt und negativ geladenen Lipiden in der Myelinhülle ausgeglichen werden kann (Garbay B. et al. 2000).

II.3.2.d. Myelin associated glycoprotein (MAG)

MAG ist wie P0 und PMP22 ein transmembranes Protein, kommt aber nur im nicht-kompak-

ten Myelin vor. Zwei verschiedene Formen, S-MAG und L-MAG existieren, und unterscheiden sich lediglich in ihrer cytoplasmatischen Domäne. Die extrazelluläre Domäne weist acht Möglichkeiten für Glykosylierungen auf, und diese Glykoside stellen zu 30% das gesamte Molekulargewicht. Generell ist der MAG-Anteil in der Myelinscheide nur 0,1-1%. L-MAG ist im inneren Mesaxon zu finden, dort dient es als Interaktionsschnittstelle zwischen Axon und Schwann-Zelle (Quarles R. 2002). S-MAG dagegen ist im ganzen nicht-kompakten Myelin verteilt, und übernimmt dort eine strukturelle Aufgabe (Kursula P. 2008).

II.3.2.e. Connexin 32 (Cx32):

Connexin 32 ist ein transmembranes Protein, das so genannte „Gap-Junctions“ in der Membran bildet, wodurch Moleküle über 1 kDa von einer Zelle in die andere strömen können (Garbay B. et al. 2000). In Schwann-Zellen findet man sie vor allem in den Schmidt-Lanterman-Inzisuren und in der paranodalen Region (Arroyo E. et al. 2000). Dadurch wird eine direkte intrazelluläre und interzelluläre Kommunikation über kürzeste Distanzen möglich, sowohl innerhalb der Gliazelle als auch zwischen Neuron und Gliazelle. Durch seine Funktion in der Bildung von „Gap-Junctions“ spielt Connexin 32 eine wichtige Rolle in Transportprozessen und in der Homeostase von der Ionenverteilung in der Myelinhülle (Garbay B. et al. 2000).

II.3.2.f. E-Cadherin (E-cad):

Dieses Protein ist ein Ca^{2+} -abhängiges Adhäsionsmolekül. Es bildet Dimere, wodurch andere E-Cadherin-Dimere in der gegenüberliegenden Membran homophil binden (Adhäsions-Junctions). Die cytosolische Region von E-Cadherin kann mit α -Catenin oder β -Catenin interagieren, die wiederum mit dem Actin-Cytoskelett verbunden sind. Diese Adhäsions-Junctions befinden sich im inneren und äußeren Mesaxon, wie auch in der paranodalen Region und den Inzisuren (Arroyo E. et al. 2000).

II.3.3. Entwicklung der Myelinhülle im PNS:

Während der Entwicklung des Nervensystems im Embryo liegen Neurone mit ihren Axonen zu erst in Faserbündeln vor, die noch keine Myelinhüllen haben. Diese Faserbündel sind von einer Lage von Schwann-Zellen umfasst. Diese Schwann-Zellen bilden Fortsätze, welche zwischen die Fasern einwachsen und so kleinere Nervenstrangbündeln bilden, auch als fetale Nervenstäbe bezeichnet. In der weiteren Entwicklung der Nerven, durchlaufen die Schwann-Zellen eine laterale Elongation entlang des Axons, sowie eine massive Proliferation. Sie starten mit dem Ausscheiden von Molekülen für die Basal Lamina, die die Myelinscheiden der Axone in adulten Nervenstäben umgibt (Garbay B. et al. 2000).

Zu diesem Zeitpunkt sind Neuronen zwar mit Schwann-Zellen umgeben, diese sind aber noch sehr unregelmäßig verteilt. In diesem als Pro-myelin Phase bezeichneten Entwicklungsstadium beginnt die radiale Sortierung. Während dieses Prozesses wird ein Verhältnis von eins-zu-eins zwischen Schwann-Zellen und Axon hergestellt, und so eine gleichmäßige Verteilung der Schwann-Zellen über die Axone erreicht (Garbay B. et al. 2000). Faktoren wie NRG1, IGFs, NT3 oder p38 Aktivität in der Zelle spielen dabei eine wichtige Rolle (Jessen K. 2005). PI3-Kinase wird ebenfalls hoch reguliert und spielt eine für die Elongation und schließlich für die Myelinisierung wichtige Rolle. Zwar trägt PI3 nicht zur Bildung der Myelinhülle bei, wird aber um die korrekte Länge der Myelinhülle und das richtige Proteinverhältnis im Myelin zu erlangen benötigt. Die Erhöhte PI3-Kinase Aktivität wird durch Neuregulin und axonalen Kontakt stimuliert (Maurel et al. 2000).

Zum Zeitpunkt der Geburt beginnen sich die Schwann-Zellen morphologisch tiefgreifend zu verändern. Die Zellen flachen ab und ihre Cytoplasmamembran beginnt sich auszubreiten, dadurch können sie mit der spiralförmigen Umwicklung des Axons anfangen (Quarles R. 2002). Für das Wachstum der Myelinscheide schiebt sich die innerste Membranlippe um das Axon, und die darüber liegenden Membranlagen werden dadurch immer dichter zusammen geschoben und kompakter. Dadurch werden die interperiodal Linie und „major dense line“ ausgeprägt. Diese massive Spiralisierung dauert bis zirka drei Wochen nach der Geburt an (Garbay B. et al. 2000). Ab diesem Zeitpunkt ist das endgültige Verhältnis zwischen Axondurchmesser und Myelinhüllendicke, auch bekannt als g-Ratio, eingestellt. Dieses liegt meist zwischen 0,6 und 0,7 im adulten Organismus und wird auch als Indikator für den Verlauf der Myelinisierung verwendet (Sherman D. et al. 2005).

Die Schwann-Zelle ändert nicht nur ihre Form, sondern auch die Zusammensetzung von Proteinen und Lipiden ihrer cytoplasmatischen Membran. So beginnt schon vor der Spiralisierung die Synthese der spezifischen Myelin-Proteine, sowie ein vermehrter Einbau von Glycerophospholipiden. Beides wird durch einen Regulationsmechanismus in der Expression ermöglicht (Garbay B. et al. 2000).

II.3.3.a. Transkriptionsfaktoren und Signale für die Etablierung der Myelinhülle:

Krox20 und cAMP sind pro-myelin Signale. Krox 20 als Transkriptionsfaktor ermöglicht die Transkription von P0, MBP, PMP22 und Con32 (Jessen K. 2005; Nagarajan et al. 2001). Das zeitliche Expressionsmuster von P0 und PMP22 ist gleich während für MBP dasselbe Expressionsmuster zeitversetzt startet (Garbay B. et al. 2000).

Der Einbau der Proteine in die entstehende Myelinhülle wird durch eine Kombination von Faktoren ermöglicht. So wird die mRNA zusammen mit Ribosomen in Vesikeln über die Mikrotubuli zu distalen Region der Zelle gebracht, wo das Protein synthetisiert, modifiziert und so direkt in die Membran eingebaut wird (Sherman D. et al. 2005).

Damit die zuständigen Signalwege aktiviert werden können, müssen andere Signalwege erst inaktiviert werden. Der Notch- Signalweg ist für die Differenzierung der Zellen aus der Neuralleiste in Gliazellen notwendig. Aber würde in den Schwann-Zellen weiterhin eine erhöhte Aktivität des Notch-Signalweges gehalten werden, so würden die Schwann-Zellen in einem unreifen Stadium verbleiben. Daher wird dieser Signalweg durch die Induktion der Myelinisierung herunter reguliert (Taylor N. et al. 2007). Andere Faktoren wie die Transkriptionsfaktoren PAX3 und Sox 2, welche ebenfalls für die Proliferation zuständig sind, werden in den myelinisierenden Schwann-Zellen inaktiviert (Jessen K. 2005).

II.4. Ziele dieser Diplomarbeit

Galabova-Kovacs et al. (2008) fand in ihrer Studie mit Mäusen, denen B-Raf in neuronalen Vorläuferzellen ($\text{NestinCre}^+; \text{b-raf}^{\text{f/f}}(\text{b-raf}^{\Delta/\Delta\text{N}})$) entfernt wurde, heraus, dass die Oligodendrozyten nicht ausreichend differenzieren. Daraus resultierte eine starke Verminderung in der Myelinhüllenbildung, welche sich mit zunehmender Entwicklung verstärkte. Dabei fand sie auch im PNS eine veränderte Myelinhülle am 18. und 15. Tag nach der Geburt. (unveröffentlichte Beobachtungen).

Diese Arbeit beschäftigte sich nun mit verschiedenen Fragen zu diesen Phänotyp.

Die Charakterisierung dieses Defektes im PNS mittels elektronenmikroskopischer Analyse über den Zeitraum der ersten drei postnatalen Wochen. Ziel war es festzustellen:

- 1.) Ob im PNS ebenso wie im ZNS eine Hypomyelinisierung vor liegt oder eher eine Demyelinisierung.
- 2.) Ob dieser Phänotyp im PNS ebenso von einer Entwicklungsstörung der myelinisierenden Zellen herrührt, wie es der Fall war für den Phänotyp im ZNS.

Diesen Fragen wurden mit Hilfe von *in vitro* Studien mit Schwann-Zellen/Neuronen Co-Kultur untersucht. Diese Kulturen ermöglichen die Induktion von der Myelinisierung und dadurch die Beobachtung und Untersuchung der ersten Phasen der Entstehung einer Myelinhülle.

Falls nun dieser Phänotyp in den $\text{NestinCre}^+; \text{b-raf}^{\text{f/f}}(\text{b-raf}^{\Delta/\Delta\text{N}})$ Mäusen tatsächlich durch eine Entwicklungsstörung der Schwann-Zellen entsteht, müsste dieser Phänotyp durch eine Mauslinie ($\text{P0Cre}^+; \text{b-raf}^{\text{f/f}}(\text{b-raf}^{\Delta/\Delta\text{SC}})$), in der lediglich die Schwann-Zellen B-Raf defizient sind, reproduziert werden können.

III. Ergebnisse

Um auf diese Fragen eine Antwort zu erhalten, wurden sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Experimente vorgenommen mit zwei Mauslinien, denen B-Raf spezifisch in einer Zelllinie fehlt. Dieses wurde ermöglicht durch die Verwendung des Cre-LoxP- Systems. In unserem Fall wurde in die DNA-Sequenz des b-raf Allels eine loxP- Sequenz am 5' und 3' Ende des Exon 11 über homologe Rekombination eingebracht (Chen et al. 2006). Die resultierenden Mäuse wurden mit Tieren, denen ein Gen für die Cre Rekombinase integriert wurde, gekreuzt, wobei die Rekombinase jeweils unter der Kontrolle eines zelllinienspezifischen Promotors steht.

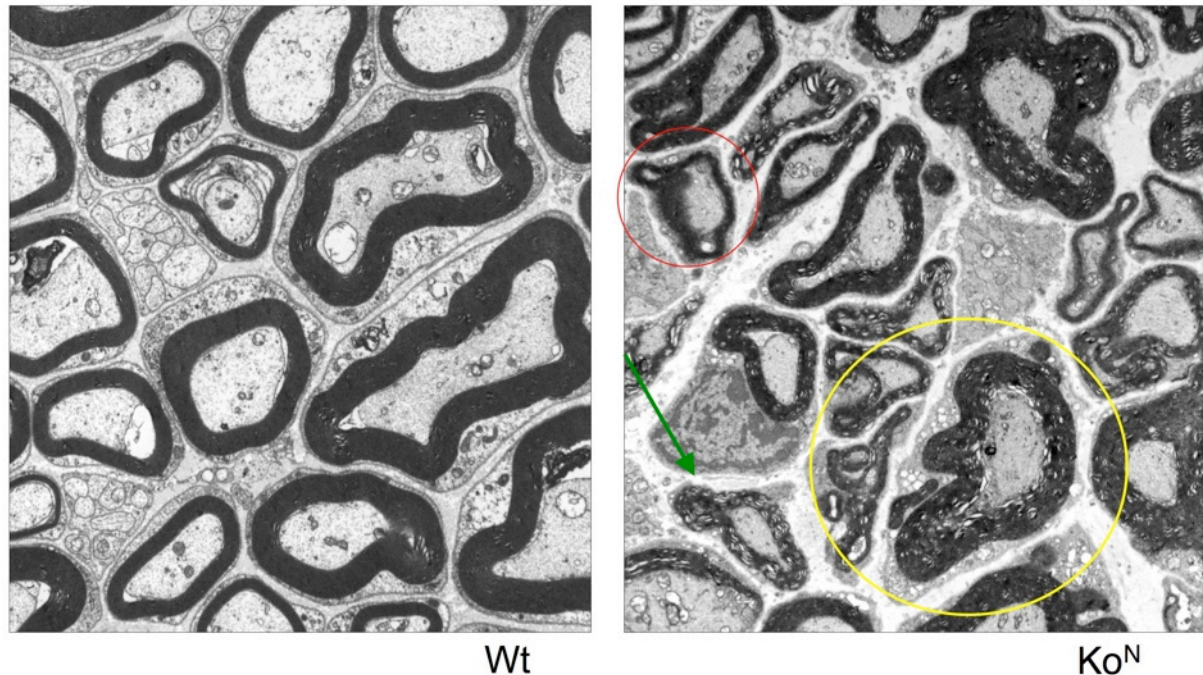
III.1. B-Raf Deletion in Neuronalen Vorläuferzellen führt zu einem Phänotyp im PNS

Nestin ist ein Intermediärfilament Protein und wird als Marker für neurale Vorläuferzellen in der Literatur aufgeführt (Wiese C et al. 2004). Durch die Expression der Cre-Rekombinase unter dem Promotor von Nestin kommt es zu einer B-Raf Deletion in neuronalen Vorläuferzellen, aus welchen sich sowohl Neuronen als auch Gliazellen entwickeln (Tronche et al. 1999). Die Mäuse mit dem Genotyp NestinCre⁺;b-raf^{f/f}(b-raf^{Δ/ΔN}) zeigten eine effektive Rekombination im Gehirn und Rückenmark ab dem embryonalen Tag 11,5 (E11.5). Sie waren zum Zeitpunkt der Geburt nicht von ihren Wildtyp Kontrollen unterscheidbar, zeigten jedoch ab dem postnatalen Tag 10 (P10) eine Verlangsamung des Wachstums. Im weiteren postnatalen Verlauf ihrer Entwicklung kamen noch Tremore, Ataxia, Muskelschwächen und Koordinationsprobleme dazu. Dieses führte schließlich zu einem frühzeitigen Tod am 21.Tag (P21) (Galabova-Kovacs G. et al. 2008).

Die Entwicklungsstörung in den Oligodendrozyten führte zu einer geringeren Myelinisierung der Axone sowie zu der Entstehung von Myelinhüllen geringen Durchmessers (Hypomyelinisierung) Die g-Ratio erhöhte sich in NestinCre⁺;b-raf^{f/f}(b-raf^{Δ/ΔN}) Tieren im Vergleich zu den Wildtypen Kontrollen (Galabova-Kovacs G. et al. 2008).

Im PNS hingegen war weder eine dünnere Myelinhülle zu beobachten an P18 und P15 noch eine geringere Anzahl von myelinisierten Axonen, sondern eine Veränderung in der Struktur der Myelinhülle, die fast jede einzelne Myelinscheide betraf. NestinCre⁺;b-raf^{f/f}(b-raf^{Δ/ΔN}) Tiere wiesen nicht mehr die typische regelmäßige Struktur in der Myelinhülle auf, die durch die Abwechslung von der „major dense line“ und der interperiodal Linie herrührt, sondern

zeigten Strukturen wie einzelne Lamellen, Spots und Myelinstrukturen im Axon und nicht wie normalerweise nur um das Axon (Fig. 5).



5. Figur: ELMI Bilder vom Querschnitten des Ischiasnerv (3000x) von NestinCre⁺; b-raf^{f/f} (b-raf^{Δ/ΔN}) (Ko^N) und NestinCre⁺; b-raf^{f/f} (Wt) Mäusen am Tag 18. Der WT zeigt klar das abwechselnde Linienmuster der „major dense line“ und der interperiodalen Linie. Hingegen sind beim KO einzelne Lamellen der Myelinscheide (gelber Kreis) zu erkennen, statt der zwei Linien Struktur. Ebenso können Spots (roter Kreis) oder Myelin im Axon (grüner Pfeil) beobachtet werden

Um diesen Phänotypen besser zu verstehen, und um eine Entwicklungsstörung in den Gliazellen, wie im ZNS vorliegt, aus zu schliessen wurde eine elektronenmikroskopische Analyse vom Tag der Geburt bis zum Tag 18. durchgeführt. Hierfür wurden beide Ischiasnerven der Mäuse isoliert, fixiert und untersucht. Dieser Nerv ist einer der größten Nervenstränge im Körper. Der Ursprung befindet sich in der lumbalen Region des Rückenmarks, dann verläuft der Nerv über den Beckenknochen entlang der Rückseite der hinteren Extremität bis zum Knie, wo es kurz oberhalb des Kniegelenkes zur Aufspaltung in zwei Nervenstränge kommt. Für unsere Untersuchungen wurde der Nerv vom Austrittspunkt aus der Wirbelsäule bis kurz oberhalb der Verzweigung beim Kniegelenk isoliert. Als Zeitpunkt in der Entwicklung wurden die postnatalen Tage 0, 3, 11, 14 und 18 gewählt.

Am Tag 0 und 3 zeigten sich in NestinCre⁺; b-raf^{f/f} (b-raf^{Δ/ΔN}) (Ko^N) und Wildtype (WT) Kontrollen die gleichen Myelinstrukturen. Dennoch wiesen Ko^N Mäuse am Tag 0 weniger

Myelinhüllen auf als der WT, wobei die Ursache hierfür wohl in der geringen Axongröße lag.

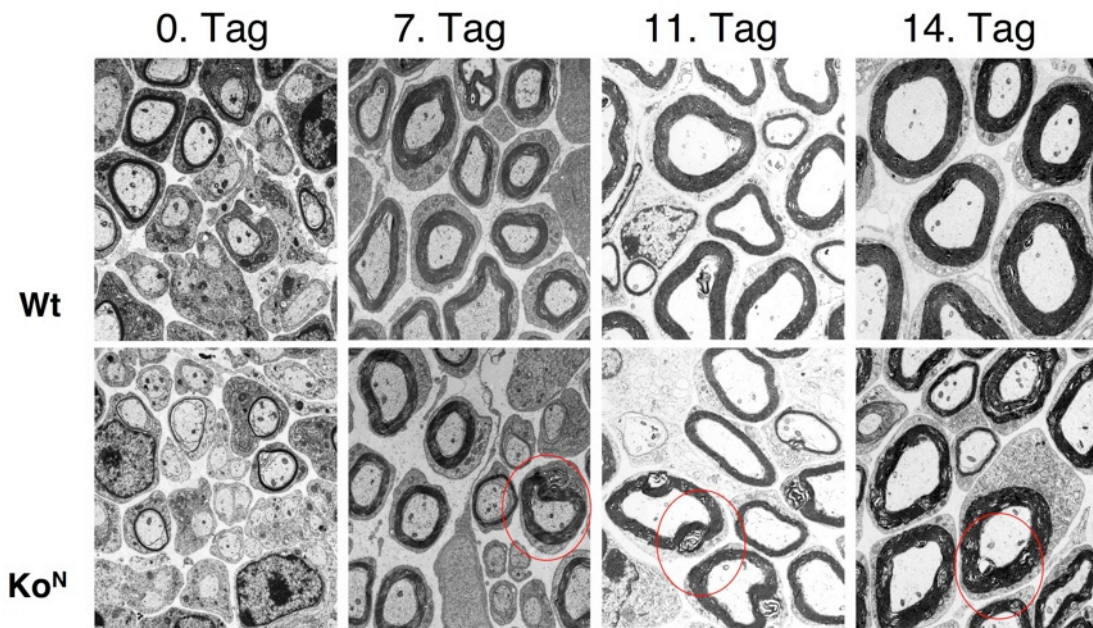
Während des Verlaufs der Entwicklung zeigten die B-Raf defizienten Mäuse nicht nur die normale Dickenzunahme sondern auch andere strukturelle Veränderungen. Am Tag 7 (P7) konnten schon die ersten Anzeichen von Dekompaktierung beobachtet werden, da einzelne Löcher in der kompakten Myelinstruktur zu sehen waren. Diese breiteten sich aus, bis einzelne Lamellen sichtbar wurden und am Tag 11 schließlich Ähnlichkeit mit einer Zwiebelschale die zerfällt bekamen, was auch als „onion bulb“ bezeichnet wird.

Diese ersten Veränderungen der Myelinstruktur traten nahe dem äußeren Mesaxon auf und breiteten sich bis P18 über die gesamte Myelinhülle aus, bis das innere Mesaxon erreicht wurde.

Ab Tag 14 vergrößerten sich diese „onion bulb“ während weitere Strukturänderungen wie Spots, degradierende Strukturen und in einigen Fällen auch Myelinstrukturen im Axon sich zeigten, (Fig. 6). Am Tag 18. waren schon alle Myelinhüllen im Querschnitt der Ischiasnerven in den NestinCre⁺; b-raf^{f/f} (b-raf^{ΔN/ΔN}) (KO^N) Tieren betroffen und wiesen alle drei strukturellen Änderung in einer noch stärkeren Ausprägung auf.

Der Wildtyp, (NestinCre⁻; b-raf^{f/f}) (Wt) hingegen zeigte nur die übliche Zunahme von Ringstrukturen in der Myelinhülle und die damit verbundene Zunahme der Dicke der Myelinscheide (Fig. 6).

Diese rapide Entwicklung des PNS-Phänotyps deutet darauf hin, dass das Problem in der Kommunikation zwischen den Neuronen und Schwann-Zellen eher als in der Entwicklung von Schwann-Zellen liegen müsste, da die Myelinisierung normal induziert wurde und sich auch normal weiter entwickelte, aber während dessen sich die Struktur der Myelinhülle dramatisch veränderte.



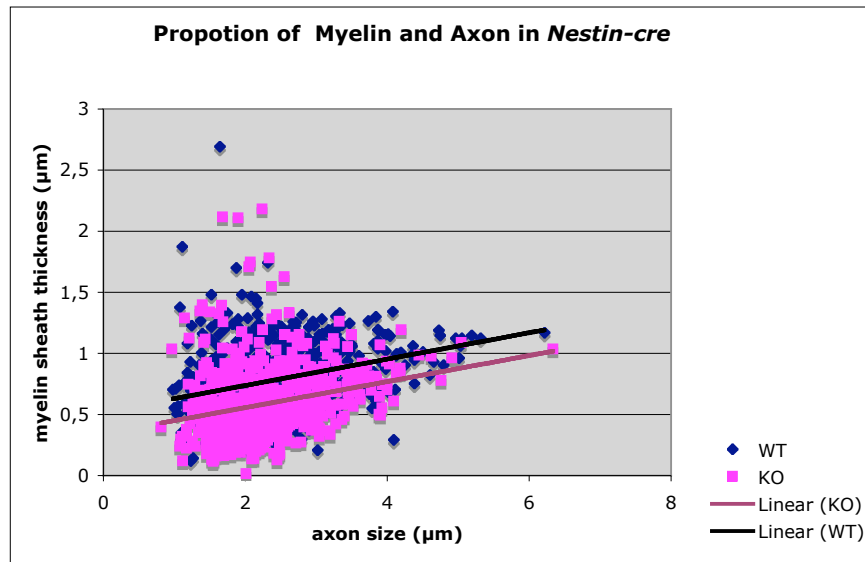
6. Figur: Entwicklung der Myelinhülle im Ischiasnerv von *NestinCre⁺; b-raf^{f/f} (b-raf^{Δ/ΔN}) (Ko^N)* und *NestinCre⁺; b-raf^{f/f} (Wt)* Mäusen von Tag 0 bis 14 (Querschnitt, 3000x). Ko Mäuse zeigen am Tag 7 die ersten Lücken in der Myelinscheide, Tag 11 sind schon kleine „onion bulb“ zu beobachten beides ist noch stärker ausgeprägt am Tag 14. (Abnormale Strukturen mit roten Kreis gekennzeichnet).

Da der neurologische Phänotyp im ZNS der *NestinCre⁺; b-raf^{f/f} (b-raf^{Δ/ΔN}) (Ko^N)* nicht nur histologisch, sondern auch statistisch aufzeigbar war, wurden die gleichen statistischen Analysen auch für den PNS Phänotypen durchgeführt. Hierfür wurden die trans-elektronenmikroskopischen Bilder von P0, P3, P7, P11 und P14 vermessen, in Bezug auf Axondurchmesser und Myelinhüllendicke. Beide Parameter werden für die Berechnung der g-Ratio benötigt, da diese sich aus dem Quotienten von Axondurchmesser zu Faserdurchmesser ergibt. Die g-Ratio an sich liefert einen mathematischen Beweis für ein zu viel oder zu wenig an Myelin. Im Falle des ZNS war sie erhöht in Ko^N Tieren im Vergleich zum Wildtypen - ein Anzeichen für zu wenig Myelin.

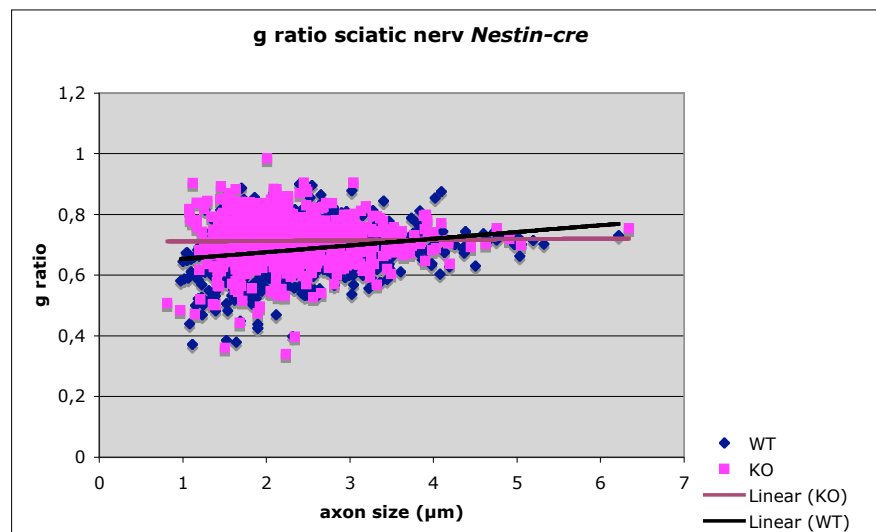
Diese quantitative Analyse zeigte, dass in B-Raf defizienten Mäusen die durchschnittliche Axongröße bei $1,69\mu\text{m} \pm 0,42$ im Vergleich zu $1,88\mu\text{m} \pm 0,44$ des WT am Tag 0 lag. Diese nahmen im gleichen Maße zu und erreichten beim Ko^N $2,79\mu\text{m} \pm 0,71$ und beim WT $2,90\mu\text{m} \pm 0,80$.

Die Myelindicke war auf Grund dieser verschiedenen Startpunkte im Axondurchmesser ebenfalls verändert. So betrug sie am Tag 0 in Ko^N Tieren $0,56\mu\text{m} \pm 0,25$ und erreichte am Tag 14 einen Durchschnittswert von $0,59\mu\text{m} \pm 0,22$. Hingegen hatte der WT am Tag 0 schon ei-

nen Durchschnittswert von $0,60\mu\text{m} \pm 0,2$ und stieg an auf $1,1\mu\text{m} \pm 0,1$ am Tag 14. (Fig. 7)
Die parallele Entwicklung geht deutlich aus der Abbildung 7 hervor.
Dadurch zeigte sich auch nicht eine Erhöhung in der g-Ratio, da sie sowohl bei B-Raf defizienten Mäusen als auch beim Wildtypen um den Wert von 0,7 lag, dieser Wert gilt als normaler Bereich für die Myelinisierung (Fig. 8).



7. Figur: Quantitative Analyse des Ischiasnerves von NestinCre⁺; b-raf^{ff} (b-raf^{ΔΔN}) (KO) und NestinCre⁻; b-raf^{ff} (WT) Tieren. Die Trendlinien zeigen deutlich, dass die KO Tiere im Durchschnitt kleinere Axons aufweisen als der WT und damit auch eine dünnere Myelinhülle haben.



8. Figur: g-Ratio vom Ischiasnerv der NestinCre⁺; b-raf^{ff} (b-raf^{ΔΔN}) (KO) und NestinCre⁻; b-raf^{ff} (WT) Tieren. In beiden Fällen liegt diese um den Wert 0,7.

Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich die Entwicklung in NestinCre⁺; b-raf^{f/f} (b-raf^{Δ/ΔN}) (Ko^N) verlangsamt. Der wirklich ausgeprägte PNS Phänotyp entwickelt sich in einem sehr kurzen Zeitfenster von 4 Tagen. Tag 18 konnte für die quantitative Analyse aber nicht mehr herangezogen werden, da zu diesem Zeitpunkt die strukturellen Veränderungen in der Myelinhülle so weitgreifend waren, dass keine korrekte Messung von der Myelinhüllendicke möglich war. Bis zum Tag 14 kann aber eine Hypomyelinisierung ausgeschlossen werden, welches ein weiterer Hinweis dafür ist, dass es sich im PNS um eine andere Störung handelt als es der Fall war für das ZNS.

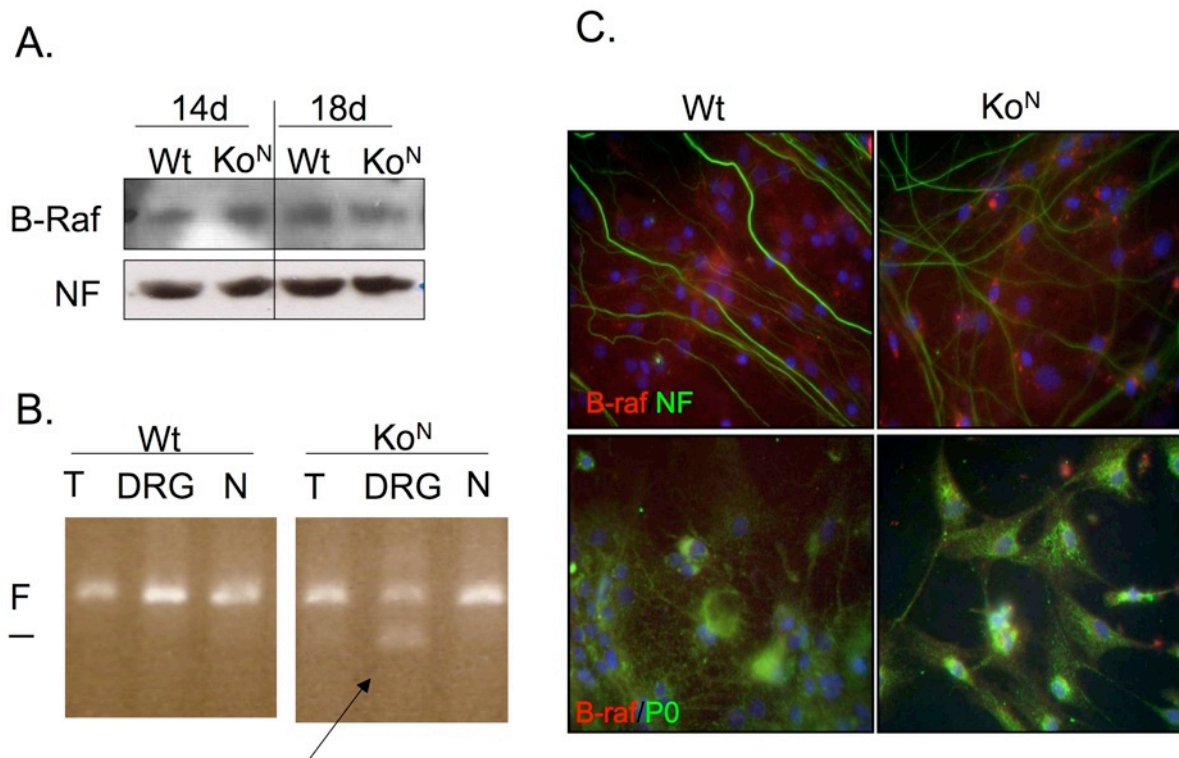
III.1.1. Kontrolle der b-raf Deletion in NestinCre;b-raf^{f/f}(b-raf^{Δ/ΔN}) Tieren

Wie bereits erwähnt ist B-Raf in diesen Mäusen in neuronalen Vorläuferzellen ablatiert. Aus diesen neuronalen Vorläuferzellen bilden sich Zellen der Neuralleiste, die den Ursprung für Nervenzellen und Schwann-Zellen im PNS liefern (Wiese C et al. 2004). Um fest zu stellen welche Zellen nun von der b-raf Deletion wirklich betroffen sind, wurden verschiedene Techniken angewandt. Durch Western-Blot Analyse von Lysaten des Ischiasnerves konnte B-Raf in vivo untersucht werden. Hingegen lieferten immunohistochemische Färbungen von Schwann-Zellen/Neuronen Co-Kulturen Aufschluss über die Deletion von b-raf in diesen Zelltypen.

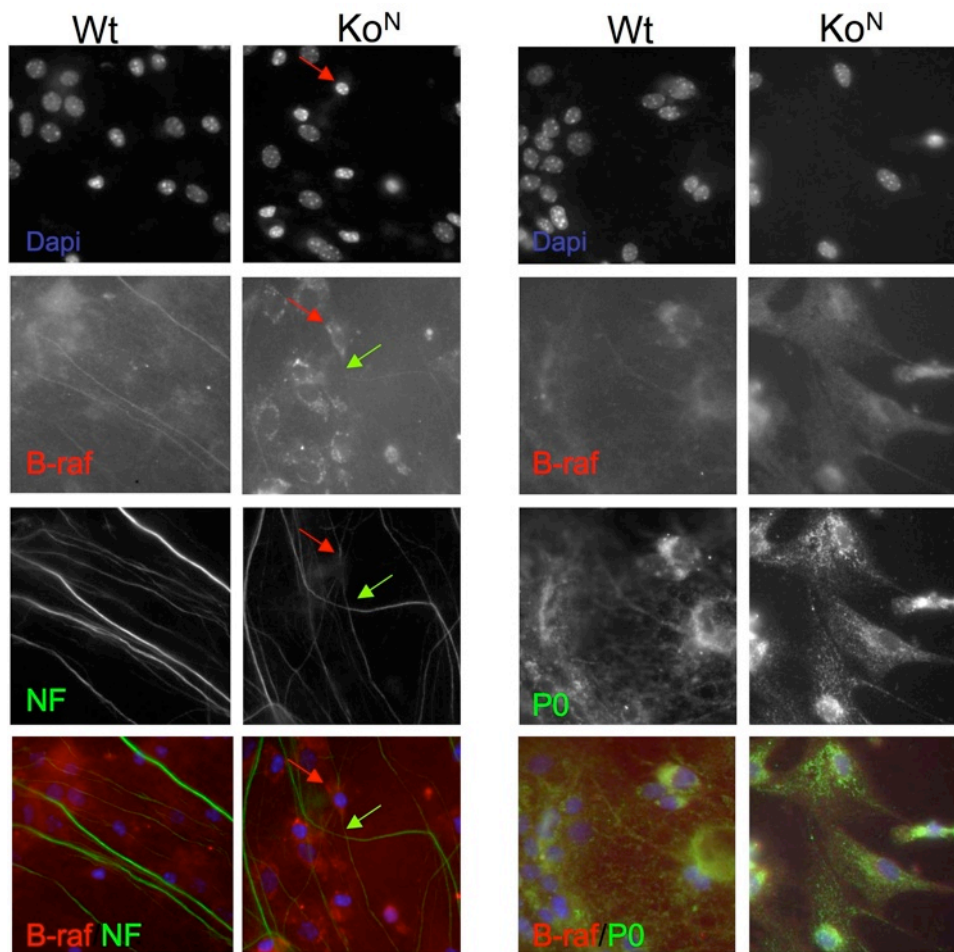
Die Western-Blot Analyse zeigte, dass der Protein Level von B-Raf in KO^N und WT gleich war. Dieses war ein Indiz dafür, dass Schwann-Zellen keine Deletion des b-raf Alleles tragen. Eine genomische PCR Analyse wurde durchgeführt, da die Deletion vom b-raf Allel und die damit verbundene Transformation von b-raf^{f/f} zu b-raf^{Δ/ΔN} zu einem PCR Produkten von 298bp führt. Für die PCR wurde DNA isoliert aus dem Ischiasnerv, den DRG und der Schwanzspitze des Tieres. Es zeigte sich das DNA aus den DRG kommend, jenes Fragment von 298bp enthielt; hingegen fehlte dieses bei DNA die aus dem Ischiasnerv stammte. In DRG sitzen die Zellkörper der Neuronen sowie von einigen Schwann-Zellen, die DNA im Ischiasnerv stammte fast ausschließlich von Schwann-Zellen (Fig. 9).

Die Schwann-Zellen/Neuronen Co-Kultur, welche von Spinal Ganglien (DRG) aus E13,5 alten Embryonen etabliert wurde, lieferte weitere Informationen über die B-Raf Protein Vertei-

lung. Um deutlich unterscheiden zu können, zu welcher Zelllinie die B-Raf positive Zellen gehörten, wurde eine Doppelfärbung mit zellspezifischen Markern vorgenommen. Als neuronalen Marker verwendeten wir Neurofilament (NF) und als Schwann-Zellen Marker Protein Zero (P0). P0 wird in einem basalen Level bereits in SCPs exprimiert und ist daher ideal zur Identifizierung von allen drei Schwann-Zell Stadien, wobei es in myelinisierenden, reifen Schwann-Zellen am stärksten exprimiert ist (Jessen K. et al. 2005). Es zeigte sich, dass B-Raf positive Zellen in Kombination mit den Schwann-Zellen Marker auftraten, aber keine doppelpositiven Zellen für B-Raf und NF in diesen Kulturen zu finden waren (Fig. 10).



9. Figur: *b-raf* Deletion in verschiedenen Zelltypen der *NestinCre⁺; b-raf^{ff} (b-raf^{ΔN}) (KO^N)* oder *NestinCre⁻; b-raf^{ff} (WT)* Tiere. **A.** Western –Blot Analyse von Ischiasserv Lysaten. KO und WT haben annähernd das gleiche Protein Level von B-Raf **B.** PCR Analyse aus DNA von Schwanzspitze (T), Ischiasserv (N) und Spinal Ganglien (DRG). Die minuse Bande bei 298bp (Schwarzer Pfeil) ist nur in PCR Produkten aus der DNA von DRG detektierbar in KO, nicht aber im WT **C.** Doppelfärbung von Schwann-Zellen/Neuronen Co-Kulturen. B-Raf (rot) und zellspezifisches Protein (grün). Protein Zero (P0) als Marker für Schwann-Zellen und Neurofilament (NF) als neuronaler Marker. Kulturen sind 28 Tage alt und nach den ersten 14 Tagen wurde die Myelinisierung induziert. Doppel-Positive Zellen wurden im WT gefunden, sowohl für B-Raf/P0 als auch für B-Raf/NF, hingegen waren im KO nur B-Raf/P0 positive Zellen detektierbar.



10.

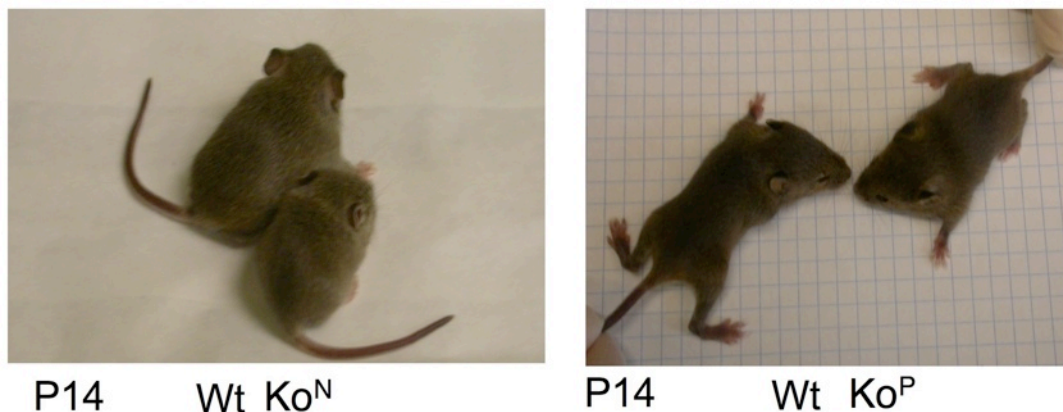
Figur: *b-raf* Deletion in vitro: Doppelfärbung von Schwann-Zellen/Neuronen Co-Kulturen kultiviert von *NestinCre⁺;b-raf^{fl/fl}(b-raf^{Δ/Δ})* (KO^N) oder *NestinCre⁻;b-raf^{fl/fl}* (WT) Embryos. Protein Zero (P0) als Marker für Schwann-Zellen und Neurofilament (NF) als neuronaler Marker. Kulturen sind 28 Tage alt und nach den ersten 14 Tagen wurde die Myelinisierung induziert. Roter Pfeil zeigt eine Schwann-Zelle, diese ist für B-Raf positiv ihr assoziiertes Neuron (grüner Pfeil) weist keine B-Raf Färbung auf.

Alle drei Methoden zeigen deutlich, dass die *b-raf* Deletion nur in den PNS Neuronen zu tragen kommt, während die Gliazellen den Wildtyp Genotypen tragen. Dieses unterstützt die Hypothese, dass der Phänotyp, welcher im PNS beobachtet werden kann, nicht aus einem Entwicklungsproblem der Gliazellen resultiert, wie im Fall des ZNS mit den Oligodendrozyten, sondern aus einem anderen Defekt. Auf Grund des kleinen Zeitfensters, in dem der Phänotyp sich manifestiert und die Art wie er sich ausprägt könnte die Ursache in der Kommunikation zwischen Axon und Schwann-Zelle liegen. Um diese Theorie weiter zu untersuchen, und um einen zellautonomen Effekt der Schwann-Zellen aus zu schließen wurden die Experimente mit umgekehrten Genotypen (Wildtyp in den Neuronen und *b-raf* Deletion in Schwann- Zellen) wiederholt.

III.2. b-raf Deletion in Schwann-Zellen erzeugt einen anderen Phänotypen als im Fall der b-raf Deletion in neuronalen Vorläuferzellen

Die spezifische Deletion von b-raf in Schwann-Zellen wurde erreicht, indem die b-raf^{f/f} Mauslinie mit einer Mauslinie, die die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des P0 Promotors trägt, gekreuzt wurde.

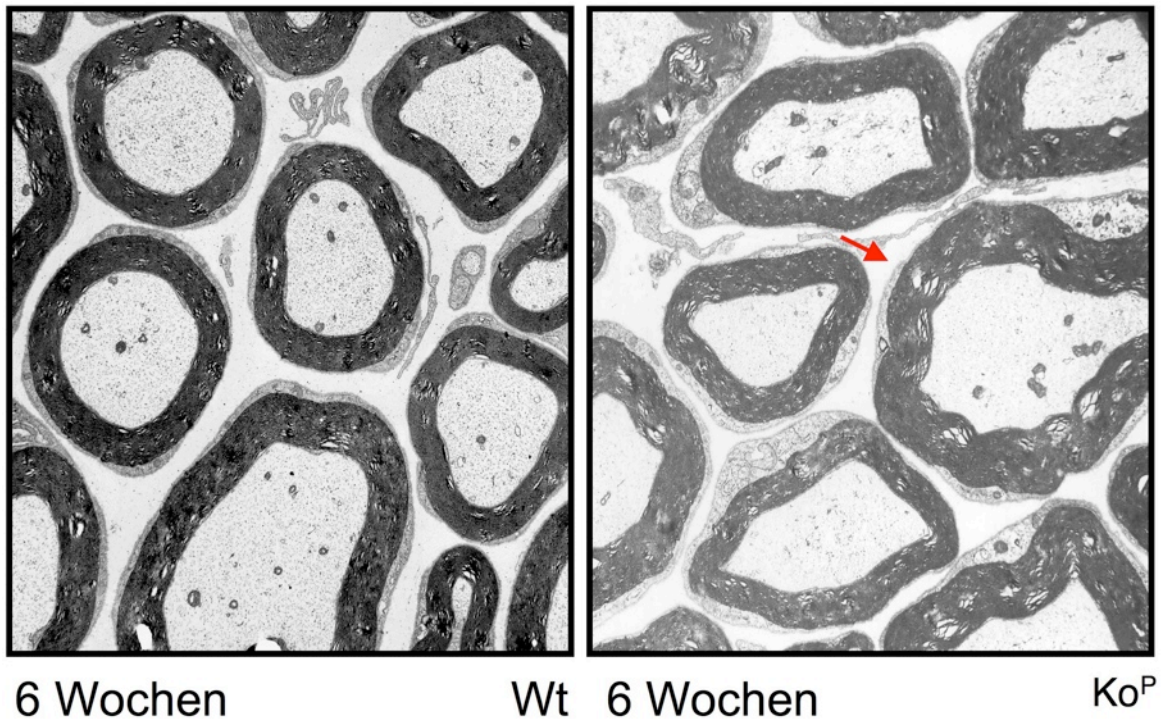
Die so erhaltenen P0Cre⁺; b-raf^{f/f} (b-raf^{Δ/ΔSC}) (KO^P) Tiere zeigten keinen offensichtlichen Phänotyp und waren nicht unterscheidbar von ihren Wt(P0Cre⁻; b-raf^{f/f}) Kontrollen (Fig. 11). Die P0Cre⁺;b-raf^{f/f}(b-raf^{Δ/ΔSC}) zeigten auch nicht im späteren Verlauf ihrer Entwicklung die neurologischen Defekte (Tremore, Koordinationsproblemen, Ataxien oder Muskelschwächen) der NestinCre⁺; b-raf^{f/f} (b-raf^{Δ/ΔN}) Mäuse.



11. Figur: Bilder von 14 Tage alten Mäusen. Linkes Bild : NestinCre⁺; b-raf^{f/f} (b-raf^{Δ/ΔN}) (Ko^N) zeigten geringeres Wachstum als NestinCre⁻;b-raf^{f/f} (Wt) Kontrollen. Rechtes Bild: P0Cre⁺; b-raf^{f/f} (b-raf^{Δ/ΔSC}) (Ko^P) sind nicht zu unterscheiden von P0Cre⁻; b-raf^{f/f} (Wt) Kontrollen.

Da diese P0Cre⁺;b-raf^{f/f}(b-raf^{Δ/ΔSC})(KO^P) Tiere keinen offensichtlichen Phänotyp aufwiesen, wurde eine elektronenmikroskopische Analyse von 6 Wochen alten P0Cre⁺;b-raf^{f/f}(b-raf^{Δ/ΔSC}) (KO^P) und P0Cre⁻;b-raf^{f/f} (WT) Mäuse vorgenommen. Zu diesem Zeitpunkt ist die Entwicklung zum adulten Nervensystem abgeschlossen und alle Axone sollten reife Myelinhüllen tragen. Die Analyse zeigte das die KO^P- Tiere eine leicht veränderte Myelinhüllen Struktur hatten. Sie wiesen ähnliche Lochstrukturen wie NestinCre⁺; b-raf^{f/f} (b-raf^{Δ/ΔN}) Mäuse auf, jedoch waren diese viel kleiner und anders lokalisiert. Diese abnormen Strukturen wurden ü-

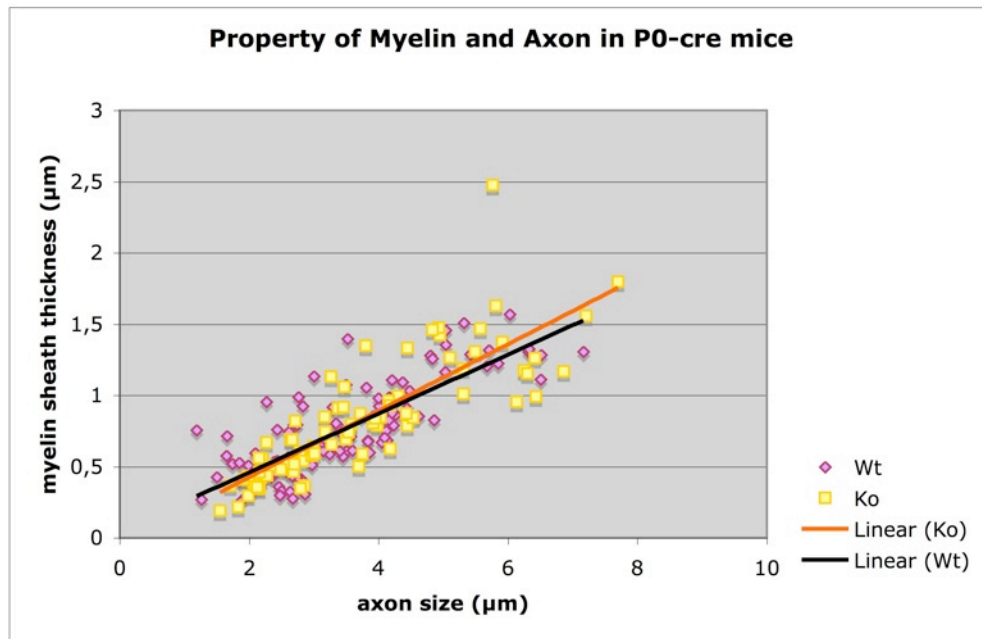
berwiegend nahe dem inneren Mesaxon beobachtet und nicht wie bei den NestinCre⁺;b-raf^{ff}/f(b-raf^{Δ/ΔN}) Tieren beim äußeren Mesaxon (Fig. 12).



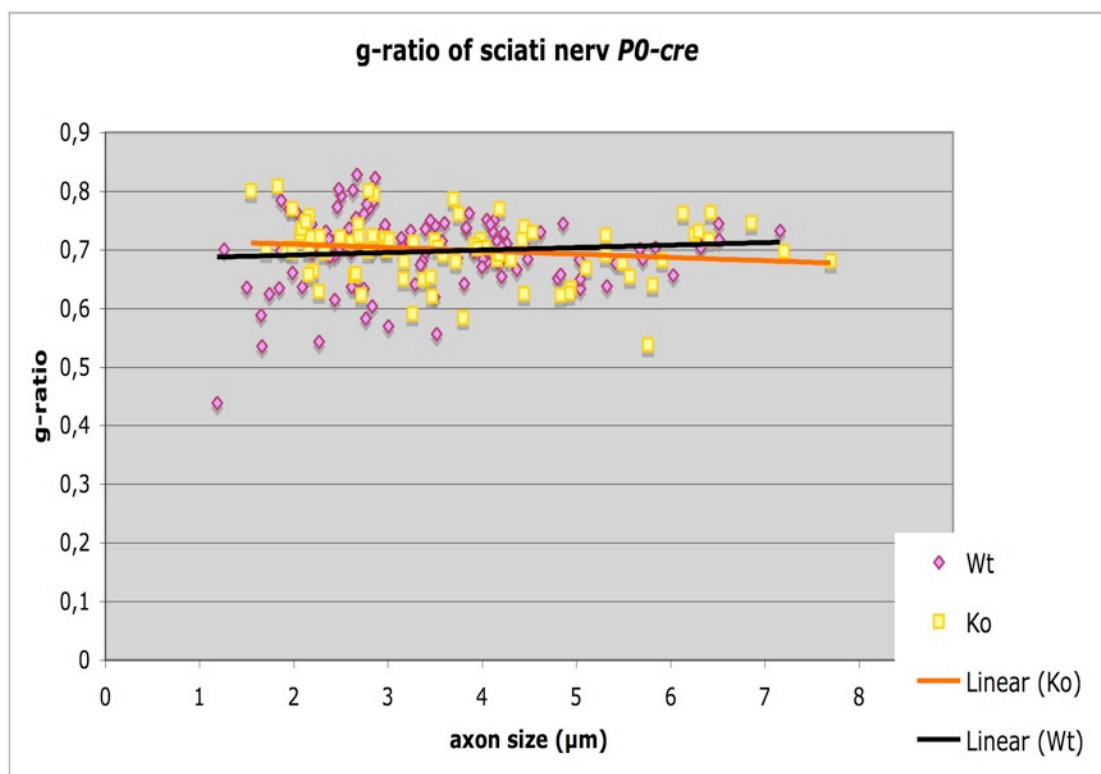
12. Figur: Elektronenmikroskopisches Bilder von Ischiasnerv aus P0Cre⁻; b-raf^{ff} (WT) oder P0Cre⁺; b-raf^{ff} (b-raf^{Δ/ΔSC}) (KO^P) Tieren (Querschnitt, 3000x). KO-Tiere wiesen kleine, kurze Spalten (roter Pfeil) zwischen den Lamellen der Myelinhülle auf. Dieses konnte in WT-Tieren nicht beobachtet werden.

Die quantitative Analyse dieser elektronenmikroskopischen Untersuchung des Ischiasnerves führte zu folgenden Resultaten. P0Cre⁺;b-raf^{ff}(b-raf^{Δ/ΔSC}) (KO^P) hatten einen durchschnittlichen Axondurchmesser von 3,70 $\mu\text{m} \pm 1,49$ während der WT dieser Mäuse nur 3,45 $\mu\text{m} \pm 1,26$ aufwies. Dadurch waren auch die Durchschnittswerte für die Myelinhüllendicke verändert, so wiesen KO^P-Tiere einen Durchschnitt von 0,82 $\mu\text{m} \pm 0,4$ auf, während die WT-Tiere einen Mittelwert bei 0,76 $\mu\text{m} \pm 0,32$ hatten (Fig. 13). Die Tendenz zu verringerten Axongrößen, wie im Falle der NestinCre⁺; b-raf^{ff} (b-raf^{Δ/ΔN}) Mäuse, konnte nicht beobachtet werden, was zu der Annahme führt, dass dieses durch die Abwesenheit von B-Raf in den Neuron verursacht wird.

Die g-Ratio für P0Cre⁺; b-raf^{ff} (b-raf^{Δ/ΔSC}) (KO^P) und P0Cre⁻; b-raf^{ff} (WT) Mäuse bewegten sich in dem normalen Rahmen um 0,7 wie es schon der Fall war für die andere Mauslinie (Fig. 14).



13. Figur: Quantitative Analyse von Ischiasnerven der P0Cre⁻; b-raf^{ff} (WT) oder P0Cre⁺; b-raf^{ff} (b-raf^{ΔΔSC}) (KO) Mäuse. Axondurchmesser (axon size) und Myelin-Dicke (myelin sheath thickness) in µm angegeben. In beiden Genotypen liegen die Werte im selben Bereich.

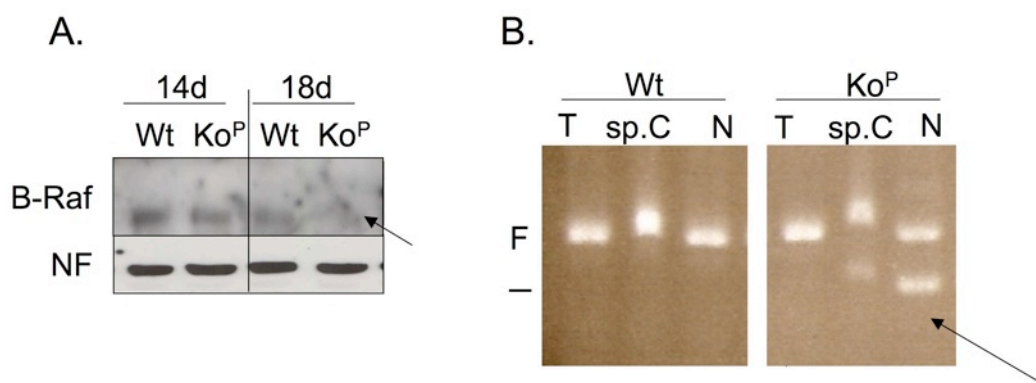


14. Figur: G-Ratio von Ischiasnerven der P0Cre⁻; b-raf^{ff} (WT) und P0Cre⁺; b-raf^{ff} (b-raf^{ΔΔSC}) (KO) Mäuse. In beiden Genotypen ist der Wert um 0,7.

III.2.1. Kontrolle der b-raf Deletion in P0Cre;**b-raf^{f/f}**(b-raf^{Δ/ΔSC}) Mäusen

Die b-raf Deletion in P0Cre⁺;b-raf^{f/f}(b-raf^{Δ/ΔSC}) Mäusen wurde, wie bei den NestinCre⁺; b-raf^{f/f} (b-raf^{Δ/ΔN}) Tieren, durch drei verschiedene Methoden überprüft. Myelin Protein Zero (P0) wird schon auf einem basalen Niveau in SCPs exprimiert und durch den Beginn der Myelinhüllen Bildung steigt die Expression sehr stark an.

Dennoch konnte in Western-Blot Analysen von Ischiasnerv-Lysaten, B-Raf an Tag 14. (P14) in P0Cre;**b-raf^{f/f}**(b-raf^{Δ/ΔSC}) (KO^P) Mäusen in der gleichen Intensität wie im WT detektiert werden. Erst am P21 wurde B-Raf nicht mehr in KO^P-Tieren angezeigt. Die genomische Analyse von 14 Tage alten KO^P-Mäusen mittels PCR, wies aber in der DNA, die aus dem Ischiasnerv gewonnen wurde, die typische Bande bei 298bp auf. Dieses war aber nicht der Fall bei DNA aus der Schwanzspitze oder dem Rückenmark. Damit konnte von einer Konversion des b-raf^{f/f} Allels zu b-raf^{Δ/ΔSC} zum Zeitpunkt P14 ausgegangen werden (Fig. 15).

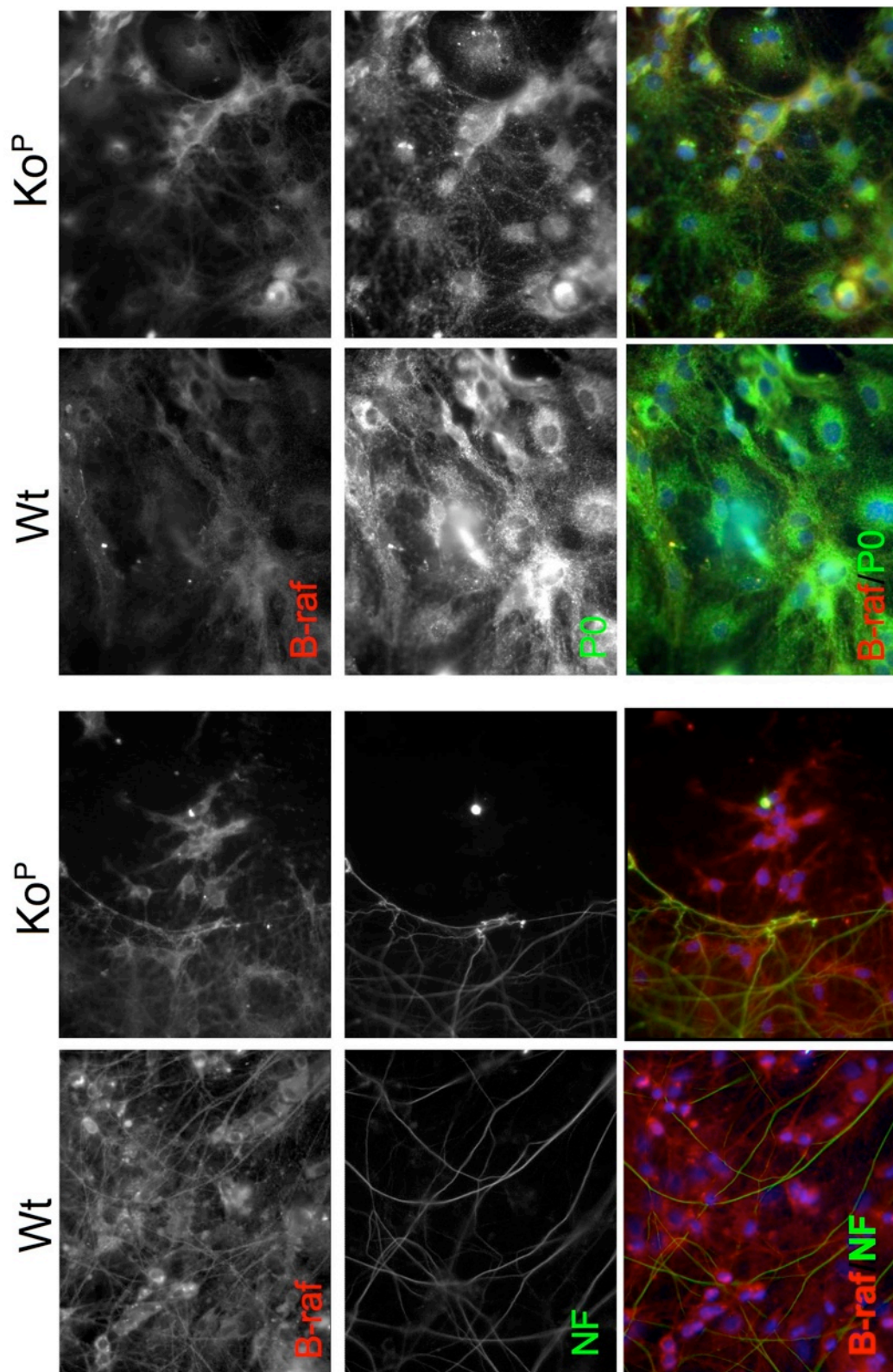


15. Figur: Kontrolle der b-raf Deletion in P0Cre⁻; b-raf^{f/f} (Wt) und P0Cre;**b-raf^{f/f}**(b-raf^{Δ/ΔSC}) (KO^P) Mäusen **A.** Protein Analysis via Western-Blot, zeigte B-Raf Band am 14.Tag (14d) in Ko^P diese verschwindet am Tag 18. (d18) (kleiner Pfeil). Als Ladekontrolle wurde Neurofilament (NF) verwendet **B.** genomische Analyse mittels B-Raf PCR, zeigte die Deletion in 14Tage alten Mäusen. DNA isoliert von Schwanzspitze (T), Rückenmark (Sp.c.) und Ischiasnerv (N), nur im Nerv Bande für b-raf^{Δ/ΔSC} zu sehen (großer Pfeil). Die sehr schwache Bande beim Rückenmark dürfte durch jenen Nerventeil der im Spinalkanal verläuft verursacht sein. Da diese nicht immer vollständig bei der Isolierung entfernt werden konnten.

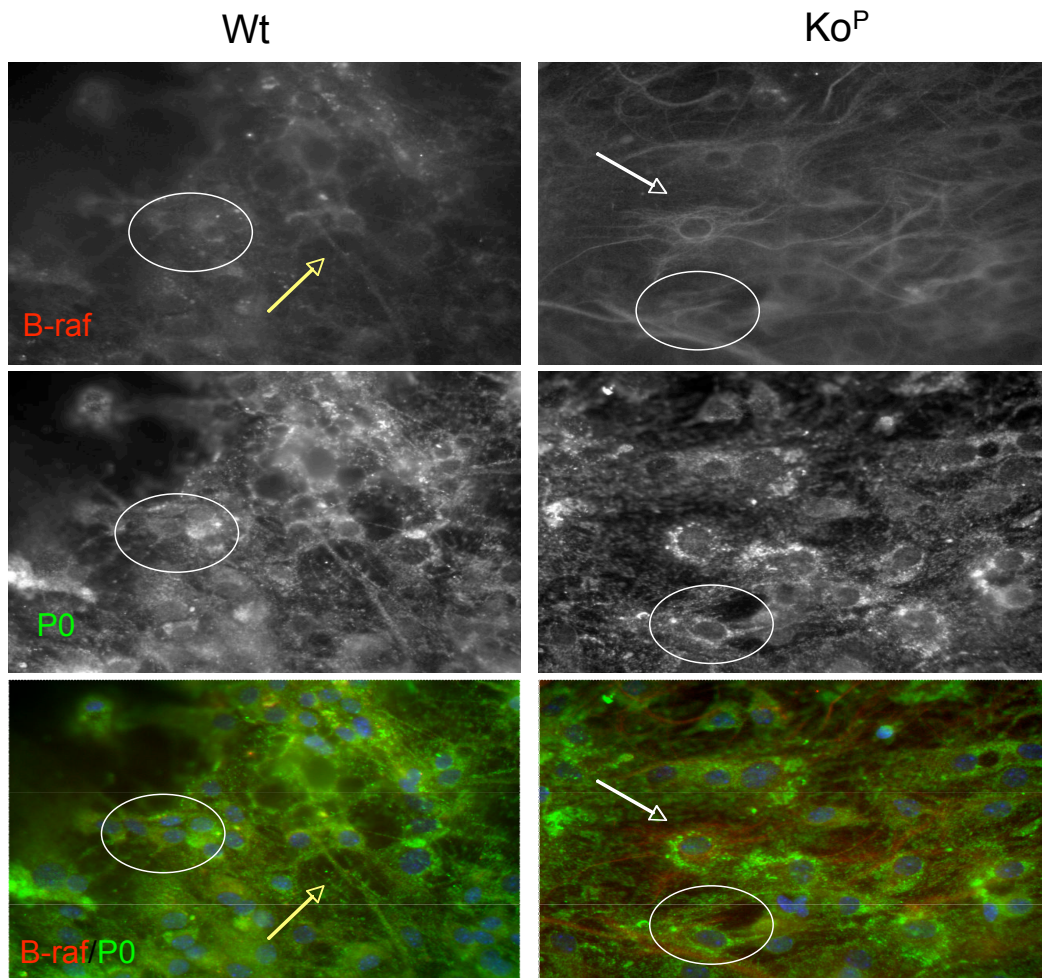
Um eine klare Antwort zu erlangen, ob Schwann-Zellen nun frei sind von B-Raf, wurde wie im Falle der NestinCre⁺; b-raf^{f/f} (b-raf^{Δ/ΔN}) Tiere eine Co-Kultur aus DRG etabliert. Diese Kulturen wurden zu zwei verschiedenen Zeitpunkten fixiert und einer Doppelfärbung für B-Raf mit P0 oder NF unterzogen. Der erste Zeitpunkt war 14 Tage nach der Isolierung der

DRGs, wo die Schwann-Zellen in ihrem unreifen Stadium sein sollten. Der zweite Zeitpunkt war nach 28 Tage der Kultivierung, wo die Zellen bereits 14 Tage lang zur Myelinhüllen Bildung stimuliert wurden und daher eine erhöhte Menge an P0 expremiert wurde.

Diese Versuche zeigten, dass zum ersten Zeitpunkt doppel-positive Zellen nicht nur für B-Raf/NF sondern auch für B-Raf/P0 in der Kultur vorhanden waren. Dieses deutete darauf hin, dass die Konversion von b-raf^{f/f} zu b-raf^{Δ/ΔSC} noch nicht statt fand (Fig. 16). Nach der Myelinisierungs Induktion konnten B-Raf/P0 positiven Zellen noch immer gefunden werden, (weißer Kreis in Fig. 17). Weiters zeigten sie definiertere B-Raf Strukturen, welches in dieser ausgeprägten Form nicht im Wt beobachtet werden konnte (weißer Pfeil in Fig. 17) Dadurch geht klar hervor, dass die vollständige Deletion immer noch nicht gewährleistet war, aber dass sich etwas auf der B-Raf Ebene verändert, wahrscheinlich die einsetzende Deletion.



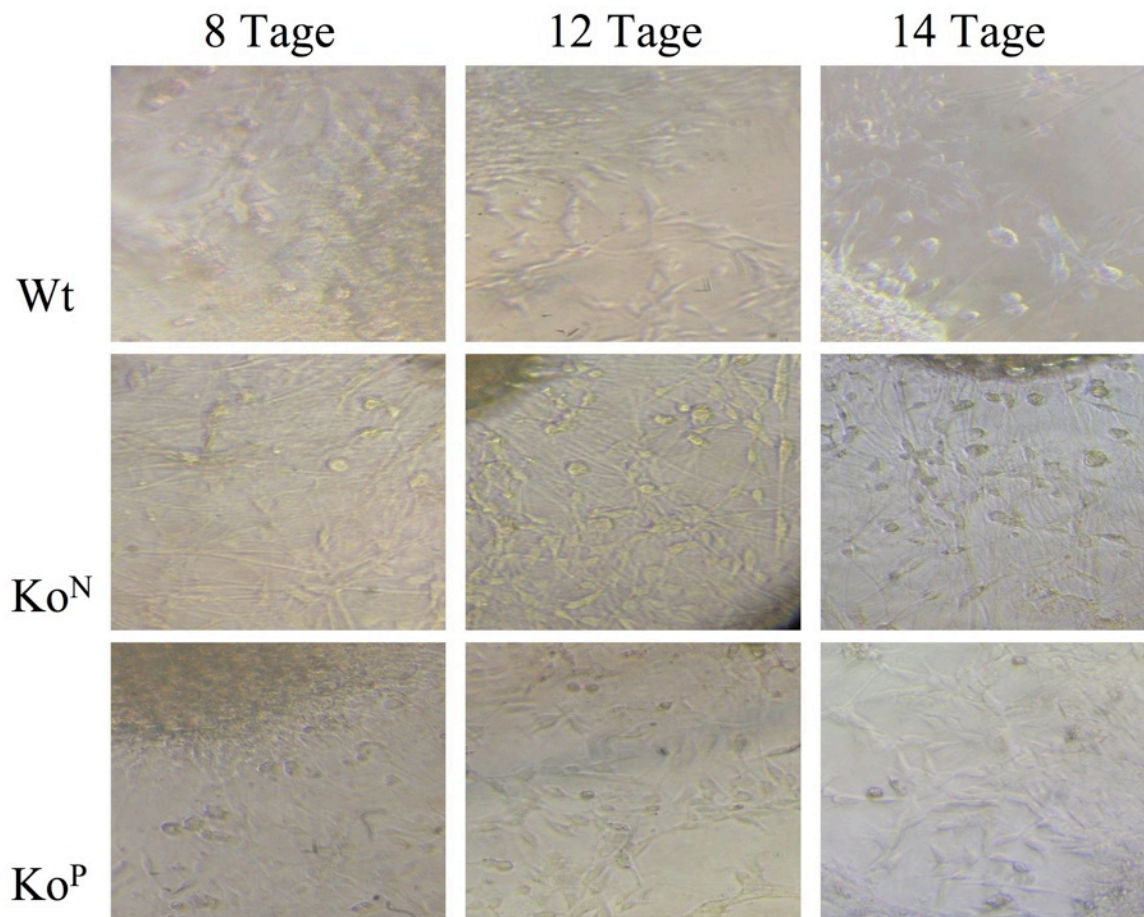
16. Figur: B-Raf Färbung in vitro: Schwann-Zellen/ Neuronen Co-Kultur wurden vor Myelinisierung fixiert und gefärbt. Schwann-Zellen durch P0 gefärbt und Neuronen über Neurofilament (NF). Es zeigten sich B-Raf/P0 positive Zellen sowohl in Kulturen gewonnen aus $P0Cre^+; b-raf^{ff}(b-raf^{\Delta\Delta SC})$ (KO^P) als auch aus $P0Cre^+; b-raf^{ff}(WT)$ Mäusen.



17. Figur: B-Raf Färbung in vitro: Schwann-Zellen/ Neuronen Co-Kultur wurden 14 Tage nach Induktion der Myelinisierung fixiert und gefärbt. Schwann-Zellen durch P0 (grün), B-Raf(rot) gefärbt. $P0Cre^{+};b-raf^{fl}(b-raf^{\Delta/ΔSC})$ (KO^P) wiesen immer noch B-Raf/P0 positiven Zellen auf, und hatten definiertere B-Raf Strukturen, im Vergleich zu $P0Cre^{+};b-raf^{fl}(WT)$ Mäusen

III.3. Experimente zur Myelinhüllen Entwicklung

Da in den zwei verschiedenen Mausstämmen Veränderungen in der Stabilität der Myelinhülle gefunden wurden, war nun die Frage ob der Myelinisierungsprozess normal verläuft. Um dieses zu überprüfen wurden *in vitro* Experimente etabliert in denen der Myelinisierungsprozess untersucht werden kann. Dafür wurden Schwann-Zellen/Neuronen Co-Kulturen verwendet, in denen die Myelinisierung induziert werden kann, und bis zur Bildung einer reifen Myelinhülle beobachtbar ist. Es wurden Spinalganglien (DRGs) aus 13,5E Embryonen isoliert, da zu diesem Zeitpunkt die Entwicklungsprogramme zu Neuronen oder Schwann-Zellen schon fest gelegt sind in den Zellen. Für einen Versuchsaufbau, der näher an die *in vivo* Situation herankommt, wurden die Zellen der DRGs nicht vereinzelt, sondern als intakte DRGs auf Objektträger mit einem Kammersystem gesetzt, wobei sich in jeder Kammer 4-6 DRGs befanden. 4 Tage nach der Isolierung der Zellen konnten erste neuronale Auswüchse (Neurite) beobachtet werden, sowie eine langsame Auswanderung von Zellen aus den DRGs. Diese Neurite bildeten am 8. Tag der Kultivierung ein ausgeprägtes Netzwerk rund um das DRG, wobei Co-Kulturen mit dem Genotypen NestinCre⁺; b-raf^{f/f} (b-raf^{Δ/ΔN}) ein filigraneres Netzwerk zeigten als Co-Kulturen, die aus WT oder P0Cre⁺;b-raf^{f/f}(b-raf^{Δ/ΔSC}) Embryos kultiviert wurden. Bis Tag 14. nahm das Neurit-Netzwerk an Form und Komplexität weiter zu, anfängliche Auswanderung der Zellen von DRG in die Umgebung wurde kaum mehr beobachtet, wenn sie nicht in der Nähe eines Neurits waren (Fig. 18).

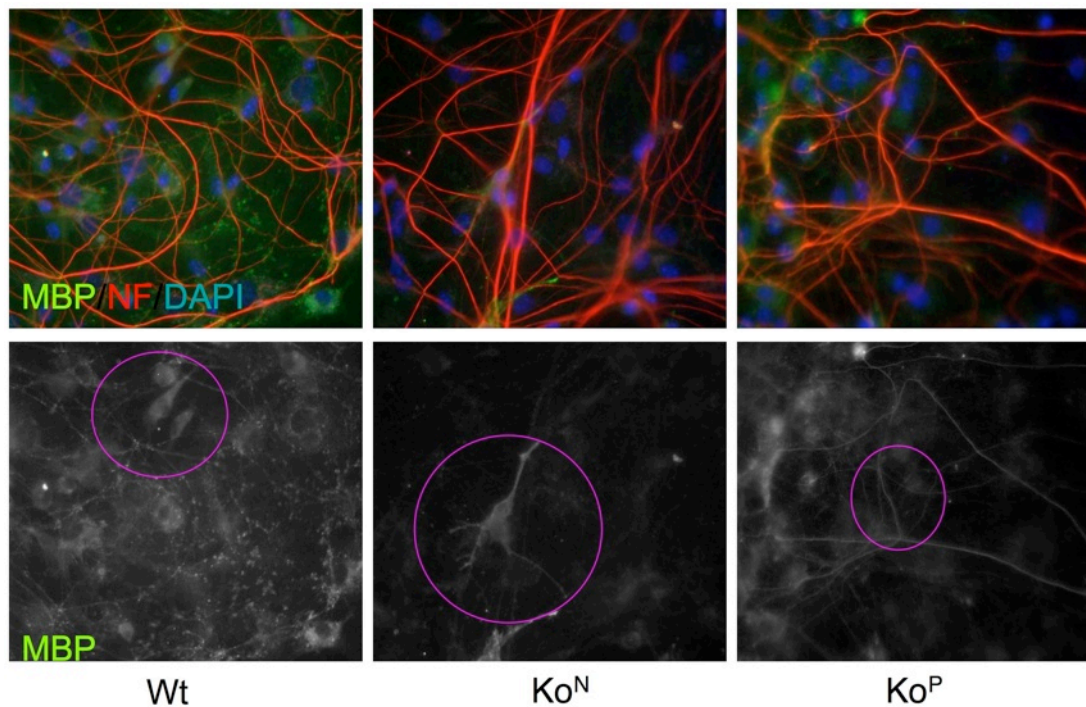


18. Figur: Entwicklung der Schwann-Zellen/Neuronen Co-Kulturen kultiviert aus Wildtypen (Cre^- ; $b-raf^{ff}$), $P0Cre^+$; $b-raf^{ff}$ ($b-raf^{\Delta\Delta SC}$) (Ko^P) oder $NestinCre^+$; $b-raf^{ff}$ ($b-raf^{\Delta\Delta N}$) (Ko^N) Embryos. Tag 8. Kultur zeigt ausgeprägtes Netzwerk von neuronalen Zellauswüchsen (Neuriten), dabei ist in (Ko^N) das Netzwerk feiner als in den anderen Kulturen. 14. Tage nach Isolierung ist die Auswanderung der Zellen vom DRG in die Umgebung schon abgeschwächt.

Nach den ersten 14 Tagen der Kultivierung wurde in den nun stabilen Kulturen durch Zusatz von Vitamin C in das Nährmedium die Myelinisierung induziert. Zu diesem Zeitpunkt bestand der physische Kontakt zwischen Schwann-Zellen und Neuronen, während jene Zellen, die mit keinem Neuron interagieren konnten, nur mehr einen sehr geringen Anteil in der Kultur ausmachten

(Fig. 19). Durch die Induktion der Myelinisierung konnte in der Kultur, die Veränderung der Morphologie der Schwann-Zellen beobachtet werden. Sie begannen sich ab zu flachen und ihren Zellkörper zu verbreitern, welches deutlich zu erkennen war am 22. Tag der Kultivierung. Am 28. Tag konnten die ersten ausgebildeten Myelinhüllen beobachtet werden sowie Ranviesche-Schnürringe (Fig. 20). Die Zunahme der Myelinisierung in den Kulturen wurde durch MBP Färbungen zu verschiedenen Zeitpunkten der Kultur beobachtet. In die-

sen Phasen der Schwann-Zellen Entwicklung, von ihrem Wanderverhalten bis hin zu Ausbildung der Myelinhülle verhielten sich die Zellen in Kulturen von NestinCre⁺; b-raf^{f/f} (b-raf^{Δ/ΔN}), P0Cre⁺;b-raf^{f/f}(b-raf^{Δ/ΔSC}) und Wildtyp gleich.

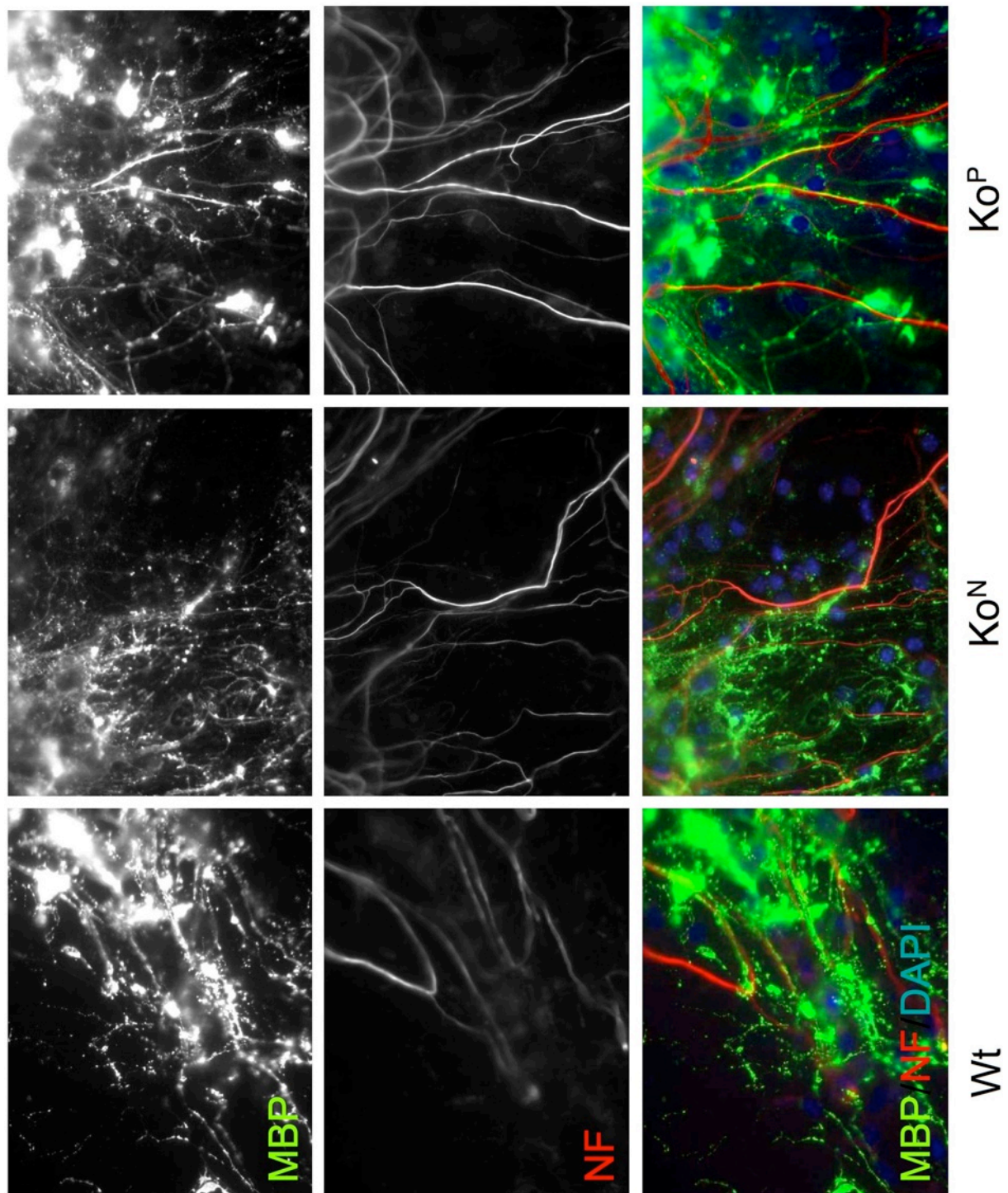


19. Figur: MBP/Neurofilament Färbung von Schwann-Zellen/Neuronen Co-Kulturen: Wt (Cre⁻;b-raf^{f/f}), NestinCre⁺;b-raf^{f/f}(b-raf^{Δ/ΔN})(Ko^N), und P0Cre⁺;b-raf^{f/f}(b-raf^{Δ/ΔSC}) (Ko^P). Fixierung der Zellen vor Induktion der Myelinisierung in allen drei Gruppen sind die Schwann-Zellen an ein Neuron angelagert. (violetter Kreis) Einige Schwann-Zellen können auch schon ohne Induktion die Myelinisierung starten.

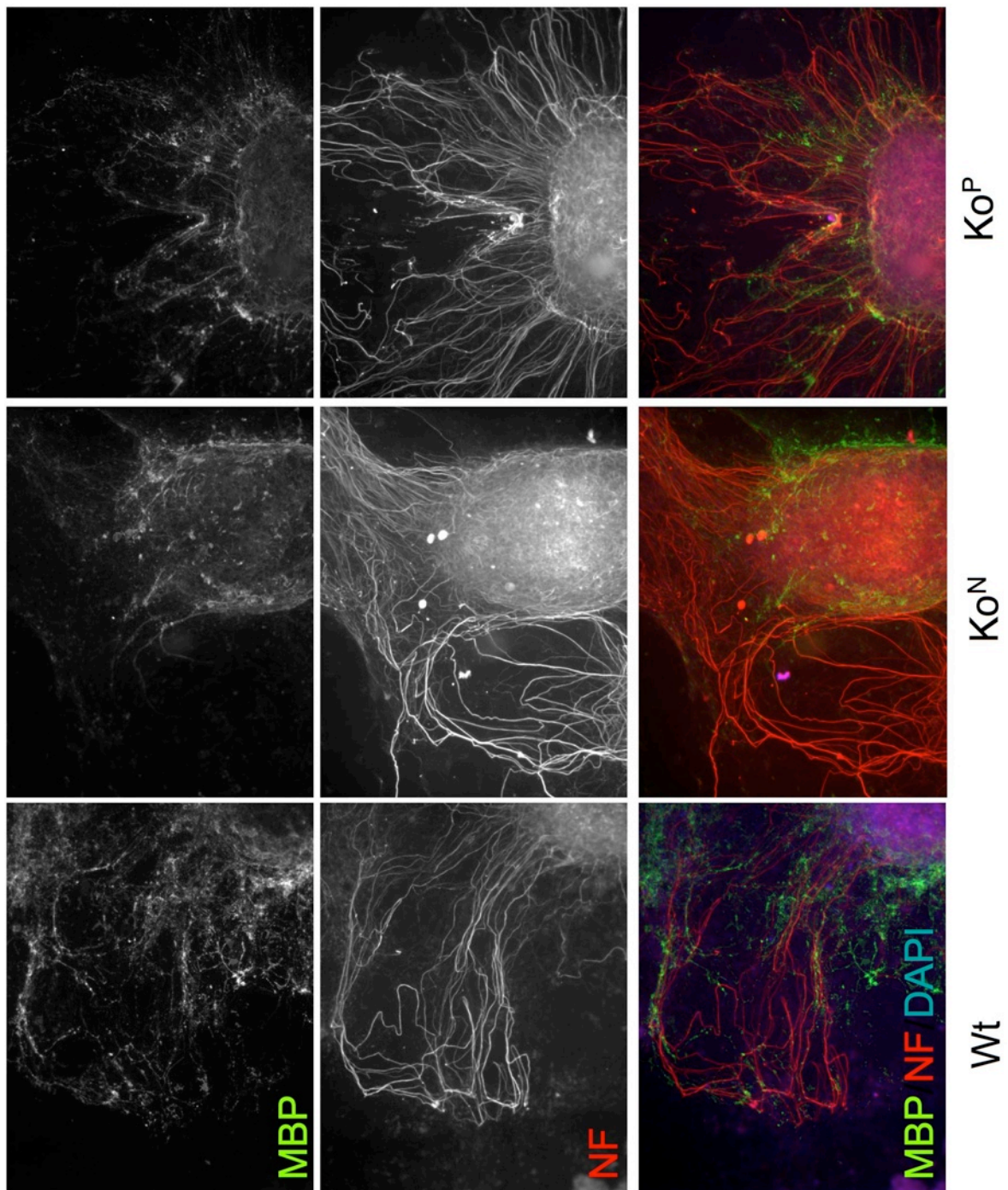
Diese Daten zeigten, dass B-Raf Deletion in neuronalen Vorläuferzellen keinen Einfluss hat auf die Migration von Schwann-Zellen entlang des Axons, auf deren Elongation oder auf die Initiation der Myelinhüllen Bildung hatten. Dennoch konnte des öfteren die Beobachtung in Co-Kulturen aus NestinCre⁺; b-raf^{f/f} (b-raf^{Δ/ΔN}) Embryos gemacht werden, das Myelinhüllen verstärkt nur nahe der DRGs Kern, nicht aber in den entfernteren Regionen der Neuriten gebildet werden (Fig. 21).

Hingegen konnte B-Raf Abwesenheit in Schwann-Zellen und der Einfluss des Proteins auf die Myelinisierung nicht untersucht werden in der Induktions Phase, da zu diesem Zeitpunkt B-Raf immer noch in KO^P-Kulturen in Schwann-Zellen nachweisbar war. Diese Kulturen zeigten aber, dass im Verlauf der Myelinisierung die Veränderte Expression von B-Raf in Schwann Zellen keinen Einfluss auf die Fertigstellung der Myelinhülle hatte, ebenso war die

Ausbildung der Myelinhülle in distaleren Neuriten in P0Cre⁺; b-raf^{ff} (b-raf^{Δ/ΔSC}) Co-Kulturen kaum beeinflusst und ähnlich dem WT (Fig.21).



20. Figur: MBP/Neurofilament-Färbung von Schwann-Zellen/Neuronen Co-Kulturen (40x Vergrößerung) Kulturen hatten Wt (Cre⁺;b-raf^{ff}) , NestinCre⁺;b-raf^{ff}(b-raf^{Δ/ΔN})(Ko^N), und P0Cre⁺;b-raf^{ff}(b-raf^{Δ/ΔSC})(Ko^P) Genotypen; MBP (Grün); Neurofilament NF (Rot); Fixierung der Zellen 14 Tage nach der Induktion der Myelinisierung. Dabei zeigt sich ein erhöhtes MBP Level in Zellen die in Assoziation mit Neuronen waren (durch NF Färbung charakterisiert). Einzelne Myelinhüllen wurden sowohl im Wt als auch in den KO Kulturen gefunden.



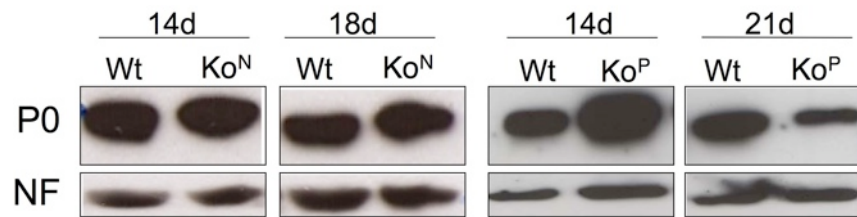
21. Figur: MBP/Neurofilament-Färbung von Schwann-Zellen/Neuronen Co-Kulturen (10x Vergrößerung) Kulturen hatten Wt ($Cre^+; b-raf^{ff}$), Nestin $Cre^+; b-raf^{ff}(b-raf^{\Delta/\Delta N})$ (Ko^N), und P0 $Cre^+; b-raf^{ff}(b-raf^{\Delta/\Delta SC})$ (Ko^P) Genotypen; MBP (Grün); Neurofilament NF (Rot); Fixierung der Zellen 14 Tage nach der Induktion der Myelinisierung. In dieser Vergrößerung sind nur ausgeprägte Myelinhüllen intensiv genug um sichtbar zu werden. Dabei zeigte sich, dass Nestin $Cre^+; b-raf^{ff}(b-raf^{\Delta/\Delta N})$ (Ko^N) Kulturen diese Myelinhüllen nur nahe dem DRG ausgebildet haben zu diesem Zeitpunkt, während P0 $Cre^+; b-raf^{ff}(b-raf^{\Delta/\Delta SC})$ (Ko^P) auch in distaleren Region zu den DRG vereinzelt Myelinhüllen auf wiesen und somit dem Wt ($Cre^+; b-raf^{ff}$) ähnlicher ist.

III.4. Studie zur Myelinhüllen Protein Zusammensetzung

In der Fachliteratur wurde öfters darauf hingewiesen, dass eine Veränderung in der Proteinzusammensetzung der Myelinhülle weitgreifende Folgen auf dessen Ausbildung sowie der Aufrechterhaltung dieser hatte. Da die *in vitro* Experimente zeigten, dass B-Raf anscheinend keine kritische Rolle in der Induktion der Myelinisierung oder in der Etablierung der Myelinscheide trägt, weisen die erhaltenen Daten mehr in die Richtung einer veränderten Proteinzusammensetzung. Um dieses näher zu untersuchen, wurden Lysate von Ischiasnerven der Mauslinien zu verschiedenen Zeitpunkten gewonnen, und mittels Immunblots, in Bezug auf die wichtigsten Myelinproteine wie P0, MBP, PMP22, Con32 analysiert. In NestinCre⁺;b-raf^{f/f}(b-raf^{Δ/ΔN}) und Kontroll-Tieren wurden die Zeitpunkte P14 und P18 gewählt, während P0Cre⁺;b-raf^{f/f}(b-raf^{Δ/ΔSC}) und zugehöriger WT am Tag 14. und 21. analysiert wurden.

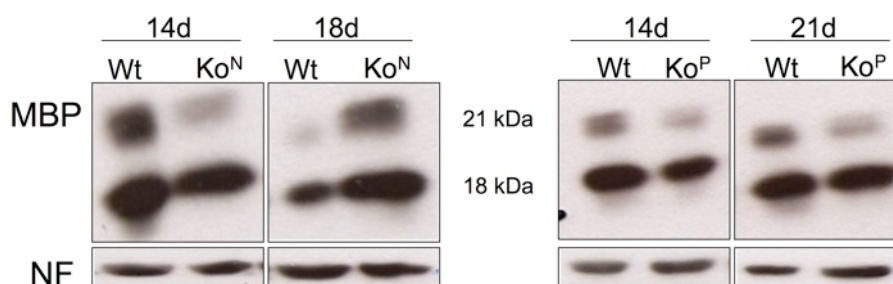
Innerhalb der ersten drei Wochen nach der Geburt verändert sich die Proteinzusammensetzung im Myelin kaum in Hinblick auf die beteiligten Proteine, aber sehr stark in den einzelnen Proteinanteilen in der Membran (Garbay B. et al 2000). So ist am postnatalen Tag 3 P0 nur zu 3% in der Myelinhülle vorhanden. Dieser Anteil steigt im Ischiasnerv bis zu 22% an um den Tag 22. Die Proteine P0 und PMP22 weisen den gleichen Verlauf in ihrem Expressionsmuster auf. Ihre mRNA wird bis P10 immer stärker exprimiert und erreicht an diesem Tag einen maximalen Wert, welcher für die nächsten 10 Tage aufrecht gehalten wird. Danach lässt die Expression langsam nach. Auf Proteinebene kann das gleiche Muster beobachtet werden: zu erst ein Anstieg und danach ein Absenken wobei am 30. Tag ein Plateau-Wert erreicht wird. MBP hingegen wird zu einem etwas späteren Zeitpunkt exprimiert, dadurch erreicht die Expression erst am 18. Tag ihr Maximum. Sowohl P0, PMP22 als auch MBP und Connexin 32 werden durch denselben Transkriptionsfaktor, Krox 20, reguliert (Nagarajan et al. 2001).

Von den strukturgebenden spezifischen Proteinen der Myelinhülle zeigten die Western-Blot Analysen von P0 keinen Unterschied zum Zeitpunkt P14 und P18 in den NestinCre Tieren. Hingegen wiesen P0Cre;b-raf^{f/f}(b-raf^{Δ/ΔSC}) Mäuse am Tag 14. ein höheres Level des Proteins auf, dieses unterschreitet aber am P21 die Menge des P0 Gehaltes in den WT Kontrollen (Fig. 22).



22. Figur: P0 Protein Level im Ischiasnerv: Myelin Protein Zero (P0) ist das Hauptprotein in der Myelinhülle. Ladekontrolle ist Neurofilament (NF). Die NestinCre;*b-raf*^{ff} Mauslinie zeigt gleichen Proteingehalt in WT (NestinCre⁺; *b-raf*^{ff}) und Ko^N (NestinCre⁺; *b-raf*^{ff}(*b-raf*^{Δ/ΔN})). Hingegen ist in P0Cre⁺; *b-raf*^{ff}(*b-raf*^{Δ/ΔSC}) (Ko^P) Nerven der Proteingehalt zu erst erhöht und unterschreitet am 21.Tag den Wert der WT (P0Cre⁺; *b-raf*^{ff}) Kontrolle.

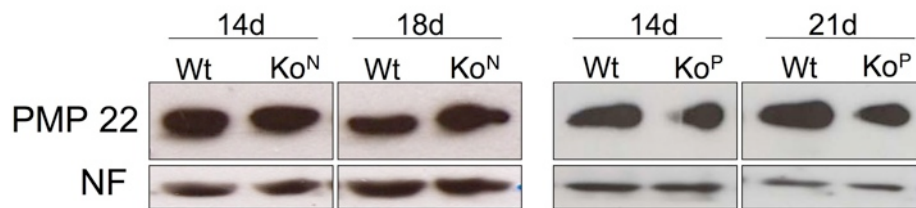
Im Gegensatz dazu wurde der MBP Gehalt, in beiden Mauslinien beeinflusst in der Myelinhülle. MBP besitzt drei wichtige Isotypen mit den Größen 21 kDa, 18kDa und 11kDa. Diese Isotypen entstehen durch alternative Splicing Varianten desselben Genes. So schien in den NestinCre⁺; *b-raf*^{ff} (*b-raf*^{Δ/ΔN}) (Ko^N) ein geringer MBP Gehalt am 14. Tag, welches sich dann zu einem höheren MBP-Gehalt verschob am 18.Tag im Vergleich zu den WT Kontrollen. Zu beiden Zeitpunkten war es der Isotype mit 21kDa, der sich verstärkt verändert hatte, und nicht jener mit 18kDa. In den P0Cre⁺; *b-raf*^{ff}(*b-raf*^{Δ/ΔSC}) Tieren wurde sowohl zum Zeitpunkt P14 als auch P21 eine verringerter Proteingehalt dedektiert im Vergleich zu WT (P0Cre⁺; *b-raf*^{ff}) Mäusen (Fig. 23).



23. Figur: MBP Protein Level im Ischiasnerv: Ladekontrolle ist Neurofilament (NF). Die NestinCre;*b-raf*^{ff} Mauslinie zeigte zum Zeitpunkt P14 eine geringeren MBP Gehalt welcher sich dann zu einem erhöhten MBP Gehalt umkehrte in Ko^N (NestinCre⁺; *b-raf*^{ff}(*b-raf*^{Δ/ΔN})) Tieren im Vergleich zu WT (NestinCre⁺; *b-raf*^{ff}). P0Cre⁺; *b-raf*^{ff}(*b-raf*^{Δ/ΔSC}) (Ko^P) Nerven wiesen zu beiden Zeitpunkten einen geringeren MBP Gehalt auf als die WT (P0Cre⁺; *b-raf*^{ff}) Kontrolle.

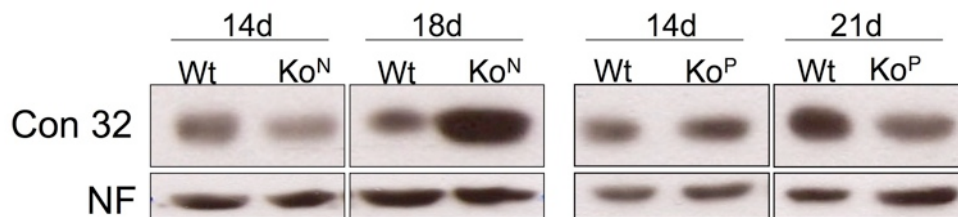
Das Myelinprotein PMP22 wies eine verringerte Expression lediglich in den P0Cre⁺, *b-raf*^{ff}

^f(b-raf^{Δ/ΔSc}) auf (Fig. 24).



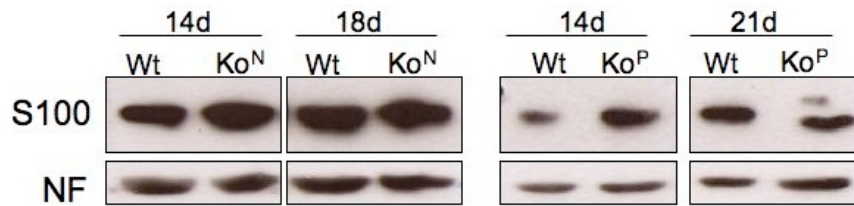
24. Figur: PMP22 Protein Level im Ischiasnerv: Neurofilament (NF) als Ladekontrolle links: Ko^N (Nestin-Cre⁺; b-raf^{ff}(b-raf^{Δ/ΔN})) Tiere im Vergleich zu WT (NestinCre⁺;b-raf^{ff}); rechts: P0Cre⁺;b-raf^{ff}(b-raf^{Δ/ΔSc}) (Ko^P) und WT (P0Cre⁺;b-raf^{ff}) Kontrolle.

Interessanter weise zeigten sowohl NestinCre⁺;b-raf^{ff} (b-raf^{Δ/ΔN}) (Ko^N) als P0Cre⁺;b-raf^{ff}(b-raf^{Δ/ΔSc}) Tiere eine Veränderung im Expressionsmuster des Connexin 32. Im Fall der Nestin-Cre⁺; b-raf^{ff} (b-raf^{Δ/ΔN}) Mäuse war am Tag 14. das Protein-Level leicht verringert und überstieg am Tag 18. die Proteinmenge der WT Kontrolle um mehr als das Doppelte. Hingegen hatten P0Cre⁺;b-raf^{ff}(b-raf^{Δ/ΔSc}) Mäuse am Tag14. Den gleichen Connexin 32 Gehalt wie der WT und dieser verringerte sich bis zum Tag 21. gegenüber dem WT (Fig. 25).



25. Figure: Connexin 32 (Con32) ProteinLevel im Ischiasnerv: Neurofilament (NF) als Ladekontrolle links: Ko^N (NestinCre⁺; b-raf^{ff}(b-raf^{Δ/ΔN})) Tiere im Vergleich zu WT (NestinCre⁺;b-raf^{ff}) am Tag 18 (18d) fast doppelte Proteingehalt in Ko^N im Vergleich zum WT; rechts: P0Cre⁺;b-raf^{ff}(b-raf^{Δ/ΔSc}) (Ko^P) hat am Tag 21. (21d) ein verringerte Expression von Connexin 32 als die WT (P0Cre⁺;b-raf^{ff}) Kontrolle.

S100 ist ein cytosolisches Protein und als weiterer Schwann-Zellen Marker in der Literatur verwendet. Es wird sowohl von myelinisierenden als auch nicht-myelinisierenden Schwann-Zellen exprimiert. Beide KOs zeigten keine Veränderung in ihrer S100 Expression. Welches ein Indiz dafür ist, dass in diesen Tieren das gleiche Verhältnis zwischen Schwann-Zellen und Neuronen vorliegt und erhöhte Schwann-Zellen Proliferation nicht als Kompensationsmechanismus genutzt wird (Fig. 26).

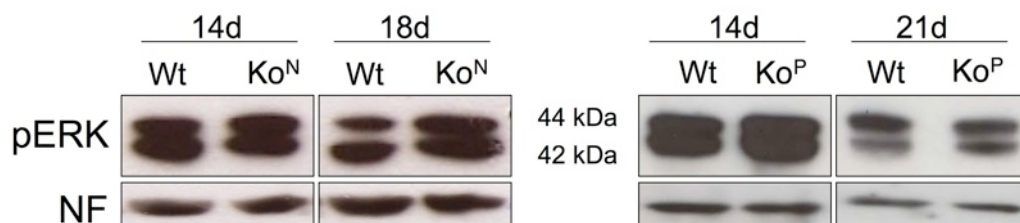


26. Figur: S100 Protein Level im Ischiasnerv: Neurofilament (NF) als Ladekontrolle links: Ko^N ($NestinCre^+; b-raf^{ff}(b-raf^{\Delta/\Delta N})$) Tiere im Vergleich zu WT ($NestinCre^+; b-raf^{ff}$); rechts: $P0Cre^+; b-raf^{ff}(b-raf^{\Delta/\Delta SC})$ (Ko^P) und WT ($P0Cre^+; b-raf^{ff}$) Kontrolle. S100 als Indikator für Schwann-Zellen Zahl im Verhältnis zu Neuronen.

III.4.1. Einfluss von B-Raf auf die Myelin spezifischen Proteine:

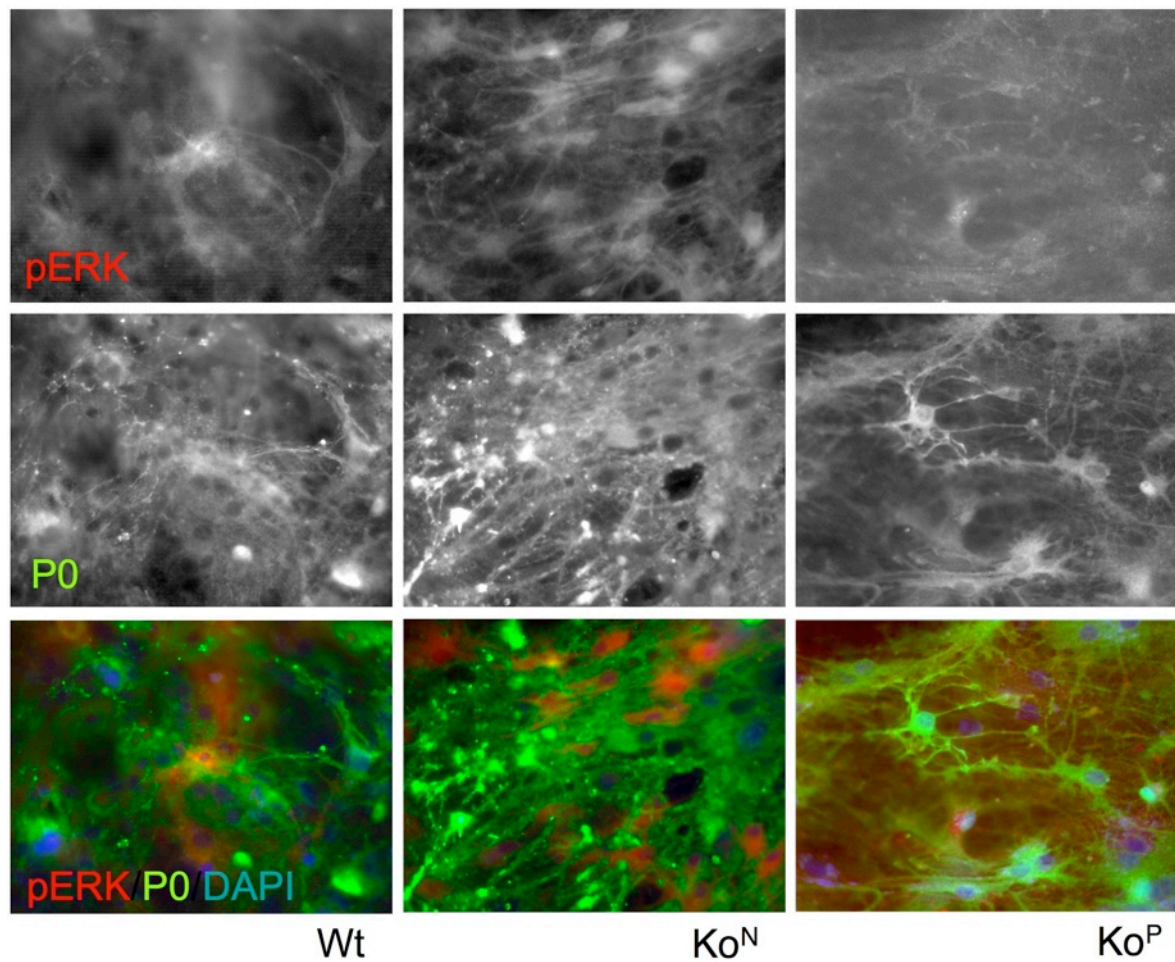
Durch diese Daten wird klar, dass B-Raf eine Rolle in der Proteinzusammensetzung im Myelin spielt. Aber ist dieses über den MAPK-Signalweg oder durch eine andere Signalkaskade? Die Expression von P0, PMP22, MBP, als auch Con32 wird über den Transkriptionsfaktor Krox 20 reguliert (Jessen K. 2005). Da pERK Krox 20 als direktes Zielprotein hat, würde die Veränderung in der ERK Aktivität durch die Abwesenheit von B-Raf in $P0Cre^+; b-raf^{ff}(b-raf^{\Delta/\Delta SC})$ nahe liegen, aber ist nun die MAPK-Signalkaskade in Schwann-Zellen auch bei der Deletion von b-raf in $NestinCre^+; b-raf^{ff}(b-raf^{\Delta/\Delta N})$ Tieren verändert?

Die Western-Blot Analyse zeigte, dass $NestinCre; b-raf^{ff}(b-raf^{\Delta/\Delta N})$ Mäuse das gleiche pERK Level hatten wie ihre WT Kontrolle am 14. Tag. Dieses verschob sich aber am 18. Tag in der Hinsicht, dass $NestinCre; b-raf^{ff}(b-raf^{\Delta/\Delta N})$ Tiere mehr pERK hatten als der WT dazu. Interessanter weise, wurde in $P0Cre; b-raf^{ff}$ Linie am 14. Tag zuerst in KOs ein leichter Anstieg des ERK Phosphorylierung dedektiert, welches dann am 21. Tag auf dem Expressions Niveau der WT Kontrollen war (Fig. 27).



27. Figur: pERK Level in Ischiasnerv: Neurofilament (NF) als Ladekontrolle links: Ko^N ($NestinCre^+; b-raf^{ff}(b-raf^{\Delta/\Delta N})$) Tiere im Vergleich zu WT ($NestinCre^+; b-raf^{ff}$); zeigten einen pERK Anstieg am 18 Tag. rechts: $P0Cre^+; b-raf^{ff}(b-raf^{\Delta/\Delta SC})$ (Ko^P) und WT ($P0Cre^+; b-raf^{ff}$) Kontrolle. Der erhöhte pERK Gehalt in den Ko-Tieren am 14.Tag sinkt ab und erreicht den Wert am 21. Tag von der WT Kontrolle.

Es wurde ebenfalls eine Analyse der pERK Verteilung in den Zellen vorgenommen über eine Doppelfärbung in den Schwann-Zellen/Neuronen Co-Kulturen. In diesen Doppelfärbungen für pERK und P0 zeigte sich, dass in NestinCre;b-raf^{ff/f}(b-raf^{Δ/ΔN}) Co-Kulturen eine andere Verteilung von pERK zu sehen waren, wobei stark positive Zellen vor allem in Kombination mit dem Schwann-Zellen Marker zu finden waren. Diese Schwann-Zellen, wiesen aber eine diffuse Verteilung des P0 Protein auf über den gesamten Zellkörper und nicht die konzentrierte Protein Lokalisation wie in myelinisierende Schwann-Zellen. P0, welches in allen Entwicklungsstadien der Schwann-Zellen exprimiert wird, diente hier vor allem zur Identifizierung der Schwann-Zellen und nicht als Marker für die Myelinisierungsentwicklung. Dieses könnte ein Hinweis auf unreife Schwann-Zellen sein, wobei diese entweder noch nicht differenziert waren oder einer Dedifferenzierung der reifen Schwann-Zellen hervorgehen könnten. Die Kulturen, welche aus P0Cre⁺;b-raf^{ff/f}(b-raf^{Δ/ΔSC}) Embryonen stammen, wiesen pERK gleich dem WT-Kontrolle auf (Fig. 28).



28. Figur: pERK Protein Gehalt in Schwann-Zellen/Neuronen Co-Kulturen: Doppelfärbung mit pERK (rot) und P0 (grün) als Schwann-Zellen Marker für alle drei Schwann-Zellen Entwicklungsstufen. Dabei weisen die Zellen ein anderes pERK Level in NestinCre⁺; b-raf^{ff} (b-raf^{Δ/ΔN}) (Ko^N) Zellen auf, als im WT. P0 hat dabei eine diffusere Verteilung und ist nicht so strukturiert wie im WT. Während P0Cre⁺; b-raf^{ff} (b-raf^{Δ/ΔSC}) (Ko^P) stark ausgeprägte P0 Strukturen zeigten und den pERK Gehalt von WT.

IV. Diskussion

B-Raf ist jene Raf-Kinase, die im neurologischen Gewebe am stärksten exprimiert wird (Wojnowski L. et al. 2000). Als Teil des MAPK-Signalweges spielt sie somit ebenfalls eine wichtige Rolle in der Regulierung von Überleben, Migration, Differenzierung, Proliferation oder Apoptose in der Zelle (Kolch W. 2000). Jede dieser Veränderungen in einer Zelle trägt zur normalen Entwicklung des Nervensystems bei (Jessen K. 2005).

IV.1. b-raf Deletion in neuronalen Vorläuferzellen und die daraus folgenden Konsequenzen

Die NestinCre;b-raf^{ff/f}(b-raf^{Δ/Δ}) Tiere trugen eine B-Raf Deletion in neuronalen Vorläuferzellen (Tronche F. et al 1999). Diese Tiere zeigten daraufhin Wachstumsretardierung, Koordinationsstörungen, Tremore, Ataxia und Muskelschwächen. Im ZNS konnte ein verringerter Grad an Myelinisierung festgestellt werden (Galabova-Kovacs G et al. 2008). Im PNS hingegen trat ein anderer Defekt ein, der sich auf die Stabilität der Myelinhülle auswirkte.

Nestin als Intermediärfilament wird sowohl in neuronalen Stammzellen als auch in den peripheren Nerven exprimiert (Jennermann R. et al 2005; Wiese C et al. 2004). Verschiedene Studien verwendeten das LoxP-Cre System unter der Kontrolle des Nestin Promotors. In all diesen Studien konnte die spezifische Deletion des Zielgenes in Neuronen und Gliazellen des Hirnes und Rückenmarkes gezeigt werden (Tronche F. et al 1999, Haigh R et al 2003; Jennermann 2005). Ob nun aber die Deletion auch in den Schwann-Zellen des PNS eintrat wurde in vielen Fällen nicht näher erläutert. Kao (et al 2009) arbeitete ebenfalls mit dem Nestin Promotor, LoxP-Cre System und zeigte, dass die Schwann-Zellen in seinem Model von der Deletion des Zielgenes nicht betroffen waren. Auch unsere Ergebnisse der Western-Blot Analyse (Fig. 9) aber vorallem der Zellkulturen (Fig. 10) führten zu der Schlussfolgerung, dass die Schwann-Zellen von der Deletion des b-raf Allels in den neuronalen Vorläufer Zellen nicht betroffen sind. Hier sei angemerkt, dass die Deletion des b-raf Gens im Gehirn und Rückenmark der Nestin-Cre KO Mäuse erst am Tag E11.5 vollzogen ist (Galabova-Kovacs G. et al. 2008). Die Neuralleisten Zellen zweigen sich schon früher von dieser Zellgruppe ab, und so kann die Konversion womöglich in den Schwann-Zellen nicht mehr zum tragen kommen. Da aber Nestin als Teil des Cytoskelettes der Neuronen noch stark exprimiert wird, tritt auch

in den Neuronen des PNS die vollständige Deletion von B-Raf auf.

Den Einfluss von B-Raf auf die Oligodendrozytenentwicklung zeigten Galabova-Kovacs et al. (2008) in den NestinCre;b-raf^{f/f}(b-raf^{Δ/Δ} N) Tieren deutlich auf. Es kam in diesen Mäusen zu einem Arrest in der Oligodendrozytenentwicklung, wodurch vermehrt unreife Zellen im Nervensystem zu finden waren, die ihre Aufgabe nicht mehr erfüllen konnten. Daher war auch die Myelinhüllen Bildung stark verringert. Hier stieß man auch im peripheren Nervensystem auf eine Veränderung in der Myelinhülle. Unsere Ergebnisse der elektronenmikroskopischen Analyse (Fig. 7/8) machen deutlich, dass im PNS die Entwicklung der Myelinhülle nicht beeinflusst wurde.

So war im ZNS eine kontinuierliche Zunahme des neurologischen Defektes zu beobachten aber im PNS traten erst nach der ersten postnatalen Woche Anzeichen von Veränderungen in der Myelinhülle auf. Diese Myelinhüllen entwickelten sich immer noch stetig weiter und nahmen in ihrem Durchmesser zu, wie durch die im normalen Bereich liegende g-Ratio gezeigt werden konnte (Fig. 8). Gleichzeitig kam es auf der anderen Seite zur Veränderungen in der Myelinstruktur. So entwickelte sich der ausgeprägte Phänotyp (Fig. 5) des PNS in einem Zeitfenster von 4 Tagen. Beides weist darauf hin, dass die Kommunikation zwischen Neuron und Schwann-Zelle durch die b-raf Deletion in den Neuronen beeinflusst wird.

Die ersten Veränderungen in der Myelinscheiden Struktur traten nahe dem äußeren Mesaxon auf. Dort zeichnete sich ein Lösen der Membran Schichten von einander ab, das schließlich zur Entwicklung von „onion bulb“ Strukturen um Tag 18 führte (Fig. 6/5). In der Regenerierung von Nerven nach ihrer Verletzung erfolgt ebenfalls eine Destabilisierung und Abbau der Myelinhülle in einem sehr kurzen Zeitfenster von vier Tagen (Piao Z. et al, 2004). So könnte die fehlerhafte Kommunikation zwischen Schwann-Zelle und Neuron als Nervbeschädigung wahrgenommen werden, und in den Schwann-Zellen zwar die Destabilisierung induzieren, aber es nicht mehr zum Abbau der Myelinhülle kommt, wie bei der Regenerierung des Nerves der Fall ist, da die Mäuse auf Grund des Defektes im ZNS davor sterben. Diese Hypothese wird durch weitere Ergebnisse in unsere Studie unterstützt.

Die *in vitro* Versuche mit Schwann-Zellen/Neuronen Co-Kulturen etabliert aus NestinCre;b-raf^{f/f}(b-raf^{Δ/Δ} N) Embryonen zeigten keine Schwann-Zellen Defekte in Bezug auf Reifung, E-

longation, oder Induktion der Myelinisierung (Fig. 18/19). Dennoch konnte in den Kulturen eine feinere Netzwerkausbildung der Neurite (Fig. 18) beobachtet werden. Diese geringeren Axondurchmesser wurden auch in der elektronenmikroskopischen Analyse (Fig. 7) gefunden, welches daraufhin deutet, dass diese dünneren Neurite auch *in vivo* vorhanden sind, dieses aber keinen Einfluss auf die Induktion der Myelinhülle hat. Die Kommunikation zwischen den Neuronen und den Schwann-Zellen dürfte zu diesem Zeitpunkt ausreichend sein, oder das Signal, welches in dieser Kommunikation vermisst wird, kommt noch nicht zu tragen. Weiters kann das Axon ausreichend erkannt werden um wirklich myelinisiert zu werden (Fig. 20), da in Schwann-Zellen die Expression von Myelin spezifischen Proteinen immer noch möglich war.

Daraus lässt sich schließen, dass der Signalweg, in dem B-Raf involviert ist, in den Neuronen weder für das Überleben noch für die Differenzierung der Schwann-Zellen benötigt wird.

Die Verringerung in den Axondurchmessern (Fig. 7) könnte ein Hinweis darauf sein, dass B-Raf, welches in der Cytoskelett-Umgestaltung wichtig ist (Klein R. 2008), ebenso einen Einfluss auf die Neurofilament Zusammenlagerung hat. In der Charcot-Marie-Tooth Erkrankung wurde ebenfalls eine erhöhte Neurofilament Dichte gefunden, die durch eine Hypophosphorylierung der Neurofilament-Stränge ausgelöst wurde (Maier M. et al. 2002).

Während der Phänotyp im ZNS der NestinCre;b-raf^{ff/f}(b-raf^{Δ/Δ}N) Mäuse durch verringerte Myelinisierung und Hypomyelinisierung zu beobachten war, so schien im PNS die Probleme in der Aufrechterhaltung der Integrität der Myelinscheide zu liegen (Fig. 5). Obwohl der Phänotyp im ZNS von den Gliazellen herrührt, weisen unsere Ergebnisse darauf hin, dass im PNS ein Problem in der Kommunikation zwischen Neuronen und Gliazellen besteht. Möglicherweise ist B-Raf der Angelpunkt für einen Signalweg, dessen Zielprodukt in der Kommunikation zwischen Schwann-Zellen und Neuronen eine tragende Rolle hat. Womöglich kontrolliert es ein Signal, dass der Schwann-Zelle anzeigt, dass das Neuron intakt ist und wirklich intensiv genutzt und benötigt wird.

Die Ergebnisse der Western-Blot Analyse, geben Aufschluss über die Zusammensetzung der Myelinscheide. Eine Veränderung hier könnte die Integrität der Myelinhülle beeinträchtigen.

So führte die b-Raf Deletion in Neuronen zu keinerlei Auswirkungen auf die Expression von P0 (Fig. 22) und PMP22 (Fig. 24), verursachte aber eine Verschiebung in der Isotypen Verteilung von MBP (Fig. 23). Im Falle von Connexin 32 kam es zu einer starken Deregulierung des Proteins (Fig. 25). Connexin 32, ist eine Komponente der Gap-Junctions und könnte als ein Kompensations-Mechanismus verstärkt exprimiert werden, da vermehrtes Connexin auch mehr Gap-Junctions bedeutet, wodurch die Möglichkeit der Kommunikation zwischen Axon und Schwann-Zellen gesteigert wird.

In vielen Fällen wird die Expression eines Proteins nicht nur über die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren geregelt, sondern auch über andere Mechanismen, wie Co-Faktoren, Zugänglichkeit der DNA für Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor; oder auf der Ebene der mRNA Stabilität und Translation, sowie auf der Ebene der Proteinstabilität.

So führen die beobachteten Veränderung zu der Vermutung, dass die Abwesenheit von B-Raf-Molekülen in den Neuronen keinen Einfluss auf die Aktivierung von Krox20 in Schwann-Zellen hat (Fig. 22-24), weil alle untersuchten Myelinhüllenproteine von diesem Transkriptionsfaktor reguliert werden. Dennoch könnte ein Signal von den Neuronen ausgesendet werden, die in den Schwann-Zellen zu einer erhöhten Produktion von Connexin 32 führt, oder die Stabilität der Gap-Junctions erhöht, wodurch immer mehr Connexin 32 in die Membran eingebaut würde.

Das PNS hat die Fähigkeit, sich nach Nervenverletzungen zu regenerieren. Hierfür wird in Schwann-Zellen ein Programm aktiviert was dazu führt, dass sich die Zellen in ihr proliferierendes unreifes Zellstadium umwandeln. Einer dieser Indikatoren ist ein Anstieg von pERK, danach ist der Abbau von Myelinprotein wie P0, MBP und PMP 22 nachweisbar (Harrising M. et al. 2004).

Die Western-Blot Analyse zeigte (Fig. 27), dass das pERK Level in NestinCre;b-raf^{fl/f}(b-raf^{ΔN}) Tieren zum postnatalen Tag 18 höher lag als im Wildtypen. Zu diesem Zeitpunkt waren die Deformierungen in der Myelinstruktur sehr deutlich sichtbar in der elektronenmikroskopischen Analyse (Fig. 5). Harrising et al. (2004) gewann ihre Erkenntnisse über das Verhalten der Myelinproteine während der Dedifferenzierung der Schwann-Zelle vor allem aus *in vitro* Studien.

In unseren *in vitro* Studie konnte erhöhte pERK Aktivität vor allem in Schwann-Zellen ge-

zeigt werden, die sehr diffuse verteiltes P0 hatten (Fig. 28), und annähernd den Schwann Zellen vor der Myelinisierungs Induktion gleich kamen. Obwohl diese Analyse nicht quantitativ ist, weisen die Ergebnisse auf eine mögliche Dedifferenzierung der Schwann-Zellen hin.

Die Veränderung von Myelinproteinen ging aus den *in vivo* Analyse nicht deutlich hervor. Da aber für die Western-Blots keine Präparate vom 21 Tag herangezogen wurde sondern nur bis zum 18. Tag, wo die Myelinhülle zwar in ihrer Struktur deutlich zerstört war, aber keine Vesikeln mit Myelin Fragment zu sehen waren, wie es der Fall ist bei dem weiteren Verlauf von Schwann-Zellen Dedifferenzierung, wäre es möglich, dass die Dedifferenzierung durch den frühzeitigen Tod resultierende aus dem ZNS-Phänotypen einfach nicht mehr völlig zur Ausprägung gelangt. So würde auch der Proteinabbau nicht mehr sichtbar werden in den Western-Blot Analysen.

IV.2.b-raf Deletion in Schwann-Zellen und die resultierende Schlussfolgerungen

Die elektronenmikroskopische Analyse (Fig. 12) der zweiten Mauslinie P0Cre;b-raf^{f/f}(b-raf^{Δ/ΔSC}) zeigte, dass durch das fehlende B-Raf in den Schwann-Zellen die Stabilität in der Myelinhülle beeinflusst ist. So entwickeln diese Mäuse Bereiche von gelösten Membranen in der Myelinhülle, dieses aber nur in einem geringeren Ausmaß. Es entstanden keine „onion bulb“ Strukturen, lediglich vereinzelt eine Membranschicht die sich lockert, aber dieses setzt sich dann nicht über mehrere Lammellen der Myelinhülle fort. Diese Veränderung war lokalisiert nahe dem inneren Mesaxon. Eine mögliche Erklärung könnten die Ergebnisse der Deletionskontrolle liefern, da B-Raf erst am P21 nicht mehr detektierbar war in den KO^P Mäusen (Fig. 15). Die Myelinhülle wächst über das herum Wickeln des inneren Mesaxons um das Axon, damit ist neu synthetisiertes Myelin dort lokalisiert. Die mit der Veränderung in der B-Raf Expression entstehenden Folgen, kommen somit dort auch als erstes zu tragen.

Es zeigten sowohl die *in vitro* als auch *in vivo* Experimente eine Verzögerung zwischen Deletion und tatsächlicher Abwesenheit von B-Raf. Da die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des P0 Promotors stand, könnte auch die Möglichkeit bestehen, dass das basale Level der P0 Expression in Schwann-Zellen Precursor Zellen (Lee M et al. 1997) nicht ausreicht, um eine vollständige Deletion zu gewährleisten. Erst nach Induktion der Myelinisierung wird P0 vermehrt exprimiert (Lee M et al. 1997), aber selbst dies war noch nicht ausreichend für eine vollständige Deletion *in vitro* (Fig. 17)

Durch die erst spät greifende Deletion von B-Raf in den Schwann-Zellen konnten keine Rückschlüsse auf die B-Raf Funktion in der Initiationsphase der Myelinisierung gezogen werden, oder welche Rolle es spielt bei der Migration und Differenzierung in den Schwann-Zellen. Dadurch können diese Mäuse und ihr Defekt auch nicht mit den NestinCre/b-raf^{f/f} Mäuse verglichen werden.

V. Material und Methoden

V.1. Mauslinien

NestinCre/b-raf^{f/f} Mäuse:

Ein Mausstamm mit dem genetischen Hintergrund von SV129 Mäusen, trug LoxP- Sequenzen am 5' und 3' Ende des Exon 11 des b-raf-Genes (b-raf^{f/f}) und wurde mit einer zweiten Mauslinie gekreuzt, welche die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des Promotors Nestin besitzen (Tronche et al. 1999). Nestin als Intermediarfilament Protein ist spezifisch in neuronalen Vorläufer Zellen exprimiert. Die aus dieser Kreuzung stammenden Tiere trugen eine B-Raf Deletion in neuronalen Vorläuferzellen (b-raf^{Δ/ΔN}).

P0Cre/b-raf^{f/f} Mäuse:

In diesem Fall wurde der B-raf^{f/f} Mausstamm mit einer transgenen Mauslinie gekreuzt, der die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des Promotor des Myelin-Protein-Zero (P0) trug. Die resultierenden Mäuse, wiesen eine spezifische Deletion von b-raf in Schwann-Zellen (b-raf^{Δ/ΔSC}) auf.

Die Pflege und Haltung der Tiere stimmte mit den Richtlinien der Max F. Perutz Laboratorien überein.

V.2. Primäre Schwann-Zellen/Neuronen Co-Kulturen aus Spinalganglien

Diese Co-Kulturen werden aus Spinal Ganglien (DRG) von E13.5 alten Embryos etabliert.

- Dafür werden von einer trächtigen Maus, 13.5 Tage nach der Befruchtung, die Embryonen isoliert. Durch eine vertikale Inzision entlang des Bauchraumes kann der Uterus der trächtigen Maus frei gelegt werden. Der Uterus wird dann aus dem Bauchraum präpariert ohne dabei die Fruchtblasen zu zerstören und in 50 ml eiskalten PBS in einem Falcon auf Eis aufbewahrt bis zur Isolierung der DRG aus den einzelnen Embryonen.
- Für die weitere Isolierung wird eine Fruchtblase vom Rest des Uterus abgetrennt, aus dieser wird der Embryo isoliert durch vorsichtiges öffnen der Fruchtblase. Danach erfolgt wiederholtes waschen (3x) mit sterilen PBS, um den Embryo von Fruchtwasser und Blut zu befreien.

- Der Embryo wird dann auf einer sterilen Isolierplatte mittels Nadeln fixiert und wiederum mit sterilen PBS bedeckt. Dabei wird der Embryo so positioniert, dass der Bauch nach oben weist und die Gliedmassen vom Körper weggespreizt sind. Die weiteren Schritte der Isolation werden unter Zuhilfenahme des Stereomikroskopes vorgenommen.
- Dem Embryo wird vorsichtig der Bauchraum geöffnet unter Verwendung von spitzen beschichteten Pinzetten. Dann erfolgt die Entfernung der Rippen, der Eingeweide sowie der inneren Organe, wobei die Verbindung der Organe zur Wirbelsäule vorsichtig mit der Pinzette durchtrennt wird. Dabei wird das PBS mehrmals gewechselt durch vorsichtiges Absaugen und Zupipettieren von frischen sterilen PBS. Dieses wird solange wiederholt bis die Wirbelsäule und die darüber befindliche Aorta deutlich zu sehen sind. (Der Embryo darf nicht trocken laufen.) Danach wird vorsichtig die Aorta abgezogen, und der weiche Knochen (grau-weiß) um die Wirbelsäule entfernt, bis das Rückenmark mit den DRGs zu sehen ist. Das Rückenmark ist mehr gelb-weiß und weist in seiner Mitte eine deutliche Linie auf. Die DRG sitzen als Kugeln links und rechts vom Rückenmark. Bei diesen Schritt der Isolierung ist einige Mal das PBS zu wechseln um eine klare Sicht auf die Wirbelsäule und das Rückenmark des Embryos zu behalten und möglichst wenige Zellen im PBS schwimmen zu haben.
- Die so zugänglichen DRG werden vorsichtig zwischen die Pinzette genommen und durch einen leichten Zug vom Rückenmark weg gezogen. Dabei werden die Nervenverbindungen zwischen DRG und Rückenmark sichtbar, diese werden vorsichtig mit einer Pinzette durchtrennt und das freie DRG wird in einen frischen sterilen Tropfen von PBS gesetzt.
- 4-5 freie DRG werden mit einer gelben Spitze (20-200µl) aus dem PBS aufgenommen und unter der Lamina in die Kammern der vorbereiteten Kultivierungsobjektträger transferiert durch einpipettieren in den Tropfen des Kultivierungsmedium. In jede Kammer wurde zuvor ein 30µl Tropfen Medium gesetzt, sowie am Vortag eine Matrix aus Laminin und L-Polylysin aufgebracht (Aufbringung der Matrix nachfolgend näher erklärt), die den Zellen eine bessere Adhäsion an den Boden ermöglicht und die extrazelluläre Matrix in vivo simuliert.
- Die DRGs brauchen 30 min um an den Kammerboden zu adhären, erst danach werden weitere 200µl Kultivierungsmedium vorsichtig zugeführt. Während dieser 30 minütigen Wartezeit und danach werden die Objektträger in einen Inkubator mit 37°C/ 5% CO₂ gestellt.

- In den ersten 32 Stunden nach der Isolierung reagieren die Zellen sehr sensitiv auf Veränderung der Temperatur, Feuchtigkeit und des CO₂-Gehalts.
- Das Kultivierungsmedium wird alle 3-4 Tage gewechselt, wobei nach den ersten vier Tagen die Zellen beginnen neuronale Ausläufe (Neuriten) zu bilden. DRGs, die dies zu diesem Zeitpunkt nicht tun, werden auch kein neuronales Netzwerk mehr ausbilden. Spätestens 8 Tage nach der Isolierung muss ein kleines neuronales Netzwerk um ein DRG zu sehen sein.
- Nach 14 Tagen haben sich flächige neuronale Netzwerke gebildet, und durch wechseln des Mediums zum Induktionsmedium wird die Myelinisierung gestartet.
- Mediumswechsel erfolgt wieder alle 3-4 Tage, dabei das Medium auf Raumtemperatur vorwärmen, Vitamin C immer frisch zu setzen.
- Fixierung der Zellen 28 Tage nach der Isolierung.

Kultivierungsmedium:

Neurobasal medium (Gibco)

FCS 10%

B27 1:10

Streptomycin/Penicillin 1:100 (60µg/L Penicillin; 100µg/mL Streptomycin)

Induktionsmedium:

Neurobasal medium (Gibco)

FCS 10%

B27 1:10

Streptomycin/Penicillin 1:100

Vitamin C 50µg/ml

Matrix-Lösung für Objektträger mit Kammeraufsatz:

1:1000 Poly-D- Lysin (50µg/ml)

1: 10 000 Laminin (100µg/ml)

In sterilem Wasser verdünnen.

Matrix Aufbringung bei Objektträgern: (w/Cover permanox slids sterile; *177445, nunc LAB_TEK Brand Products)

- Kammer mit sterilem dd H₂O 2x waschen
- 150 µl Matrix Lösung in jede Kammer pipettieren und 1h bei 37°C/ 5%CO₂ inkubieren
- Lösung absaugen, mit ddH₂O waschen
- 150 µl Matrix Lösung in jede Kammer pepettieren und 1h bei (37°C/ 5% CO₂) inkubieren im Inkubator
- waschen mit sterilem ddH₂O und gesamte Flüssigkeit absaugen, bis Kammerboden trocken ist.

V.3.Immunohistochemische Färbung von den Schwann-Zellen/ Neuronen Co-Kulturen auf Objektträgern

Bei dieser Fluoreszenzfärbung, die Objektträger ab dem Zeitpunkt der Inkubation mit dem ersten Fluoreszenz-Antikörper nicht mehr direktem Licht aussetzen

- 1x waschen mit PFA 4% 10 min (Fixierung)
- 3x waschen mit PBS, je 5 min
- 1x waschen mit PBS /Triton 0,1% (Permeabilisation)
- 3x waschen mit PBS, je 5 min
- 1x blocken mit 5% normal Pferdeserum/PBS 2h auf Raumtemperatur (RT)
- Inkubation mit 1. Antikörper verdünnt in 1% Triton/PBS über Nacht auf 4°C
- 3x waschen mit PBS, je 5 min
- Inkubation mit 1. Fluoreszenz-Antikörper (ALEXA) 1:1.500 in PBS 1h auf Raumtemperatur (RT)
- 3x waschen mit PBS, je 5 min
- Inkubation mit 2. Antikörper verdünnt in 1% Triton/PBS für 3h auf Raumtemperatur oder wieder über Nacht auf 4°C
- 3x waschen mit PBS, je 5 min
- Inkubation mit 2. Fluoreszenz-Antikörper (ALEXA) 1:1.500 in PBS 1h auf RT
- 2x waschen mit PBS, je 5 min
- entfernen der Kammern vom Objektträger und Objektträger in Glasküvette mit PBS stellen. Verwendete Glasküvette zuvor mit Alufolie umwickelt um Objektträger vor Lichtein-

fall zu schützen.

- Inkubation mit DAPI (20ng/ml) für 6 min
- 3x waschen mit PBS, je 5 min
- versiegeln der Objektträger mit DAKO-Mounting Medium zwischen Objektträger und Deckglas, um die Kanten des Deckglases noch Nagellack auftragen als zusätzlicher Schutz vor dem Austrocknen.

Antikörper Liste für die Doppelfärbungen:

Doppelfärbung:	B-Raf	P0
Antikörper Nummer	Santa Cruz, Sc-9002; Lot #L0606	Novus NB 100-1607
Tier aus dem Antikörper isoliert wurde	rabbit	chicken
Verdünnung	1:200	1:100
Fluoreszenz-Antikörper	Goat anti-rabbit 488	Goat anti-chicken 594
Doppelfärbung:	B-Raf	NF
Antikörper Nummer	Santa Cruz, Sc-9002; Lot #L0606	2835# Cell Signaling
Tier aus dem Antikörper isoliert wurde	rabbit	mouse
Verdünnung	1:200	1:100
Fluoreszenz-Antikörper	chicken anti-rabbit 594	Chicken anti-mouse 488
Doppelfärbung:	NF	MBP
Antikörper Nummer	2837# Cell Signaling	Santa Cruz, SC-13914; Lot #LH0808
Tier aus dem Antikörper isoliert wurde	rabbit	goat
Verdünnung	1:100	1:300
Fluoreszenz-Antikörper	Chicken anti-rabbit 594	Donkey-anti-goat 488

Doppelfärbung:	NF	P0
Antikörper Nummer	2837# Cell Signaling	Novus NB 100-1607
Tier aus dem Antikörper isoliert wurde	rabbit	chicken
Verdünnung	1:100	1:100
Fluoreszenz-Antikörper	Goat anti-rabbit 488	Goat anti-chicken 594

Doppelfärbung:	pERK	P0
Antikörper Nummer	9101# Cell Signaling	Novus NB 100-1607
Tier aus dem Antikörper isoliert wurde	rabbit	chicken
Verdünnung	1:100	1:100
Fluoreszenz-Antikörper	Goat anti-rabbit 488	Goat anti-chicken 594
Doppelfärbung:	pERK	NF
Antikörper Nummer	9101S# Cell Signaling	2835# Cell signalling
Tier aus dem Antikörper isoliert wurde	rabbit	mouse
Verdünnung	1:100	1:100
Fluoreszenz-Antikörper	Chicken anti-rabbit 594	Chicken anti-mouse 488

Puffer und Lösungen:

10xPBS:

80.0 g/L NaCl

2.0g/L KCl

14,4g/L Na₂PO₄

2,4g/L KH₂PO₄

pH-Wert von 7,4 einstellen und Lösung für 1xPBS mit ddH₂O verdünnen, steril filtrieren

V.4. Genotypisierung der Mäuse

Die Mäuse und isolierten Embryonen wurden routinemässig genotypisiert. Dafür wurde ein Gewebestück vom Schwanz oder die Gliedmaßen beim Embryo in 85µl PCR-Tissue-Kit aufgenommen und mit 15µl Proteinase K (Sigma) inkubiert über Nacht bei 55°C. Für die Inaktivierung der Proteinase K die Proben, für 45 Minuten auf 85°C erhitzen.

Genotypisierung des b-raf Alleles via PCR:

Primer 1 und 2 amplifizieren ein 357-bp Fragment des endogenen b-raf Alleles und ein 413-bp Fragment des LoxP Seiten tragenden Alleles. Hingegen amplifizieren Primer 1 und 3 ein 282-bp großes Fragment des b-raf Alles, wenn es die Konversion durchlaufen hat.

Primer und Zyklus Protokoll für diese PCR:

Primer 1: 5'-GCA TAG CGC ATA TGC TCA CA-3'

Primer 2: 5'-CCA TGC TCT AAC TAG TGC TG-3'

Primer 3: 5'-GTT GAC CTT GAA CTT TCT CC-3'

Zyklus Protokoll:

94°C - 4 min gefolgt von 35 Zyklen wobei jeder Zyklus den Verlauf von: 94°C - 45 sec; 52°C - 45 sec; 72°C - 1 min hat; Abschluss der PCR ist mit 1x 72°C -7 min

Genotypisierung des cre Allels via PCR:

In diesem Fall wird durch Primer 1 und 2 ein 1000 bp Fragment des Cre Allels amplifiziert.

Primer 1: 5'-TAA TCG CCA TCT TCC AGC AG 3'

Primer 2: 5'-CAA TTT ACT GAC CGT ACA C 3'

Zyklusprotokoll:

1x 94°C - 4 min gefolgt von 40 Zyklen mit je einem Zyklusverlauf von: 94°C - 45 sec; 58°C - 40 sec; 72°C - 1 min; Beendigung der PCR mit 1x 72°C -5 min

Für die PCR Analyse des Ischiasnervs und der DRG wurden die selben Protokolle genutzt.

V.5. Western-Blot Analyse

Die isolierten Ischiasnerven einer Maus werden in 60µl eiskalten Lysis-Puffer aufgenommen, Lysis-Puffer wie bei Nadra et al. (2007) beschrieben hergestellt. Dem Lysis-Puffer werden kurz vor Verwendung noch 100mM PMSF, 1M NaF, 25x „complete protein inhibitor“ zugesetzt. Gewebe und Lysis-Puffer mit Keramikugeln (1,4mm ø Precellys beated PeqLab cat number 91-PCS-CK14B) in 2mL Eppis (PeqLab cat Number: 91-PCS-TV) geben. Das Gewebe wird unter Verwendung eines Tissue-Homogenisators (2x 6m/s-20sec) homogenisiert, gefolgt von dem Zentrifugieren des Lysates für 20 min bei 20.000g auf 4°C. Danach wird in das Eppi ein Loch mittels einer Nadel gestochen, die so präparierten Eppis werden auf neue Eppis gesteckt und bei 4°C kurz zentrifugiert um das Lysat in das untere Eppi zu befördern. (2,500 rpm; 4 min, Eppendorff Centrifuge 5810R). Dieses ist nötig, da die Lysat Menge so gering ist, dass nach dem ersten Zentrifugieren das gesamte Lysat die Kugeloberflächen als Flüssikeitsfilm umhüllt.

Die so erhaltenen klaren Lysate werden auf ihren Proteingehalt mittels der Bradford Methode (Biorad) bestimmt. Proben werden dann auf die selbe Proteinkonzentration mit 5x Loading Puffer (320mM Tris, 5% SDS, 0,025% Bromphenolblue, 50% Glycerol, pH6,8) und 1x Loading Puffer eingestellt um gleiche Ladevolumina zu erhalten. Dann für 5 min auf 95°C erhitzt und danach können sie auf -20°C gelagert werden.

Für die Western-Blot Analyse werden die Proben erneut 5 min auf 95° C erhitzt und danach über ein 12,5% SDS-PAGE aufgetrennt, unter Verwendung eines Biorad Apparates. Dabei werden folgenden Einstellungen vorgenommen: 60V pro zwei Gele für Stacking gel und nach durchlaufen dieses wird auf 100V pro zwei Gelen für das Separating Gel gestellt; Gele sind bei dieser elektrophoretischen Auftrennung mit 1x Running Puffer umgeben. Für die Proteingröße wird zusätzlich zu den Proben noch ein „prestained marker ProteinLadder“ (Fermentas) aufgetragen. Nach der Auftrennung erfolgt die Übertragung der Proteine auf eine Membran (Amersham) über Elektrophorese, welche mit einem Biorad- Apparat für semi-dry Blotting ermöglicht wird (15 V für 1 Std. auf Raumtemperatur). Dafür wird das Blotting Sandwich mit 3x Cellulose-Papers, 1x Membran, 1x Gel und 3x Cellulose-Papers luftblasenfrei zusammen gesetzt, jeder Bestandteil wird zuvor noch im Semi-dry transfer Puffer gewaschen. Die Übertragung der Proteine auf die Membran kann durch die Ponceau S Färbung überprüft werden, die Proteine werden als rotes Bandenmuster auf der Membran sichtbar.

Die Membranen dieser Blots werden gewaschen und mit primären Antikörpern inkubiert (über Nacht auf 4°C). Danach erfolgt eine weitere Inkubation mit einem Peroxidase-konjugierten sekundären Antikörper. Die Detektion dieses Protein-Antikörperkomplexes erfolgt über ein Chemiluminescence System (Pierce). Genauer Ablauf dieser Prozedur ist wie folgt:

- Ponceau S gefärbte Membran 3x mit TTBS waschen, bis Ponceau S entfernt ist
- Blocken der Membran mit 5%Milch/TTBS für 1 Std. auf RT
- 3x Waschen mit TTBS, je 5 min
- Inkubation mit erstem Antikörper (1.) über Nacht auf 4°C, wobei der Antikörper in 3%BSA/TTBS verdünnt wird
- 3x Waschen mit TTBS, je 5 min
- Inkubation mit zweitem Antikörper (anti-rabbit 1:4.000, anti-mouse 1:2.500, anti-goat 1:10.000) verdünnt in 5%Milch /TTBS für 1 Std. auf RT
- 3x Waschen mit TTBS, je 5 min
- Inkubieren mit ECL Detektionslösung für 1 min auf RT
- Entwicklung im Photolabor mit Hypersensitiv Filmen (Amersham)

Antikörper-Liste:

1. Antikörper	Wirtstier	Verdünnung	Firma	Cat-No.	Größe des Proteins
B-Raf	Rabbit	1:250	Santa Cruz	Sc-9002	95 kDa
Tubulin	mouse	1:10.000	Sigma		55kDa
pERK	rabbit	1:500	Cell Signaling	#9101S	42/ 44kDa
MBP	goat	1:1.000	Santa Cruz	SC-13914	11/18/21 kDa
NF	mouse	1:1.000	Cell Signaling	#2835	70 kDa
P0	goat	1:1.600	Novus Biologicals	NB 100-94909	28 kDa
PMP22	rabbit	1:500	Novus Biologicals	NBP1-19427	22 kDa
Connexin 32	mouse	1:200	Santa Cruz	SC-59948	32,5 kDa
S100	mouse	1:200	Santa Cruz	SC-58841	21 kDa
Krox20	rabbit	1:250	Covance	LN# 14940802	48 kDa
NF	rabbit	1:100	Cell Signaling	#2837	70 kDa

Puffer und Lösungen:

Lysis-Puffer:

TritonX-100 1%

SDS 0,1%

20mM Na₂H₂PO₄

250mM NaCl

Fill up with ddH₂O to 100mL

4% Stacking gel:

0,5M Tris-HCl; pH6,7

10% SDS

30% Acrylamide/N^c, N^c-Bismethyleneacrylamide

10 % TEMED

10% APS

12,5% Separating gel:

1,5M Tris-HCl; pH8,8

10% SDS

30% Acrylamide/N^c, N^c-Bismethyleneacrylamide

10 % TEMED

10% APS

1x Running Puffer:

25mM Tris

250mM Glycine,

0,1% SDS

Semi-dry transfer Puffer for 500mL:

50mL 1x Running Puffer

100mL Methanol

350 mL ddH₂O

Ponceau S Lösung:

3g Trichloracetic acid (Merck)

0,2g Ponceaus S (Serva)

add ddH₂O until 100mL

10xTBS (Tris buffered saline)

250mM Tris Base

1,5M NaCl

TTBS:

100mL 10xTBS

0,2% TWEEN

Add H₂O bidest to 1000mL

V.6. Elektronenmikroskopische Untersuchung

Die elektronenmikroskopischen Bilder sowie die Präparatherstellung für diese Untersuchung wurden in Zusammenarbeit mit Ingrid Walter von der Wiener Universität für Veterinär Medizin angefertigt.

Dafür wurden die Gewebeproben der folgenden Prozedur unterzogen. Gewebe in 3% Glutaraldehyde in 0,1M Sorensen Phosphat-Puffer, pH= 7.4, auf 4°C fixieren. Danach werden die Präparate mit Phosphat-Puffer gewaschen und eine Nachfixierung für 2h auf Raumtemperatur (RT) in 1% Phosphat-Puffer Osmium Tetraoxid vorgenommen, gefolgt von einem mehrmaligen Waschen mit Phosphat-Puffer. Danach wird das Präparat über eine Gradienten-Reihe von Ethanol Lösungen dehydriert. Nachfolgend kommt eine Behandlung mit Propylen Oxid, gefolgt von einer Inkubation mit verschiedenen konzentrierten Epoxy-Resin-Propylen-Azid Lösungen (1:1; 3:1) bis hin zum reinen Resin. Dann erfolgt ein zweimaliges Wechseln der reinen Resin Lösung und anschließend die Polymerisierung bei 60°C. Ultradünne Präparatschnitte von 70 nm Dicke wurden angefertigt. Diese wurden anschließend mit Alkalin-Blei-Zitrat und Methanol-Uranylacetat gefärbt. Verwendetes Elektronen Mikroskop war Zeiss, EM900 (Oberkochen, Germany).

VI. Referenzen

Ambrosini G et al.; Sorafenib inhibits growth and mitogen-activated protein kinase signaling in malignant peripheral nerve sheath cells.; Ambrosini G, Cheema HS, Seelman S, Teed A, Sambol EB, Singer S, Schwartz GK.; Mol Cancer Ther. 2008 Apr;7(4):890-6.

Ammoun S et al.; Dissecting and targeting the growth factor-dependent and growth factor-independent extracellular signal-regulated kinase pathway in human schwannoma.; Ammoun S, Flaiz C, Ristic N, Schuldt J, Hanemann CO.; Cancer Res. 2008 Jul 1;68(13):5236-45.;

Arroyo E. et al.; On the molecular architecture of myelinated fibers.; Arroyo EJ, Scherer SS.; Histochem Cell Biol. 2000 Jan;113(1):1-18.

Bivona T. et al.; Ras pathway signaling on endomembranes. Bivona TG, Philips MR.; Curr Opin Cell Biol. 2003 Apr;15(2):136-42. Review.

Bronner-Fraser M.; Neural crest cell formation and migration in the developing embryo. Bronner-Fraser M.; FASEB J. 1994 Jul;8(10):699-706.

Campbell N. et al.: Biologie, Campbell NA, Reece JB; 6 Edition Spectrum Verlag 2003: 1228-12241,

Dibb N. et al.: Switching on kinases: oncogenic activation of BRAF and the PDGFR family.; Dibb NJ, Dilworth SM, Mol CD.; Nat Rev Cancer. 2004 Sep;4(9):718-27.

Galabova-Kovacs G. et al.: Essential role of B-Raf in ERK activation during extraembryonic development.; Galabova-Kovacs G, Matzen D, Piazzolla D, Meissl K, Plyushch T, Chen AP, Silva A, Baccarini M.; Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Jan 31;103(5):1325-30. Epub 2006 Jan 23.

Galabova-Kovacs G. et al.: Essential role of B-Raf in oligodendrocyte maturation and myelination during postnatal central nervous system development.; Galabova-Kovacs G, Catalanotti F, Matzen D, Reyes GX, Zezula J, Herbst R, Silva A, Walter I, Baccarini M.; J Cell Biol. 2008 Mar 10;180(5):947-55.

Garbay B et al.; Trembler as a mouse model of CMT1A?; Garbay B, Salles J, Knoll A, Boiron-Sargueil F, Heape AM, Bonnet J, Cassagne C.; Ann N Y Acad Sci. 1999 Sep 14;883:262-72.

Grabay B. et al.; Myelin synthesis in the peripheral nervous system.; Garbay B, Heape AM, Sargueil F, Cassagne C.; Prog Neurobiol. 2000 Jun;61(3):267-304.

Haigh J. Et al: Cortical and retinal defects caused by dosage-dependent reductions in VEGF-A paracrine signaling.; Haigh JJ, Morelli PI, Gerhardt H, Haigh K, Tsien J, Damert A, Mi-

querol L, Muhlner U, Klein R, Ferrara N, Wagner EF, Betsholtz C, Nagy A.; *Dev Biol.* 2003 Oct 15;262(2):225-41.

Harada T et al.: ERK induces p35, a neuron-specific activator of Cdk5, through induction of Egr1.; Harada T, Morooka T, Ogawa S, Nishida E.; *Nat Cell Biol.* 2001 May;3(5):453-9.

Jennemann R et al.: [Cell-specific deletion of glucosylceramide synthase in brain leads to severe neural defects after birth]; Jennemann R, Sandhoff R, Wiegandt H, Gröne HJ.; *Verh Dtsch Ges Pathol.* 2006;90:193-202. German.

Jessen K, Mirsky R.: The origin and development of glial cells in peripheral nerves.; Jessen KR, Mirsky R.; *Nat Rev Neurosci.* 2005 Sep;6(9):671-82.

Jessen K. ; Glial cells.; Jessen KR.; *Int J Biochem Cell Biol.* 2004 Oct;36(10):1861-7.

Kao SC et al.; Calcineurin/NFAT signaling is required for neuregulin-regulated Schwann cell differentiation.; Kao SC, Wu H, Xie J, Chang CP, Ranish JA, Graef IA, Crabtree GR.; *Science.* 2009 Jan 30;323(5914):651-4.

Klein R. Et al.; B-Raf regulation of Rnd3 participates in actin cytoskeletal and focal adhesion organization.; Klein RM, Spofford LS, Abel EV, Ortiz A, Aplin AE.; *Mol Biol Cell.* 2008 Feb;19(2):498-508. Epub 2007 Nov 28.

Kolch W.; Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions.; Kolch W.; *Biochem J.* 2000 Oct 15;351 Pt 2:289-305.

Kursula P.; Structural properties of proteins specific to the myelin sheath.; Kursula P.; *Amino Acids.* 2008 Feb;34(2):175-85. Epub 2006 Dec 22.

Lee M et al.; P0 is constitutively expressed in the rat neural crest and embryonic nerves and is negatively and positively regulated by axons to generate non-myelin-forming and myelin-forming Schwann cells, respectively.; Lee M, Brennan A, Blanchard A, Zoidl G, Dong Z, Taberner A, Zoidl C, Dent MA, Jessen KR, Mirsky R.; *Mol Cell Neurosci.* 1997;8(5):336-50.

Maier M et al.; Understanding Schwann cell-neurone interactions: the key to Charcot-Marie-Tooth disease? Maier M, Berger P, Suter U.; *J Anat.* 2002 Apr;200(4):357-66.

Maurel P. et al.: Axonal regulation of Schwann cell proliferation and survival and the initial events of myelination requires PI 3-kinase activity.; Maurel P, Salzer JL.; *J Neurosci.* 2000 Jun 15;20(12):4635-45.;

Mikula M et al.: Embryonic lethality and fetal liver apoptosis in mice lacking the c-raf-1 gene.; Mikula M, Schreiber M, Husak Z, Kucerova L, R  th J, Wieser R, Zatloukal K, Beug H, Wagner EF, Baccarini M. *EMBO J.* 2001 Apr 17;20(8):1952-62.

Mirsky R. et al.; Novel signals controlling embryonic Schwann cell development, myelination and dedifferentiation.; Mirsky R, Woodhoo A, Parkinson DB, Arthur-Farraj P, Bhaskaran A, Jessen KR.; J Peripher Nerv Syst. 2008 Jun;13(2):122-35.

Piao ZX. et al.; Autophagy of neuron axon during regeneration of rat sciatic nerves; Piao ZX, Wang WS, Xu XJ, Wang QW, Huo X, Han MH, Piao YJ.; Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao. 2004 Apr;24(4):361-4.

Pritchard CA. et al.; Post-natal lethality and neurological and gastrointestinal defects in mice with targeted disruption of the A-Raf protein kinase gene.; Pritchard CA, Bolin L, Slattery R, Murray R, McMahon M.; Curr Biol. 1996 May 1;6(5):614-7.

Quarles R. ; Comparison of CNS and PNS myelin proteins in the pathology of myelin disorders.; Quarles RH.; J Neurol Sci. 2005 Feb 15;228(2):187-9. Epub 2004 Dec 1.

Quarles R. ; Myelin sheaths: glycoproteins involved in their formation, maintenance and degeneration. Quarles RH. Cell Mol Life Sci. 2002 Nov;59(11):1851-71.

Sherman D. et al.; Mechanisms of axon ensheathment and myelin growth.; Sherman DL, Brophy PJ.; Nat Rev Neurosci. 2005 Sep;6(9):683-90.

Taylor M. et al.: Physiological Notch signaling promotes gliogenesis in the developing peripheral and central nervous systems.; Taylor MK, Yeager K, Morrison SJ.; Development. 2007 Jul;134(13):2435-47. Epub 2007 May 30.

Tronche F. Et al.; Disruption of the glucocorticoid receptor gene in the nervous system results in reduced anxiety.; Tronche F, Kellendonk C, Kretz O, Gass P, Anlag K, Orban PC, Bock R, Klein R, Schütz G.; Nat Genet. 1999 Sep;23(1):99-103.

Wellbrock C. et al.; The RAF proteins take centre stage.; Wellbrock C, Karasarides M, Marais R.; Nat Rev Mol Cell Biol. 2004 Nov;5(11):875-85.

Wiese C et al.: Nestin expression--a property of multi-lineage progenitor cells? Wiese C, Rolletschek A, Kania G, Blyszczuk P, Tarasov KV, Tarasova Y, Wersto RP, Boheler KR, Wobus AM.; Cell Mol Life Sci. 2004 Oct;61(19-20):2510-22.

Wojnowski L et al.: Endothelial apoptosis in Braf-deficient mice.; Wojnowski L, Zimmer AM, Beck TW, Hahn H, Bernal R, Rapp UR, Zimmer A.; Nat Genet. 1997 Jul;16(3):293-7.

Wojnowski L et al.: Craf-1 protein kinase is essential for mouse development.; Wojnowski L, Stancato LF, Zimmer AM, Hahn H, Beck TW, Lerner AC, Rapp UR, Zimmer A.; Mech Dev. 1998 Aug;76(1-2):141-9.

Wojnowski L. et al.: Overlapping and specific functions of Braf and Craf-1 proto-oncogenes during mouse embryogenesis.; Wojnowski L, Stancato LF, Larner AC, Rapp UR, Zimmer A.; Mech Dev. 2000 Mar 1;91(1-2):97-104.

VII. Lebenslauf

VII.1. Persönliche Daten:

Name: Christine Wasinger
Geburtsdatum: 04.12.1982
Geburtsort: Mödling
Wohnort: 2380 Perchtoldsdorf
Nationalität: Österreich

VII.2. Ausbildung:

1989-1993: Volksschule, Maria Enzersdorf
1993-2002: Realgymnasium mit Schwerpunkt Darstellender Geometrie
(Biondegasse Baden)
Juni. 2002: Matura
3/2003-4/2010: Studium der Biologie, Studienzweig Mikrobiologie/Genetik
mit Schwerpunkt Immunologie und Neurobiologie
9/2008-3/2010: Diplomarbeit, Max F. Perutz Laboratorien der Universität Wien,
Betreuerin Univ.-Prof. Manuela Baccarini &
Dr. Gergana Galabova-Kovacs