

1. Gutachter: Prof. Dr. Hans Werner Müller
2. Gutachter: Prof. Dr. Ulrich Rüther
Tag der mündlichen Prüfung: 27.04.04

**Interaktion der peripheren Myelinproteine
PMP22 und P0**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Birgit Hasse

aus Hilden

Düsseldorf, 2003

1	Einleitung.....	1
1.1	Das Myelin des peripheren Nervensystems	1
1.2	Das Periphere Myelin Protein 22 kD (PMP22).....	3
1.3	Das Myelin Protein Zero (P0)	5
1.4	Charcot-Marie-Tooth (CMT) Typ 1, verwandte Neuropathien und deren assoziierte Gene PMP22 und P0.....	7
1.5	Ziele.....	10
2	Material und Methoden.....	12
2.1	Material	12
2.1.1	Zentrifugen.....	12
2.1.2	Häufig verwendete Puffer und Lösungen.....	12
2.1.3	Tiere.....	13
2.2	Methoden	13
2.2.1	Primersequenzen für Polymerasekettenreaktion (PCR) und Nukleinsäuresequenzierungen.....	13
2.2.2	Mutagenese von DNA mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)	14
2.2.3	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	15
2.2.4	Dephosphorylierung.....	15
2.2.5	Ligation	16
2.2.6	Transformation durch Hitzeschock und Kälteschock	16
2.2.7	DNA-Isolierung aus Bakteriensuspension.....	17
2.2.8	DNA-Sequenzierung	17
2.2.9	Reverse Transkription.....	18
2.2.10	Aufreinigung von Myelin aus Ischiasnerven der Ratte	18
2.2.11	Protein-Extraktion aus Myelin und transient transfizierten HeLa-Zellen mit Detergenz	19
2.2.12	Cholesterin-Extraktion aus Myelin und transient transfizierten HeLa-Zellen	19
2.2.13	Dichte-Gradienten-Zentrifugation mit Saccharose	19
2.2.14	Immunpräzipitation.....	20

2.2.15	Proteinbestimmung und Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	20
2.2.16	Westernblot.....	21
2.2.17	Überexpression und Aufreinigung von GST-Fusionspeptiden	22
2.2.18	Präzipitation mit GST-Fusionspeptiden.....	23
2.2.19	Biotinylierung von Zelloberflächenproteinen	23
2.3	Zellkultur-Methoden.....	24
2.3.1	Zellkultur von HeLa-Zellen	24
2.3.2	Transiente Transfektion von HeLa-Zellen	24
2.3.3	Retrovirale Transduktion von HeLa-Zellen.....	25
2.4	Bestimmung der Zell-Adhäsion.....	25
2.5	Bestimmung der Zell-Adhäsion an GST-Fusionspeptide.....	26
3	Ergebnisse.....	28
3.1	Die peripheren Myelinproteine PMP22, P0 und Plasmolipin sind lokalisiert in Lipid Rafts	28
3.1.1	Detergenzlöslichkeit bei 4 °C	28
3.1.2	Detergenzlöslichkeit bei 37 °C	30
3.1.3	Entzug von Cholesterin.....	31
3.1.4	Detergenzlöslichkeit und Entzug von Cholesterin in transient transfizierten HeLa-Zellen	32
3.2	PMP22 und P0 bilden Komplexe in Lipid Rafts	34
3.3	Produktion von stabil transduzierten HeLa-Zellen	36
3.4	Zell-Adhäsionstest.....	37
3.5	PMP22 und P0 bilden adhäsive trans-homophile und trans–heterophile Zell-Zell-Interaktionen.....	40
3.6	Klonierung, Expression und Aufreinigung von GST-Fusionspeptiden	44
3.6.1	Unterschiedliche Bindungseigenschaften der extrazellulären Domänen von PMP22	47
3.6.2	Detektion von direkten homophilen und heterophilen Protein-Interaktionen	53
3.6.3	Mutationen in der extrazellulären Domäne von P0 beeinträchtigen die homophilen und heterophilen Interaktionen von P0 und PMP22	55

4	Diskussion	59
4.1	Die homophilen und heterophilen adhäsiven trans-Interaktionen von PMP22 und P0	60
4.2	Der Einfluss von Glykosylierungen auf die homophilen und heterophilen adhäsiven trans-Interaktionen von PMP22 und P0.....	62
4.3	Der Einfluss von Krankheits-assoziierten Mutationen auf die adhäsive heterophile und homophile trans-Interaktion von P0 und PMP22.....	64
4.4	Der Einfluss von Lipid Rafts auf die Verteilung, den Aufbau und die Protein-Interaktionen im peripheren Myelin.	67
5	Zusammenfassung	74
6	Literatur	76
7	Abkürzungen	94
8	Danksagung	96

1 Einleitung

1.1 Das Myelin des peripheren Nervensystems

Das Nervensystem der Vertebraten ist unterteilt in das zentrale Nervensystem (ZNS), bestehend aus Gehirn und Rückenmark und das periphere Nervensystem (PNS), bestehend aus den sogenannten Nervenknotten oder Ganglien und den peripheren Nerven, die außerhalb von Gehirn und Rückenmark verlaufen. Die beiden Systeme sind zwar anatomisch getrennt, aber funktionell miteinander verbunden. Gemeinsam ist beiden eine hohe Nervenleitungsgeschwindigkeit und Informationsverarbeitung. Diese Effektivität wird zum einen durch die hohe Verschaltung der Nervenzellen untereinander erreicht und zum anderen durch eine hohe Geschwindigkeit der Informationsweiterleitung über relativ große Distanzen. Letzteres wird durch die Isolierung von Axonen durch Myelinscheiden bewirkt. Die Isolierung erfolgt dabei im ZNS durch die Oligodendrozyten und im PNS durch die Schwannzellen. Da in der vorliegenden Arbeit vornehmlich an Myelinproteinen des PNS gearbeitet wurde, soll im Folgenden nur auf periphere Myelinproteine eingegangen werden. Zu Beginn der Myelinogenese nehmen myelinisierende Schwannzellen einen 1:1 Kontakt zu Axonen auf und umwickeln diese, indem sich Zytoplasmafortsätze der Schwannzellen spiralenförmig um die Axone schieben (Garbay et al., 2000). Gleichzeitig kommt es durch die Aneinanderlagerung der Innenseiten des Zytoplasmas und der Außenseiten der extrazellulären Membranoberflächen zur Kompaktierung der Myelinscheide und zur Ausbildung der „Major Dense Lines“ (MDL, Innenseite) und „Intra Period Lines“ (IPL, Außenseite). Die periphere Myelinscheide besteht aus etwa 100 Lagen dieser kompaktierten Membranlamellen (Lemke, 1993). Die Myelinisierung ermöglicht die schnelle saltatorische Erregungsleitung, welche ausschließlich an regelmäßig wiederkehrenden Einschnürungen stattfindet, den sogenannten „Ranvier`schen Schnürringen“. Den myelinisierten Abschnitt eines Axons bezeichnet man als Internodium (Garbay et al., 2000). Molekular setzt sich die Myelinscheide aus Lipiden und einer Reihe spezialisierter Proteine zusammen (Abb. 1).

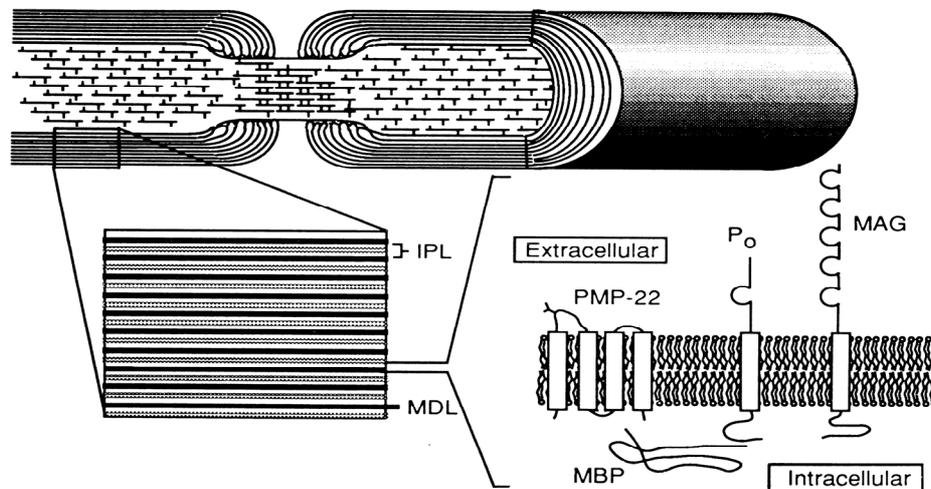


Abbildung1: Schematische Darstellung des Aufbaus der Myelinscheide.

IPL: Intra Period Line, MDL: Major Dense Line, PMP22: Peripheres Myelinprotein 22 kD, MBP: Myelin Basisches Protein, P0: Myelin Protein Zero und MAG: Myelin Assoziiertes Glykoprotein. Modifiziert nach Suter et al., 1994.

Ein biochemisches Charakteristikum, das Myelin von anderen biologischen Membranen unterscheidet, ist das hohe Lipid-zu-Protein-Verhältnis. Aufgereinigtes Myelin enthält 70-80 % Lipide und nur 20-30 % Proteine (Garbay et al., 2000). Dieser relativ hohe Lipidgehalt der Myelinscheide und die Eigenschaften dieser Lipide fördern die elektrische Isolierung der Axone, die für die saltatorische Impulsfortleitung notwendig ist. Die Hauptkomponente des Lipidanteils bilden die Phospholipide mit einem Anteil von ca. 50 %, das Cholesterin mit ca. 30 % und Glykosphingolipide, wie Galactoceramide und Sulfatide, mit 20 % (Smith und Curtis, 1979). Ein Großteil der Proteine konnte durch die Molekularbiologie identifiziert werden (Lemke und Chao, 1988). Die meisten PNS-Myelinproteine sind Glykoproteine (Shuman et al., 1983), wie das Protein Zero (P0, Lemke und Axel, 1985), das Periphere Myelinprotein 22kD (PMP22, Spreyer et al., 1991), das Myelin-assoziierte Glykoprotein (MAG, Sternberger et al., 1979), das Periaxin (Shuman et al., 1983) und das epitheliale Cadherin (E-Cadherin, Fannon et al., 1995). Aber auch basische Proteine wie das Myelin-basische Protein (MBP, Barbarese et al., 1977; Gilbert et al., 1982; Weise et

al., 1983) und das Fettsäure-Transporterprotein (P2, London, 1971; Trapp et al., 1984) sind im Myelin angereichert. Weitere Proteine die im PNS-Myelin gefunden werden, sind das Connexin 32 (CX32, Bergoffen et al., 1993), die 2,3,-zyklische Nukleotid-3`-phosphodiesterase (CNP, Uyemura et al., 1972) und das Plasmolipin (Gillen et al., 1996).

1.2 Das Periphere Myelin Protein 22 kD (PMP22)

Die PMP22 mRNA wurde durch differentielle Hybridisierung der cDNA-Bibliotheken von regenerierenden Ischiasnerven der Ratte gefunden (Spreyer et al., 1991; Welcher et al., 1991). Die Analyse der korrespondierenden cDNA-Klone ergab das die PMP22-cDNA für ein 160 Aminosäuren langes Glykoprotein von 18 kD Größe kodiert. Die Bindung des L2/HNK1-Zuckerepitops an die extrazelluläre N-Glykosylierungsstelle (Asparagin 41) erhöht das Molekulargewicht des PMP22-Proteins auf 22 kD (Pareek et al., 1993). In *vitro*-Translationsexperimente (Manfioletti et al., 1990) und Computeranalysen weisen PMP22 als ein Transmembranprotein aus, dass die Membran vermutlich viermal durchspannt (Spreyer et al., 1991). Die hypothetische PMP22-Proteinstruktur (Abb. 2) konnte durch Epitopmapping mit spezifischen Antikörpern in rekombinanten HeLa-Zellen bestätigt werden (D`Urso und Müller, 1997). Die PMP22-mRNA ist in verschiedenen Geweben der Ratte exprimiert; die höchste Konzentration wurde in myelinbildenden Schwanzzellen der Ischiasnerven beobachtet (Spreyer et al., 1991; Welcher et al., 1991; Kuhn et al., 1993). Eine Analyse der PMP22-Expression nach Nervenläsion zeigte eine zeitliche Assoziation mit Teilschritten der Nervenregeneration (Spreyer et al., 1991; Snipes et al., 1992). Damit weist PMP22 eine deutliche Ähnlichkeit zu den entsprechenden Zeitverläufen der Expression etablierter Myelinguene, wie z.B. P0 oder das basische Myelinprotein (MBP) auf (Gupta et al., 1988; Griffiths et al., 1989; Mitchell et al., 1990).

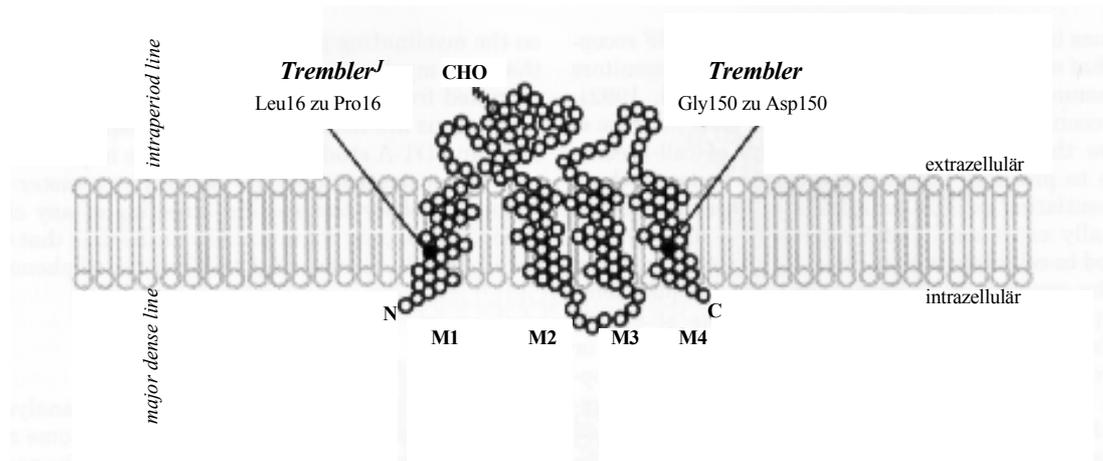


Abbildung 2: Topographisches Modell der PMP22-Proteinstruktur in der Myelinmembran. Die Aminosäureaustausche der beiden Trembler-Mausmutanten sind positionsbezogen dargestellt. M1-M4: putative Transmembrandomänen 1-4; N: Aminoterminus; C: Carboxyterminus; CHO: N-Glykosylierungsstelle. Modifiziert nach GLIA 7:268.

Ergänzend zu diesen Befunden wurde PMP22 im kompakten Myelin peripherer Nerven lokalisiert (Snipes et al., 1992; Kuhn et al., 1993; Pareek et al., 1993), wo es 2-5 % der gesamten PNS Myelinproteine (Pareek et al., 1993) repräsentiert. Das humane PMP22-Gen ist auf Chromosom 17 lokalisiert, dort umspannt es eine Region von ungefähr 40 Kilobasenpaare und enthält 6 Exone (Patel et al., 1992; Suter et al., 1994). Eine ganz ähnliche Organisation weisen das PMP22 Gen in der Maus und in der Ratte auf, wo es auf Chromosom 11 lokalisiert ist. Die Expression von PMP22 wird durch zwei alternative Promotoren reguliert, die zwei verschiedene Transkriptformen, CD25 (Spreyer et al., 1991) und SR13 (Welcher et al., 1991) kontrollieren. Diese Isoformen unterscheiden sich nur in ihrem 5'-untranslatierten Bereich, kodieren aber ein identisches Protein (Bosse et al., 1994; Suter et al., 1994).

Unabhängig von der Bedeutung bei der Regeneration und Myelinisierung peripherer Nerven wurde PMP22 von Manfioletti (1990) als ein Gen beschrieben, das bei der Wachstumskontrolle von Zellen eine Rolle spielt. Die mRNA wird verstärkt von

solchen NIH3T3-Fibroblasten exprimiert, die sich durch Serumentzug oder Kontaktinhibition in der Ruhephase des Zellzyklus (G_0 -Phase) befinden (Schneider et al., 1988; Manfioletti et al., 1990). Aus diesem Grund wurde der PMP22-cDNA-Klon der Maus ursprünglich mit gas3 (growth-arrest-specific Klon3) bezeichnet. In *vitro*-Untersuchungen an PMP22 überexprimierenden Schwanzzellen unterstützen die Hypothese einer mit der Zelldifferenzierung assoziierten Funktion von PMP22. Weitere Untersuchungen lassen vermuten, dass PMP22 eine Rolle in der Regulation von anderen zellulären Funktionen, einschließlich Apoptose, Proliferation, Zellform und Zellausdehnung (Bosse et al., 1994; Fabbretti et al., 1995; Zoidl et al., 1995; Brancolini et al., 1999; Brancolini et al., 2000) spielt.

1.3 Das Myelin Protein Zero (P0)

Die P0-cDNA kodiert für ein 219 Aminosäuren langes Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 28 kD. Die Bindung des L2/HNK1- oder L3-Zuckerepitops an die extrazelluläre N-Glykosylierungsstelle (Asparagin 93) erhöht das Molekulargewicht des P0-Proteins auf 30 kD (Bollensen und Schachner, 1987; Voshol et al., 1996). Die Computeranalysen der cDNA weisen P0 als ein Transmembranprotein aus, das die Membran einmal durchspannt (Lemke und Axel, 1985) und klassifizieren P0 als ein Protein der Immunglobulin-Superfamilie aufgrund von Sequenzähnlichkeiten zu anderen Mitgliedern dieser Proteinfamilie (Lemke et al., 1988). Das P0-Protein besitzt ein abspaltbares Signalpeptid von 30 Aminosäuren (As). Durch in *vitro*-Translationsexperimente und Markierungen mit immunzytochemischen Reagenzien konnte gezeigt werden, dass die 124 As lange N-terminale Domäne von P0 extrazellulär liegt, und durch ein 26 As langes Membransegment von der 69 As langen C-terminalen Region getrennt wird, die zytoplasmatisch liegt (D'Urso et al., 1990). Natives P0 bildet in der extrazellulären Domäne eine Disulfidbrücke zwischen Cystein 21 und Cystein 98, welche zur Stabilisierung der Immunglobulin-Domäne dient. Die topologische Orientierung von P0 in der Membran ist in Abbildung 3 gezeigt. Die P0-mRNA konnte sowohl in Zellen der Neuralleiste (neural crest), als auch in Schwanzzell-Vorläufern und embryonalen Schwanzzellen

der Ratte detektiert werden (Zhang et al., 1994; Lee et al., 1997; Lee et al., 2001). Das P0-Gen wird darüber hinaus auch in embryonalen Geweben des Inneren Ohrs und in „olfactory ensheathing cells“ (Lee et al., 2001) exprimiert. Die stärkste Expression von mRNA und Protein konnte allerdings in myelinisierenden Schwanzzellen beobachtet werden (Brockes et al., 1980; Trapp et al., 1981; Martini et al., 1986).

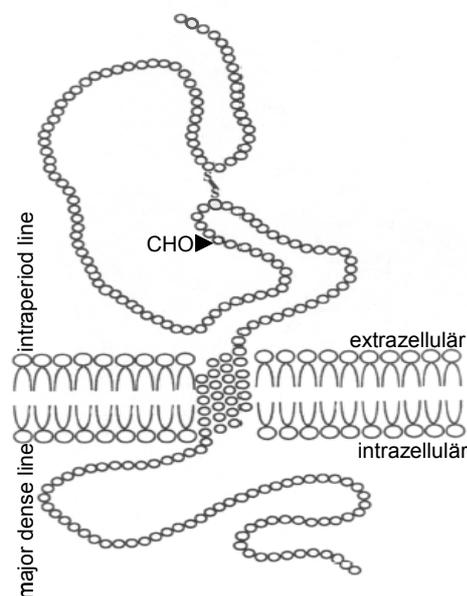


Abbildung. 3: Topographisches Modell der P0-Proteinstruktur

Das P0-Protein besitzt eine hydrophobe Transmembrandomäne mit α -Helix Struktur. Der N-Terminus, der auch die immunoglobulinartige Domäne bildet und durch eine Disulfidbrücke stabilisiert wird, liegt auf der extrazellulären Seite. Der C-Terminus liegt auf der zytosolischen Seite. CHO: N-Glykosylierungsstelle. Abbildung modifiziert nach Filbin et al. 1993.

Während der Schwanzzell-Entwicklung wird P0 gleichzeitig mit anderen Myelinproteinen, wie PMP22 und MBP induziert (Lemke und Chao, 1988). Die Hochregulation von P0 setzt mit dem Beginn der Myelinisierung ein und wird anscheinend durch Signale, die mit der Oberfläche von Axonen assoziiert sind, gesteuert (Lemke und Chao, 1988). Das P0-Protein ist im kompakten Myelin lokalisiert, wo es 50-70 % des gesamten Proteinanteils ausmacht und somit das

dominierende Protein des PNS darstellt (Greenfield et al., 1973; Wiggins et al., 1975; Smith et al., 1979; Lemke et al., 1988). Das P0-Gen ist bei den Spezies Mensch, Maus und Ratte auf dem Chromosom 1 lokalisiert und ist ungefähr 7 Kilobasenpaare groß (Kuhn et al., 1990; Hayasaka et al., 1993). Aminosäuresequenzvergleiche zwischen den Spezies Mensch, Huhn und Ratte zeigen eine Homologie von über 80 % (Sakamoto et al., 1987). Eine Vielzahl an Experimenten lässt vermuten, dass P0 für den Erhalt und die sehr dichte Kompaktierung der Myelinstruktur durch Ausbildung von Interaktionen zwischen der extrazellulären und der zytoplasmatischen Domäne verantwortlich ist (D'Urso et al., 1990; Giese et al., 1992; Wong und Filbin, 1994).

1.4 Charcot-Marie-Tooth (CMT) Typ 1, verwandte Neuro- pathien und deren assoziierte Gene PMP22 und P0

Das Charcot-Marie-Tooth-Syndrom beschreibt eine genetisch und klinisch heterogene Gruppe von hereditären peripheren Neuropathien, die mit einer Häufigkeit von 1:2500 auftreten (Skre et al., 1974). Bei der Mehrheit der CMT-Erkrankungen liegt die demyelinisierende CMT-Form vom Typ 1A vor (Lupski et al., 1991). Dabei handelt es sich um eine Neuropathie mit autosomal dominantem Erbgang. Erste klinische Symptome treten innerhalb der ersten beiden Lebensdekaden mit einer distal an den Beinen beginnenden Muskelatrophie, nachfolgender Parese und abgeschwächten Eigenreflexen auf. Deutlich verlangsamte Nervenleitgeschwindigkeiten und tastbare Verdickungen an den Nervenbahnen sind Anzeichen einer hypotrophen Veränderung der peripheren Nerven. Histopathologisch beobachtet man eine Erweiterung des endoneuralen Interstitiums, chronische Demyelinisierung und Remyelinisierung. Vermehrte Bildung von Schwannzellen und Basalmembran verursachen eine charakteristische zwiebelschalenartige Struktur (Dyck et al., 1992; Lupski et al., 1992). Der Verlauf dieser Erkrankung ist nur langsam progredient.

Die meisten CMT1A-Patienten tragen eine ca. 1,5 Mb große Duplikation des Chromosom 17 im Bereich der Bande p11.2, einer Region, in der das PMP22-Gen

mit allen seinen regulatorischen Elementen lokalisiert ist. Diese Patienten besitzen also eine zusätzliche Kopie des PMP22-Gens (Matsunani et al., 1992; Patel et al., 1992; Timmermann et al., 1992; Valentijn et al., 1992). Es wurden aber auch sporadische Mutationen im humanen PMP22-Gen gefunden, die zu einem CMT1A-Phänotyp führen (McKusick, 1994).

Eine Deletion des PMP22-Gens auf Chromosom 17 verursacht eine weitere autosomal dominant vererbte Neuropathie, die „Hereditäre Neuropathie mit Neigung zu Drucklähmungen“ (HNPP) (Chance et al., 1993). Hierbei handelt es sich um eine episodisch wiederkehrende Neuropathie (Windebank, 1992), die aufgrund einer druckinduzierten segmentalen Demyelinisierung der Nerven zu Schwäche, Taubheit und Muskelatrophie in den distalen Extremitäten führt.

Als Tiermodell für die CMT-Erkrankung galt bereits längere Zeit die natürliche Mausmutante *Trembler*, deren neurologischer Defekt zu einem ähnlichen Phänotyp führt. Die *Trembler*-Mutation wird in diesen Mäusen dominant vererbt und zeichnet sich durch eine Hypomyelinisierung des peripheren Nervensystems und einen generalisierten Tremor aus. Suter und Mitarbeiter konnten in diesen Mäusen eine Punktmutation nachweisen, die zu einem Aminosäureaustausch in einer Transmembranregion des PMP22-Genproduktes (Glycin150 \Rightarrow Asparagin; Abb.2) führt (Suter et al., 1992b). Auch in *Trembler*^d-Mäusen konnte eine Punktmutation in einer Transmembran-domäne des PMP22-Gens (Leucin \Rightarrow Prolin; Abb.2) nachgewiesen werden (Suter et al., 1992a). Diese Mutante zeichnet sich durch De- und Remyelinisierung, sehr dünn myelinisierte Axone und veränderte Schwanzzellproliferation aus (Notterpek et al., 1997). Die *Trembler*-Mutation wurde auch in zwei Patienten gefunden, deren Phänotyp dem Dejerine-Sottas-Syndrom (DSS) gleicht (Ionasescu et al., 1997). Bei der DSS und der Congenitalen Hypomyelinisierung (CH) handelt es sich um verwandte demyelinisierende Neuropathien. Die klinischen und pathologischen Symptome der DSS und CH stimmen weitgehend mit denen der CMT1-Neuropathie überein, allerdings setzt die Erkrankung früher ein und hat einen schwerwiegenderen Verlauf (Dyck et al., 1992; Warner et al., 1996). Es konnten bisher mehrere Mutationen sowohl im PMP22-Gen (Roa et al., 1993a; Ionasescu et al., 1995; Valentijn et al., 1995), als auch im P0-Gen

(Hayasaka et al., 1993b; Rautenstrauß et al., 1994) gefunden werden, die zu einer Erkrankung an DSS oder CH führen. Die meisten Mutationen im P0-Gen führen gewöhnlich aber zu einem typischen CMT1A-Phänotyp wie er für PMP22-Mutationen beschrieben wurde (De Jonghe et al., 1997), werden aber als CMT1B klassifiziert (Bird et al., 1982; Patel und Lupski, 1994). Aufgrund der Assoziation des PMP22-Gens und des P0-Gens mit diesen Erkrankungen wurden zahlreiche Transgene Tiermodelle generiert. Die Ischiasnerven von vier Tage alten PMP22-Knock-out-(PMP22^{-/-}) Mäusen (Aldkofer et al., 1995) zeichnen sich durch fokale Hypomyelinisierung (zu stark myelinisierte Axone) aus. Diese Strukturen werden als Tomacullae bezeichnet. In älteren (10 Wochen) Nerven werden dagegen keine Tomacullae-Strukturen mehr gefunden, jedoch Anzeichen einer starken Demyelinisierung (Aldkofer et al., 1995). Heterozygote PMP22-Knock-out-(PMP22^{+/-}) Mäuse zeigen interessanterweise einen ähnlichen aber mildereren Phänotyp, mit fokaler Hypomyelinisierung und nachfolgender Demyelinisierung (Aldkofer et al., 1995, 1997). Die Analyse von Transgenen Mäusen (Magyar et al., 1996; Huxley et al., 1996; Sancho et al., 2001; Norreel et al., 2001) und Ratten (Sereda et al., 1996; Niemann et al., 2000) die PMP22 unter der Kontrolle des eigenen Promotors überexprimieren, zeigen bei einer moderaten Überexpression des PMP22-Gens einen ähnlichen Phänotyp wie bei der humanen CMT1A. Starke Überexpression führt dagegen zu einer fast kompletten Demyelinisierung der peripheren Nerven und ähnelt somit den seltenen Fällen einer homozygoten Duplikation des PMP22-Gens im Menschen (LeGuern et al., 1997). Weiterhin wurden in *vitro*-Modelle, basierend auf der Kultivierung von dorsalen Spinalganglien aus Transgenen PMP22-Tieren etabliert, die der humanen CMT1A ähnliche Myelin-Abnormalitäten zeigen (Nobbio et al., 2001).

Die Analyse der Myelinscheiden von P0-Knock-out-(P0^{-/-}) Mäusen zeigte, dass die Intra-Period-Lines (IPL, extrazelluläre Grenzschicht zwischen zwei Membranen) nicht ausgebildet werden und stattdessen eine starke Aufweitung des extrazellulären Raums zwischen den IPLs (Giese et al., 1992) zu beobachten ist. Weiterhin konnte eine starke Hypomyelinisierung der Axone sowie axonale Degeneration beobachtet werden (Giese et al., 1992; Martini et al., 1995a). Heterozygote P0-Knock-out-(P0^{+/-})

Mäuse zeigen zu dünn myelinisierte Axone, aufgeweitetes Myelin und verlangsamte Nervenleitungsgeschwindigkeiten, ein Kennzeichen auch einiger humaner P0-Mutationen (Martini et al., 1995a; Gabreels-Festen et al., 1996; Samsam et al., 2002).

Die hier aufgezeigten Genotyp-Phänotyp-Korrelationen von Mensch und transgenen Tieren zeigen zum einen, dass Mutationen in unterschiedlichen Genen zu gleichen Phänotypen führen können, während Mutationen im gleichen Gen zu unterschiedlichen Phänotypen führen können. Zum anderen zeigen sie, dass alle aufgeführten Erkrankungen ein gemeinsames Charakteristikum aufweisen, die starke Beeinträchtigung der Myelinscheide. Diese Befunde unterstützen damit die Vermutung von spezifischen Funktionen der PMP22- und P0-Genprodukte bei der Myelinisierung, aber auch bei dem Erhalt und der Stabilisierung des Myelins. Darüber hinaus wird aus den geschilderten Untersuchungen deutlich, dass sowohl Mutationen in diesen Genprodukten als auch eine veränderte Gendosis eine pathologische Veränderung des peripheren Myelins bewirken.

1.5 Ziele

Ziel dieser Arbeit ist die weitgehende Charakterisierung der Interaktionen der peripheren Myelinproteine PMP22 und P0 unter besonderer Berücksichtigung a) der biologischen Funktion dieser Interaktionen im normalen und pathologischen Zustand und b) des Transports dieser Proteine und des Aufbaues der Myelinmembran.

Für die Charakterisierung der vermuteten Interaktionen der peripheren Myelinproteine PMP22 und P0 sollten, mit Hilfe eines neu etablierten Zell-Adhäsionstests retroviral transduzierte HeLa-Zellpopulationen, die diese Proteine stabil überexprimierten, auf ihre Fähigkeit hin analysiert werden sowohl homophile als auch heterophile adhäsive trans-Interaktionen zu vermitteln. Zur näheren Charakterisierung dieser Interaktionen sollten mögliche Bindungsdomänen dieser Proteine an GST fusioniert, aufgereinigt und auf ihre Adhäsionskapazität hin untersucht werden. Anschließend sollten die beobachteten Interaktionen durch direkte Protein-Protein-Wechselwirkungen in GST-Bindungsstudien verifiziert

werden. In einem weiteren Schritt sollten mögliche Auswirkungen von Krankheits-assoziierten Punktmutationen auf die homo- und heterophilen Bindungen von P0 bzw. P0 mit PMP22 getestet werden. Um neue Erkenntnisse über bestehende Transportmechanismen und den Aufbau der Myelinmembran zu erhalten, sollten zum einen Myelinpräparationen aus den Ischiasnerven von Ratten und zum anderen Protein-Homogenate aus transient transfizierten HeLa-Zellen hergestellt und auf ihre Assoziation mit Lipid Rafts hin untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zentrifugen

Sorvall RC-5B (Dupont, Bad Homburg)
L8-70M und TL-100 (Beckmann, München)
EBA 12R (Eppendorf, Hamburg)
Rotana/R (Hettich, Tuttlingen)

2.1.2 Häufig verwendete Puffer und Lösungen

Phosphat gepufferte Saline (PBS)	50 mM Phosphat pH 7,4 150 mM NaCl
Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan gepufferte Saline (TBS)	20 mM Tris pH 7,4 150 mM NaCl
Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan gepufferte Saline (TNE)	25 mM Tris pH 7,5 150mM NaCl 5 mM EDTA
Proteaseinhibitormix	100µg/ml Pefabloc 1µg/ml Pepstatin 1µg/ml Leupeptin 1µg/ml Aprotinin 5 mM EDTA

Alle verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht gesondert erwähnt, von Sigma (Deisenhofen) oder Merck (Darmstadt) bezogen.

2.1.3 Tiere

Ischiasnerven wurden aus Wistar-Ratten isoliert, die von der Zentralen Tierversuchsanlage (TVA) der Heinrich-Heine-Universität bezogen wurden.

Die Tötung der Tiere erfolgte gemäß dem geltenden Tierschutzgesetz.

2.2 Methoden

2.2.1 Primersequenzen für Polymerasekettenreaktion (PCR) und Nukleinsäuresequenzierungen

In den molekularbiologischen Arbeiten wurden für die Amplifikation der cDNAs, der Nukleinsäurefragmente und für die Sequenzierungen der erzeugten Vektorkonstrukte Oligonukleotidprimer (alle von MWG, Biotech) eingesetzt. Eine Übersicht der Primersequenzen findet sich in Tabelle 1.

Tab. 1: Primer

Aufgelistet sind die verwendeten Primer, ihre Sequenzen und die Experimente, bei denen sie eingesetzt wurden.

Anwendung	Primernamen	Sequenz von 5' nach 3'
Amplifizierung der kodierenden Region von PMP22, P0 und Plasmolipin aus cDNA der Ratte für die Klonierung in den pIRES2-EGFP-Vektor.	Nhe-PMP-sense Kpn-PMP-antisense Nhe-P0-sense Kpn-P0-antisense Xho1-Plapi-sense EcoR1-Plapi-antisense	ACGTGCTAGCCAGCCACCATGCTTCTA ACGTGGTACCGCCTCATTTCGCGTTTC ACGTGCTAGCCCCAGCTATGGCTCCTG ACGTGGTACCGCTATTTCTTATCCTTGCGA TCGTAGGCTCGAGATCGCTATGGCGGAGTT AGCATAGAATTCTTAAGAGTAGCCCCCAGCCA
Sequenzierung der PMP22, P0 und Plasmolipin pIRES2-EGFP-Vektorkonstrukte.	T7 Promotor M13 Reverse	AATACGACTCACTATAGGG CAGGAAACAGCTATGAC
Amplifizierung von Nukleinsäurefragmenten aus cDNAs von PMP22, P0 und Plasmolipin für die Klonierung in den pGEX-4T2-Vektor (GST-Fusions-Vektor).	rPMPex1-for/EcoRI rPMPex1-rev/Sall rPMPex2-for/EoRI rPMPex2-rev/Sall rP0ex-for/EcoRI rP0ex-rev/Sall rPLAex-for/EcoRI rPLAex-rev/Sall	CCAGGAATTCGTAATGGACACAGGACTGAT GCATGTCGACCTAAGACTGAAGCCATTTCGCT CCAGGAATTCGTAGACACAGTGAGTGGCATGTC GCATGTCGACCTAAAAGCCATAGGAGTAGTC CCAGGAATTCGTATTGTGGTTTACACGGAC GCATGTCGACCTAATACCTAGTGGGCAC CCAGGAATTCGTGCCTGGCGGCGGCGGTC GCATGTCGACCTACGAGCGCTGGTTGTACGG
Sequenzierung der PMP22, P0 und Plasmolipin pGEX-4T2-Vektorkonstrukte.	pGEX 5' Sequencing Primer pGEX 3' Sequencing Primer	GGGCTGGCAAGCCACGTTTTGGTG CCGGGAGCTGCATGTGTGTCAGAGG

2.2.2 Mutagenese von DNA mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Amplifikation und Generierung der cDNAs mit gezielt mutierter extrazellulärer Domäne des P0-Proteins erfolgte mittels PCR-Mutagenese. Die folgenden drei verschiedenen Aminosäureaustausche wurden an der extrazellulären Domäne von P0 vorgenommen: Val32Phe (P0mut1), Tyr68Cys (P0mut2) und Cys128Tyr (P0mut3). Eine Übersicht über die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotidprimer zur Herstellung, Anwendung und Sequenzierung der mutierten Vektorkonstrukte findet sich in Tabelle 2. Die gegenüber der Wt-Sequenz substituierten Nukleotide sind unterstrichen.

Tab. 2 Primer zur Mutagenese der P0 cDNA

Aufgelistet sind die verwendeten Primer und ihre Sequenzen, die zur Herstellung und Sequenzierung der mutierten P0-Vektorkonstrukte eingesetzt wurden.

Anwendung	Primernamen	Sequenz 5' nach 3'
Amplifizierung von P0mut1 aus P0-cDNA der Ratte für die Klonierung in den pGEX-4T2-Vektor	sense P0mut1/EcoRI antisense P0mut1/Sall	CCAGGAATTCGTATTGTG <u>I</u> TTTACACGGAC GCATGTCGACCTAATACCTAGTGGGCAC
Amplifizierung von P0mut2 aus P0-cDNA der Ratte für die Klonierung in den pGEX-4T2-Vektor	sense P0mut2-1/EcoRI antisense P0mut2-2 sense P0mut2-3 antisense P0mut2-4/Sall	CCAGGAATTCGTATGTGGTTTACACGGAC AGGCTGGC <u>A</u> GCGCCAGGT TCTTTTACCTGGCGCTG <u>C</u> CAGCCT GCATGTCGACCTAATACCTAGTGGGCAC
Amplifizierung von P0mut3 aus P0-cDNA der Ratte für die Klonierung in den pGEX-4T2-Vektor	sense P0mut3-1/EcoRI antisense P0mut3-2 sense P0mut3-3 antisense P0mut3-4/Sall	CCAGGAATTCGTATGTGGTTTACACGGAC GACATCA <u>I</u> ATGTGAAAGTGCCG CAACGGCACTTTACAT <u>A</u> TGATGTC GCATGTCGACCTAATACCTAGTGGGCAC
Sequenzierung der P0mut1, P0mut2 und P0mut3 pGEX-4T2-Vektorkonstrukte	pGEX 5' Sequencing Primer pGEX 3' Sequencing Primer	GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG CCGGGAGCTGCATGTGTGTCAGAGG

2.2.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

PCRs wurden in Standard-PCR-Reaktionen mit dem AmpliTaq-System (Applied Biosystems) nach folgendem Schema durchgeführt.

5 µl	10fach Puffer	initiale Denaturierung	2 min	95 °C
4 µl	dNTP (2,5 mM je)	25 bis 45 Zyklen		
3 µl	MgCl ₂ (25 mM)	Denaturierung	30s	92 °C
20 µl	ddH ₂ O	Annealing	30s	48°C bis 60°C
5 µl	Primer 1 (20 pmol/µl)	Elongation	45 bis 120s	72 °C
5 µl	Primer 2 (20 pmol/µl)	terminale Elongation	10 min	72 °C
5 µl	DMSO			
0,5 µl	Taq (5 U/µl)			
20 ng	zu amplifizierende DNA			

Die PCR-Amplifikationsprodukte wurden gelelektrophoretisch in 0,8 bis 2,0 %igen Agarosegelen aufgetrennt, fotografiert und gegebenenfalls ausgeschnitten. Eine Aufreinigung erfolgte mittels des QiaexII Kits (Qiagen) oder der Ultrafree-DA Säulchen (Millipore). PCR-Produkte, die zur Klonierung verwendet wurden, wurden anstatt mit AmpliTaq mit vergleichbaren Aktivitätseinheiten an Pfu-Polymerase (Invitrogen) mit Exonukleaseaktivität amplifiziert.

2.2.4 Dephosphorylierung

Mittels Restriktionsenzymen geschnittene Vektoren wurden mit einer Alkalischen Phosphatase (Shrimp Alkali Phosphatase, SAP; Roche) nach Herstellerangaben mit 1 U SAP je pmol DNA-Enden dephosphoryliert, wobei die Anzahl an pmol Enden durch die Formel $\mu\text{g}/\text{kb DNA} \times 3,04$ ermittelt wurde. Die SAP wurde nach Ablauf der Reaktion durch Erwärmen auf 65 °C für 15 min irreversibel denaturiert.

2.2.5 Ligation

PCR-Produkte, die mit einer TA-Überhänge produzierenden DNA-Polymerase erzeugt wurden, wurden nach Herstellerangaben mit Hilfe des TOPO Klonierungssystems (Invitrogen) in den pCR-Vektor kloniert. Solche, die mit einer nicht TA-Überhänge produzierenden DNA-Polymerase generiert wurden, wurden in den pZero-Vektor (Invitrogen) kloniert. Restriktionsfragmente wurden in entsprechend geschnittene und dephosphorylierte Vektoren über den T4 Rapid DNA Ligation Kit (Roche) kloniert. Dabei wurden 400 bis 800 ng DNA-Fragment und 20 bis 40 ng Vektor verwendet.

2.2.6 Transformation durch Hitzeschock und Kälteschock

TOP 10 (Invitrogen) *E.coli* Kulturen wurden auf Eis aufgetaut; 1 bis 4 µl Ligationsansatz wurden hinzugegeben und für 30 min bei 4 °C inkubiert. Der Reaktionsansatz wurde für 45 s auf 42 °C erwärmt, für 2 min auf Eis abgekühlt und mit vorgewärmten 200 µl SOC aufgefüllt. Nach einer Inkubation bei 37 °C für 1 h wurden die Ansätze auf LB-Platten mit einem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

BL21 *E.coli* Kulturen (Amersham Pharmacia) wurden aufgetaut und in 5 ml LB-Medium für 3 h bei 37 °C geschüttelt. Anschließend wurden je 1ml Bakteriensuspension pro Transformationsansatz abzentrifugiert. Die Bakterien-Pellets wurden in 100 µl CaCl₂ (50 mM) resuspendiert und mit 1-10 ng DNA für 30 min bei 4 °C inkubiert. Der Ansatz wurde mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei 37 °C aufgetaut. Nach Zugabe von 900 µl vorgewärmtem SOC wurde der Ansatz 1 h bei 37 °C geschüttelt und anschließend auf entsprechenden LB-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C gelagert.

Einzelne Kolonien wurden mit einem Zahnstocher in 5 ml LB-Medium, versetzt mit geeignetem Antibiotikum, überführt und über Nacht bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Ein Teil der Bakteriensuspension wurde mit einem Volumen Glycerin versetzt und bei -80 °C eingefroren. Der restliche Teil wurde zur Gewinnung von Plasmid-DNA verwendet.

2.2.7 DNA-Isolierung aus Bakteriensuspension

Plasmid-DNA wurde mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kits (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers isoliert und in 30 µl LiCrosolv-Wasser (Merck) gelöst.

2.2.8 DNA-Sequenzierung

Zur Sequenzierung wurde der ABI 310 Genetic Analyzer in Kombination mit dem BigDye Terminator System (Applied Biosystems) verwendet. Die zu sequenzierende DNA wurde, zusätzlich zur gewöhnlichen Aufreinigung, durch Zugabe von 1/10 Volumen Natriumacetat und einem Volumen absolutem Ethanol gefällt, für 25 min bei 14.000 Upm in einer Eppendorff 5417C Tischzentrifuge bei Raumtemperatur abzentrifugiert, mit 70 %igem Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in einem adäquaten Volumen Wasser gelöst. Die Sequenzierungsreaktion erfolgte nach dem Schema:

1,5 µl	Primer (5 pmol/µl)	Initiale Denaturierung	2 min	95°C
1 µl	DMSO	24 Zyklen		
7 µl	Sequenzier-Mix	Denaturierung	30s	92°C
1 µg	DNA	Annealing	30s	54°C
ad 20 µl	H ₂ O	Elongation	4 min	60°C

Nicht eingebaute Nukleotide wurden über DyeEx-Säulchen (Qiagen) entfernt. Fünfzehn µl des Sequenzieransatzes wurden mit 15 µl TSR (Template Suppression Reagent, Applied Biosystems) vermischt, für 2 min bei 92 °C denaturiert und im ABI 310 elektrophoretisch in POP6 Polymer (Applied Biosystems) aufgetrennt und detektiert. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mit Hilfe der Software-Programme Sequencing Analysis 2.1.2 (Applied Biosystems), Sequencher (Gene Codes) sowie den BLASTN Suchdiensten im Internet.

2.2.9 Reverse Transkription

Die RNA aus Ischiasnerven adulter Ratten zur Gewinnung der cDNAs von PMP22, P0 und Plasmalipin wurde von Dr. Patrick Küry (Arbeitsgruppe Molekulare Neurobiologie, Heinrich-Heine-Universität) zu Verfügung gestellt. Die RNA muss vor einer PCR in einer reversen Transkription in cDNA umgeschrieben werden. Die reverse Transkription erfolgte nach dem Schema:

1 µg	RNA	10 min	Raumtemperatur
3 µl	dNTP (2,5 mM je)	1 h	42 °C
1 µl	Oligo(dT) (50 µM)	5 min	99 °C
2 µl	DTT		
10 U	RNAsin		
1 U	Superscript II		
ad 19 µl	ddH ₂ O DEPC		

Jeweils 2 µl der cDNA wurden in wie oben beschriebenen PCRs eingesetzt.

2.2.10 Aufreinigung von Myelin aus Ischiasnerven der Ratte

Die Ischiasnerven adulter Wistar-Ratten wurden entnommen, in ca. 1 cm lange Stücke geschnitten und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Alle weiteren Schritte wurden bei 4 °C durchgeführt. Nach Aufnahme in 0,9 M Saccharoselösung wurde das Gewebe in einem Ultra-Turrax T25 homogenisiert. Das Homogenat wurde 15 min bei 10.000 x g zentrifugiert und der postnukleare Überstand abgenommen. Dieser postnukleare Überstand wurde mit 0,25 M Saccharoselösung überschichtet, um einen einstufigen Dichtegradienten zu erhalten und mit 100.000 x g, 3 h bei 4°C zentrifugiert. Das Myelin wurde von der Interphase der 0,9 M und 0,25 M Saccharoselösungen entnommen und zweimal einem hypoosmotischem Schock unterzogen. Hierzu wurde das Myelin zweimal in 9fachem Volumen eiskalten Wassers resuspendiert und mit einem Douncer-Homogenisator aufgeschlossen und

anschließend mit 8.000 x g abzentrifugiert. Anschließend wurde das Myelin erneut in 0,9 M Saccharoselösung aufgenommen und mit 0,25 M Saccharoselösung überschichtet und 1 h mit 100.000 x g zentrifugiert. Das aufgereinigte Myelin wurde entnommen, erneut zweimal mit eiskaltem Wasser gewaschen, abzentrifugiert, schließlich in wenig Wasser resuspendiert und in Aliquots bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ weggefroren.

2.2.11 Protein-Extraktion aus Myelin und transient transfizierten HeLa-Zellen mit Detergenz

Aufgereinigtes Myelin wurde in 1 ml TNE Puffer + 2 % Triton-X-100 (Merck) und Proteaseinhibitormix aufgenommen und bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ oder $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 30 min auf einem Über-Kopf-Schüttler inkubiert.

Transient Transfizierte HeLa-Zellen wurden dreimal mit PBS gewaschen und anschließend mit 1 ml TNE-Puffer + 1 % Triton-X-100 + Proteaseinhibitormix versetzt und bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ und $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 30 min inkubiert. Die Zellen wurden mit einem Schaber von den Kulturplatten geschabt und durch mehrfaches Aufziehen der Lysate in einer Spritze mit einer 0,6 x 22 mm Nadel bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ homogenisiert.

2.2.12 Cholesterin-Extraktion aus Myelin und transient transfizierten HeLa-Zellen

Für den Cholesterinentzug aus aufgereinigtem Myelin und den Zellmembranen von Transient Transfizierten HeLa-Zellen wurden diese mit 10 mM Methyl- β -Cyclodextrin (β -CD, Sigma) in PBS bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 30 min inkubiert. Nach dieser Vorbehandlung wurde das Myelin und die Zellen mit 13.000 x g für 10 min abzentrifugiert und die Pellets anschließend wie unter 2.3.2 beschrieben der Triton X-100-Extraktion unterzogen.

2.2.13 Dichte-Gradienten-Zentrifugation mit Saccharose

Alle unter 2.3.2 und 2.3.3 beschriebenen Detergenz-Extrakte wurden durch Zugabe von 1 ml 80 %iger Saccharose in TNE-Puffer auf ein Endvolumen von 2 ml 40 %iger

Saccharose eingestellt und in ein Ultrazentrifugenröhrchen (Beckmann, Palo Alto) überführt. Für den Stufengradienten wurde die 40 %ige Saccharose mit 5 ml 30 %iger Saccharose in TNE vorsichtig überschichtet und mit weiteren 5 ml einer 5 %igen Saccharoselösung in TNE beschickt. Die Stufengradienten für die HeLa-Zell-Extrakte bestanden aus 2 ml 40 %, 8 ml 30 % und 2 ml 5 %iger Saccharose in TNE. Die Stufengradienten wurden mit 160.000 x g, 18 h bei 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurden 1 ml Fraktionen von oben nach unten entnommen und mittels SDS-PAGE und Westernblot analysiert.

2.2.14 Immunpräzipitation

Alle Inkubationen fanden bei 4°C auf einem Über-Kopf-Schüttler statt. Die verwendeten Proteinlösungen wurden mit 20 µl Protein-A-Sepharose pro 100 µl für 1 h präadsorbiert. Um unspezifisch an die Sepharose gebundenes Proteinmaterial abzutrennen, wurde 5 min mit 10.000 x g zentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Sepharose verworfen. 200 µl-Aliquots dieser Überstände wurden mit je 10 µl Serum oder aufgereinigtem Antikörper kovalent an Protein-A-Sepharose gebunden und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die kovalente Bindung von Antikörpern an Sepharose erfolgte mittels Vernetzermolekülen, um Signale der leichten und schweren Ketten von Antikörpern zu verhindern. Die gebundenen Immunkomplexe wurden durch einminütige Zentrifugation bei 10.000 x g pelletiert, die Überstände verworfen und dreimal für 5 min mit eiskaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden die Pellets in 40 µl 2 x SDS-Probenpuffer aufgenommen und für 10 min bei 100 °C denaturiert. Die Überstände wurden mittels SDS-PAGE und Westernblot analysiert

2.2.15 Proteinbestimmung und Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteinkonzentrationen wurden mit dem Detergenz-verträglichen DC Protein-Assay von Biorad (München) gemessen. Als Standard wurde Rinder-Immunglobulin verwendet.

Die SDS-PAGE erfolgte, wenn nicht anders erwähnt, in linearen Gradientengelen (5-20 %) nach der Methode von Laemmli (1970) in einer Protean II Gelapparatur (Biorad, 18 x 16 cm Gelformat) oder in einer SE 250 Mighty Small Gelapparatur (Hofer, 10 x 8 cm Gelformat). Die aufgetrennten Proteine wurden mit der Silberfärbungsmethode nach Ansorge (1985) oder durch Färbung mit Coomassie Brilliant Blue (SERVA, Heidelberg) sichtbar gemacht.

2.2.16 Westernblot

Für die Westernblot-Studien wurden die Proteine in SDS-Probenpuffer aufgenommen, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und in einer Semidry-Blot-Apparatur (2117 Multiphor, LKB-Pharmacia, Freiburg) mit 0,8A/cm² auf Nitrocellulose-Membranen (NC, Amersham Pharmacia, Freiburg) transferiert. Als Puffersystem diente das diskontinuierliche System nach Khyse-Andersen (1984) oder das kontinuierliche nach Towbin et al. (1979). Zur Absättigung freier Bindungsstellen wurde die NC in TBS + 1,5 % Magermilchpulver/1,5 % BSA über Nacht (ÜN) bei 4 °C schüttelnd inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 0,05 % Tween/TBS wurden die Membranen 1 h mit Erstantikörper bei RT inkubiert. Anschließend wurde dreimal 5 min mit 0,05 % Tween/TBS gewaschen und 1 h bei RT mit einem Peroxidase (HRP) gekoppelten Zweitantikörper inkubiert. Nach erneutem Waschen erfolgte die Detektion der gebildeten Immunkomplexe mit dem System der verstärkten Chemilumineszenz (ECL, Amersham Pharmacia). Folgende Antikörper wurden eingesetzt:

- rabbit anti-PMP22 polyklonal (1:300, D`Urso und Müller., 1997)
- rabbit anti-P0 polyklonal (1:500, Hasse et al., 2002)
- rabbit anti-Plasmolipin (1:200, Hamacher et al., 2001)
- rabbit anti-PMP22 polyklonal (1:300; Antikörper-Service, Dr.Pineda, Berlin)
- mouse anti-MBP monoklonal (1:3.000, Chemicon, Hofheim, Germany)
- mouse anti-EGFP monoklonal (1:500, Clontech, Heidelberg, Germany)
- mouse anti-P0 monoklonal (1:10.000, Archelos et al., 1993)
- goat anti-GST monoklonal (1:2.000, Amersham Pharmacia, Freiburg, Germany)
- goat anti-mouse-HRP (1:2.500, Dako, Hamburg, Germany)
- goat anti-rabbit-HRP (1:2.500, Cappel, Turnhout, Belgien)
- rabbit anti-goat-HRP (1:20.000, Jackson Immunresearch, Westgrove, USA)

2.2.17 Überexpression und Aufreinigung von GST-Fusionspeptiden

Zur Überexpression der extrazellulären Domänen von P0, PMP22 und Plasmolipin in den proteasedefizienten E.coli Stamm BL21 wurde das Glutathion-S-Transferase (GST) Genfusionssystem von Amersham Pharmacia gewählt. Hierzu wurden die cDNAs, die die entsprechenden Regionen kodieren in den pGEX-4T2-Vektor kloniert und in den E.coli Stamm BL21 transformiert. Der pGEX-4T2-Vektor trägt einen induzierbaren *tac*-Promotor, dessen Aktivität durch Zugabe von Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) gesteuert werden kann. Zur Selektion enthält der Vektor das β -Laktamase-Gen, das für Ampicillin-Resistenz (Amp) kodiert.

Zur Expression der GST-Fusionspeptide wurden je Klon 50 ml LB-Medium + Amp mit 200 μ l Bakteriensuspension angeimpft und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Am nächsten Tag wurden 250 ml LB-Medium mit 5 ml dieser Über-Nacht-Kultur angeimpft und solange geschüttelt bis die OD₆₀₀ 1,0 erreicht war. Anschließend wurde mit IPTG (Endkonzentration 0,5 mM) die Expression der GST-Fusionspeptide für 2 h bei 37 °C induziert. Für die Aufreinigung der Wildtyp und mutierten extrazellulären Domänen von P0 erfolgte die Induktion bei 25 °C, um den Einbau der überexprimierten Fusionspeptide in zelluläre Einschlüsse (Inclusion Bodies) zu verringern bzw. zu verhindern. Die Bakterien wurden anschließend bei 4.700 U/min für 10 min pelletiert und in 10 ml eiskaltem PBS resuspendiert. Der Aufschluss der Bakterien erfolgte durch dreimaliges sonifizieren (Stufe 4; Sonifier Cell Disruptor B15, Fa. Branson) je 15 s auf Eis. Um eine bessere Solubilisierung der GST-Fusionspeptide zu erreichen wurden die Bakterienlösungen mit Triton-X-100 (1 % des Endvolumens) versetzt und 30 min bei 4 °C geschüttelt. Anschließend wurden die Lösungen bei 8.000 U/min abzentrifugiert und der Überstand mittels Affinitäts-Chromatographie aufgereinigt. Hierzu wurde der Überstand 1 h mit 500 μ l einer Lösung aus 50 % Glutathion-Sepharose 4B (Amersham Pharmacia) und 50 % PBS bei 4 °C auf einem Über-Kopf-Schüttler inkubiert. Die Sepharose wurde durch Zentrifugation mit 1.500 U/min vom Überstand getrennt und dreimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Die Elution der GST-Fusionspeptide erfolgte durch je 20-minütige

Inkubation mit 1 ml reduziertem Glutathion (10 mM) in drei Elutions-Schritten. Der Verlauf der Aufreinigung wurde durch SDS-PAGE und Coomassie Blue Färbung dokumentiert und die aufgereinigten GST-Fusionspeptide mittels GST-Antikörper im Westernblot nachgewiesen.

2.2.18 Präzipitation mit GST-Fusionspeptiden

Proteinlösungen von transduzierten P0- oder PMP22-HeLa-Zellpopulationen wurden mit 100 µl Glutathion-Sepharose für 1 h präadsorbiert. Um unspezifisch an die Sepharose gebundenes Proteinmaterial abzutrennen, wurde 5 min mit 10.000 x g zentrifugiert, die Überstände abgenommen und die Sepharose verworfen. Gleichzeitig wurden frisch präparierte Bakterien-Zelllysate der GST-Fusionspeptide (GST-P0ex, GST-PMPex1, GST-PMPex2 und GST-PLAex) 1 h mit 200 µl Glutathion-Sepharose inkubiert, dreimal mit eiskaltem Lysispuffer (Pierce, Rockford, IL, USA) gewaschen und anschließend mit den präadsorbierten HeLa-Zelllysaten über Nacht bei 4 °C schüttelnd inkubiert. Die gebundenen Proteine wurden durch einminütige Zentrifugation bei 1.500 x g pelletiert, die Überstände verworfen und fünfmal für 10 min mit 500 µl eiskaltem Lysispuffer gewaschen.

Zur Auswertung wurden die Pellets in 40 µl 2 x SDS-Probenpuffer aufgenommen und für 10 min bei 100 °C denaturiert. Nach Zentrifugation in einer Picofuge (6.400 U/min, Stratagene) wurden die Überstände auf 10 %- oder 15 %-SDS-Gele aufgetragen und im Westernblot analysiert.

2.2.19 Biotinylierung von Zelloberflächenproteinen

Konfluente, stabil transduzierte P0-, PMP22- und Plasmolipin-HeLa-Zellkulturen wurden dreimal mit eiskaltem PBS (pH 8,0 oder 7,0) gewaschen und anschließend mit einer Lösung aus Sulfo-Succinimidyl-6-(biotinamido)-hexanoat oder aktiviertem {(+)-Biotinyl-3-maleimidopropionamidyl-3,6-dioxaoctanediamin} in PBS (Endkonzentration 0,5 mg/ml) für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Abtrennung von überschüssigem Biotinylierungsreagenz wurden die Zellen initial mit 50 mM Tris (pH 8,0) und zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Die Zellen wurden in 1,5 ml

Lysispuffer (Pierce) mit Proteaseinhibitormix für 30min bei 4 °C auf einem Über-Kopf-Schüttler lysiert und anschließend mit 10.000 x g zentrifugiert. Der resultierende Überstand mit den solubilisierten und biotinylierten Oberflächenproteinen wurde mit 50 µl Neutravidin gekoppelter Sepharose für 1 h bei 4 °C inkubiert. Die gebundenen biotinylierten Proteine wurden durch einminütige Zentrifugation bei 10.000 x g pelletiert, die Überstände verworfen und die Pellets dreimal mit 500 µl eiskaltem Lysispuffer gewaschen. Zur Auswertung wurden die Pellets in 40 µl 2 x SDS-Probenpuffer resuspendiert und für 10 min bei 100 °C denaturiert. Nach Zentrifugation in einer Picofuge (6.400 U/min) wurden die Überstände auf 15 %-SDS-Gelen aufgetragen und im Westernblot analysiert. Als Kontrollen wurden nicht-biotinylierte Proteine der Zellen mitgeführt.

2.3 Zellkultur-Methoden

2.3.1 Zellkultur von HeLa-Zellen

HeLa-Zellen wurden von der *European Collection Of Cell Cultures* (ECACC, GB) bezogen und auf unbeschichteten Kultur-Flaschen in Medium, bestehend aus DMEM + 10 % FCS, 2 mM L-Glutamin, 1 % Penicillin und Streptomycin (10⁵ U/ml), gehalten.

2.3.2 Transiente Transfektion von HeLa-Zellen

Die cDNAs der kodierenden Regionen von PMP22, P0 und Plasmolipin aus der Ratte wurden jeweils in den pIRES2-EGFP-Vektor (BD Bioscience/Clontech) kloniert. Zur Transfektion der pIRES-Konstrukte wurden 24 h vor der Transfektion 3 Millionen HeLa-Zellen auf Kultur-Platten (Durchmesser: 17 cm) ausplattiert. Je 15 µg DNA der pIRES-Konstrukte wurden mit 200 µl HEPES-DMEM verdünnt und in einem weiteren Reaktionsgefäß mit 54 µl Fugene (Roche) in 1,8 ml HEPES-DMEM vorsichtig gemischt, 10 min inkubiert, vereinigt und weitere 10 min inkubiert, bevor die Suspension zu den Zellen hinzugegeben wurde. Die Zellen wurden 48 h nach der Transfektion zur Extraktion mit Detergenz (s. 2.3.2) verwendet.

2.3.3 Retrovirale Transduktion von HeLa-Zellen

Die retroviral stabil transduzierten HeLa-Zellpopulationen wurden von Dr. Frank Bosse (AG Molekulare Neurobiologie, Neurologie, Heinrich-Heine-Universität) in Kooperation mit Dr. Helmut Hanenberg (Pädiatrische Hämatologie/Onkologie, H.-H.-Universität) generiert.

Hierzu wurden die kodierenden cDNAs von PMP22, P0 und Plasmalipin in den retroviralen Vektor S11IEG3 kloniert. Zur Produktion von Virusüberständen, mit denen die HeLa-Zellen infiziert wurden (GALV-Überstände), wurden 10 cm Kulturplatten mit subkonfluenten ecotrophen Phoenix-Verpackungszellen (Schulze et al., 2002) mit 15 µg der Vektor-DNA und 45 µl Fugene (Roche) transfiziert. Nach 16 h wurde das Medium gewechselt. Zwei Tage nach erfolgter Transfektion wurde das virushaltige Medium abgenommen und durch einen 0,45 µm Filter filtriert, um zellfreie Virusüberstände zu präparieren. Mit diesen Überständen wurden PG13-Verpackungszellen (Miller et al., 1991) an drei aufeinanderfolgenden Tagen mit je 1,5 ml Virusüberstand und 7,5 µg Protaminsulfat/ml Medium (Hanenberg et al., 1997) infiziert, um stabile GALV-pseudotyp. Viren zu erhalten. Die GALV-Überstände von konfluenten transduzierten PG13-Verpackungszellen wurden alle 24 h für insgesamt 4 Tage gesammelt und durch Filtration aufgereinigt. Die retrovirale Transduktion von subkonfluenten HeLa-Zellen (40-60 %) erfolgte zweimal nach je 24 h durch Zugabe von infektiösem PG13-Überstand und 7,5 µg Protaminsulfat/ml Medium. Am nächsten Tag wurden die HeLa-Zellen umplattiert und in Gegenwart von 0,8 mg Geneticin (Neomycin, Sigma) pro ml Medium für mindestens 10 Tage kultiviert, um nicht infizierte Zellen zu eliminieren und stabile Zellpopulationen zu erhalten.

2.4 Bestimmung der Zell-Adhäsion

Zur Bestimmung der Zell-Zell-Adhäsion wurden je 15 Vertiefungen einer sterilen Mikrotiterplatte (mit 96 Vertiefungen) mit 5000 Zellen der transduzierten PMP22-, P0- oder Plasmalipin-Zellpopulationen verdünnt in 200 µl Medium versehen. Zur Kontrolle wurden in 15 Vertiefungen nicht-transduzierte HeLa-Zellen ausgesät und die Platten über Nacht bei 37 °C im Brutschrank gelagert. Am nächsten Tag wurden

die Mono-Zellrasen dreimal mit PBS gewaschen und anschließend wurden weitere 5000 Zellen jeder Zellpopulation verdünnt in 100 µl Medium + 20 mM EDTA zu den Zellrasen gegeben und für 2 h im Brutschrank inkubiert. Jeweils drei Vertiefungen pro Zellpopulation wurden als Kontrolle nur mit Medium befüllt. Um nicht adhätierende Zellen abzulösen, wurden die Platten 10 min bei 200 Upm geschüttelt und nach dreimaligem Waschen mit PBS das Medium durch 100 µl frisches ersetzt. Zur Bestimmung der Anzahl der adhätierten Zellen wurde der CellTiter 96 Aqueous Proliferation Assay (Promega, Bochum) verwendet. Hierzu wurden PMS-Stammlösung (Phenazinmethosulfat, Elektronenkoppler, 920 µg/ml in PBS) und MTS-Stammlösung [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-Tetrazolium 2 mg/ml in PBS] im Verhältnis 1:20 vermischt und je 20 µl Aliquots wurden in das Medium gegeben. Das membrangängige MTS wird durch Dehydrogenasen lebender, metabolisch aktiver Zellen zu einem löslichen Formazan-Produkt reduziert und ins Medium abgegeben. Die Menge an Formazansalz ist direkt proportional zur Anzahl lebender Zellen und kann bei einer Absorption von 490 nm in einem Plattenlesegerät gemessen werden. Die Auswertung der Mikrotiterplatten erfolgte nach dreistündiger Inkubation der Zellen mit MTS. Um nur adhätierende Zellen zu bestimmen wurde die Aktivität der vorgelegten Mono-Zellrasen jeder Zellpopulation in jedem Experiment mitgemessen und als Hintergrund abgezogen. Es wurde somit zusätzlich überprüft, ob die vorgelegten Mono-Zellrasen jeder Zellpopulation die gleiche Proliferation zeigen, was Voraussetzung ist, um reine Adhäsionseffekte der Zellen an diesen Zellrasen zu bestimmen. Des Weiteren wurde durch Vermessen von unterschiedlichen Zellverdünnungen überprüft, ob dieser Test als Adhäsionstest verwendet werden kann und ob die Umsetzung von MTS in das lösliche Formazansalz proportional zur Anzahl der adhätierten Zellen ist und somit auch Aussagen über die Linearität und die Sensitivität des verwendeten MTS-Tests liefert.

2.5 Bestimmung der Zell-Adhäsion an GST-Fusionspeptide

Zur Bestimmung der Zell-Adhäsion an den aufgereinigten GST-Fusionspeptiden der extrazellulären Domänen von P0, PMP22 und Plasmolipin, wurden mit GST-

Antikörper gekoppelte sterile Mikrotiterplatten (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK) verwendet. Je 15 Vertiefungen der Mikrotiterplatten wurden mit jeweils 500 ng des GST-Fusionspeptides in 200 µl PBS versehen und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Zur Kontrolle wurden zusätzlich 15 Vertiefungen mit 500 ng rekombinanten GST (rGST) versehen. Am nächsten Tag wurden die Platten dreimal mit PBS gewaschen und anschließend wurde von jedem transduzierten Zellpool (PMP22, P0 und Plasmolipin) je 15.000 Zellen auf drei Vertiefungen pro Fusionspeptid ausplattiert und für 2 h inkubiert. Zur Kontrolle wurden zusätzlich nicht-transduzierte HeLa-Zellen in der gleichen Zelldichte auf jedes Fusionspeptid gegeben. Nach zweistündiger Inkubation wurden die Platten dreimal vorsichtig mit PBS gewaschen, um nicht adhären Zellen zu entfernen. Die Auswertung der Adhäsion erfolgte wie unter 2.5 beschrieben.

Die Versuchsdurchführung zur Untersuchung der Adhäsion von stabil transduzierten PMP22- und P0-Zellen an nicht-mutierten und mutierten GST-Fusionspeptiden der extrazellulären Domäne von P0 erfolgte auf identische Weise.

3 Ergebnisse

3.1 Die peripheren Myelinproteine PMP22, P0 und Plasmolipin sind lokalisiert in Lipid Rafts

Die Beobachtung, dass sich apikale und basolaterale Membrankompartimente charakteristisch in ihrer Lipid- und Protein-Zusammensetzung unterscheiden, führte zur sogenannten Lipid Rafts Hypothese. Diese besagt, dass bestimmte Proteine der apikalen Membran im Trans-Golgi-Netzwerk in Cholesterin- und Glykosphingolipid-angereicherte Mikrodomänen (Lipid Rafts) verpackt werden, bevor sie zur apikalen Plasmamembran transportiert werden (Simons und van Meer 1988; Simons und Ikonen 1997; Rothberg et al., 1990). Ein charakteristisches Merkmal des Nervensystems von Vertebraten ist die Ummantelung von Axonen durch Myelin. Das Myelin des PNS wird von Schwannzellen gebildet, die für diesen Vorgang ihre Plasmamembran in biochemisch unterschiedliche, aber diskrete Regionen polarisieren. Da die Myelinmembran sehr reichhaltig an Cholesterin und Sphingolipiden, z.B. Galaktoceramide und Sulfatide, ist und die Bildung bzw. der Erhalt des Myelins eine spezielle Sortierung und einen speziellen Transport von Myelinkomponenten erfordert, sollte überprüft werden, ob die peripheren Myelinproteine PMP22, P0, Plasmolipin und MBP mit Lipid Rafts assoziiert sind. Die Resistenz von Lipid Rafts gegenüber Solubilisierung mit nicht-ionischen Detergenzien wie Triton-X-100 bei niedrigen Temperaturen erlaubt es, diese durch Zentrifugation in einem Saccharosegradienten bei niedriger Dichte anzureichern, aufzureinigen und assoziierte Proteine zu identifizieren.

3.1.1 Detergenzlöslichkeit bei 4 °C

Um eine Assoziation der peripheren Myelinproteine PMP22, P0, Plasmolipin und MBP mit Lipid Rafts zu untersuchen, wurde aufgereinigtes Myelin aus den Ischiasnerven adulter Ratten mit Triton-X-100 (TX-100) bei 4 °C extrahiert. Das extrahierte Material wurde durch Zentrifugation in einem Saccharosegradienten in nicht-lösliche (niedrige Dichte) und lösliche (hohe Dichte) Fraktionen getrennt. Die

Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE und Westernblot analysiert. Hierbei zeigte sich das die zwei Isoformen von MBP (18,5 und 21,5 kD) nur in den löslichen Fraktionen 10-12 lokalisiert sind. Während Plasmolipin ausschließlich in den nicht-löslichen Fraktionen 5-7 detektiert wurde, ergab sich bei den Westernblot-Analysen für die beiden Proteine PMP22 und P0 der Befund, dass diese nicht exklusiv der löslichen oder nicht-löslichen Fraktion zuzuordnen waren. Nahezu der größte Anteil an PMP22 wurde in den Triton-X-100 unlöslichen Fraktionen 5-7 gefunden. Allerdings wurde ein geringer Anteil des Proteins zusätzlich in allen anderen Fraktionen detektiert. Im Gegensatz dazu wurde von P0 ungefähr die Hälfte des Proteins in den Fraktionen niedriger Dichte 5-7 detektiert, während die andere Hälfte des Proteins in den Fraktionen höherer Dichte 10-12 lokalisiert war.

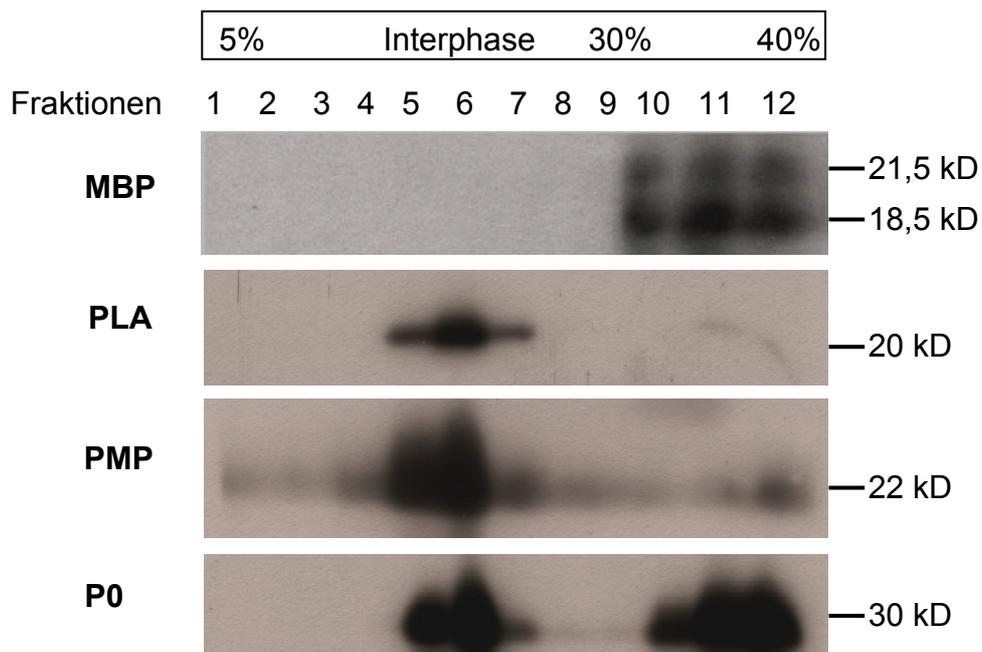


Abbildung 4: Westernblot-Analyse der Triton-X-100 (TX-100) extrahierten Proteine aus Myelin von Ischiasnerven der Ratte. Aufgereinigtes Myelin wurde nach Extraktion mit TX-100 bei 4 °C in Saccharosestufengradienten floriert. 1 ml Fraktionen wurden von oben (5% Saccharose, Fraktionen 1-4) nach unten (40% Saccharose, Fraktionen 11-12) entnommen. Lipid Rafts wurden an der 5-30%igen Interphase gefunden (Fraktionen 5-7). Proteine wurden mit den angegebenen Antikörpern detektiert (s. 2.3.7). MBP: Myelin-basische Proteine; PLA: Plasmolipin; PMP: Peripheres Myelin Protein 22 und P0: Protein Zero. Die Markierungen rechts geben die Mobilität der Proteine in Kilo Dalton (kD) wieder.

3.1.2 Detergenzlöslichkeit bei 37 °C

Ein etabliertes Kriterium zur Untersuchung von Protein-Assoziationen mit Lipid Rafts ist die Extraktion mit Triton-X-100 bei 37 °C. Eine Extraktion bei 37 °C führt zur Dissoziation der Lipid Rafts und somit zur Solubilisierung von Rafts-assoziierten Proteinen (Brown und Rose, 1992). Die Analyse von entsprechend behandeltem Myelin zeigte, dass wie erwartet die MBP-Isoformen in den Fraktionen hoher Dichte lokalisiert blieben. Dagegen führte die Extraktion bei 37 °C im Falle von Plasmolipin zu einer kompletten Verschiebung der Proteinlokalisierung von den Fraktionen niedriger Dichte (5-7) zu denen von höherer Dichte (11-12). Eine ähnliche Verschiebung zu Fraktionen mit hoher Dichte (10-12) konnte auch für die beiden Proteine PMP22 und P0 gezeigt werden. Allerdings ließen sich diese Proteine mit einem geringen Anteil weiterhin in den nicht-löslichen Fraktionen 5 und 6 nachweisen.

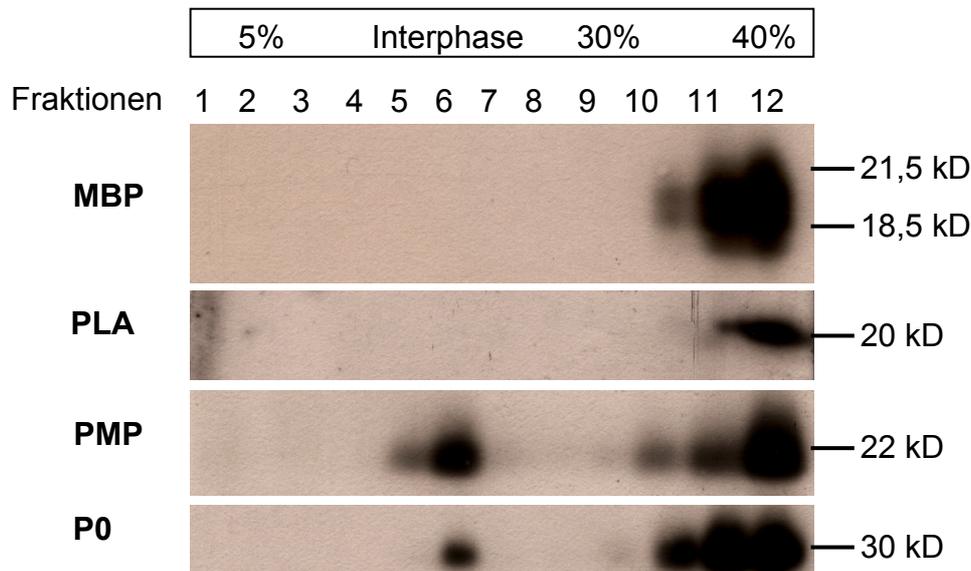


Abbildung 5: Westernblot-Analyse der Triton-X-100 (TX-100) extrahierten Proteine aus Myelin von Ischiasnerven der Ratte. Aufgereinigtes Myelin wurde nach Extraktion mit TX-100 bei 37 °C in Saccharosestufengradienten floriert. 1 ml Fraktionen wurden von oben (5% Saccharose, Fraktionen 1-4) nach unten (40% Saccharose, Fraktionen 11-12) entnommen. Lipid Rafts wurden an der 5-30%igen Interphase gefunden (Fraktionen 5-7). Proteine wurden mit den angegebenen Antikörpern detektiert (s. 2.3.7). MBP: Myelin-basische Proteine; PLA: Plasmolipin; PMP: Peripheres Myelin Protein 22 und P0: Protein Zero. Die Markierungen rechts geben die Mobilität der Proteine in Kilo Dalton (kD) wieder.

3.1.3 Entzug von Cholesterin

Es wird postuliert, dass Cholesterin eine strukturell entscheidende, aber auch eine sehr stark angereicherte Komponente von Lipid Rafts ist (Brown und Rose, 1992; Simons und Ikonen, 1997). Methyl- β -Cyclodextrin (β -CD) ist ein Einschluss-Molekül für Lipide, welches bevorzugt Cholesterin aus biologischen Membranen entzieht (Klein et al., 1995; Yancey et al., 1996). Um den Einfluss des Cholesterin-Entzugs auf die Assoziation von Proteinen mit Lipid Rafts zu untersuchen, wurde peripheres Myelin mit β -CD vorbehandelt und anschließend der Extraktion mit TX-100 unterzogen. Nachfolgende Westernblot-Analysen zeigen, dass auch hierbei die zwei MBP-Isoformen in den löslichen Fraktionen bleiben. Aber auch der gesamte Proteingehalt an Plasmolipin, PMP22 und P0 wurde nach Behandlung mit β -CD in den löslichen Fraktionen 10-12 detektiert.

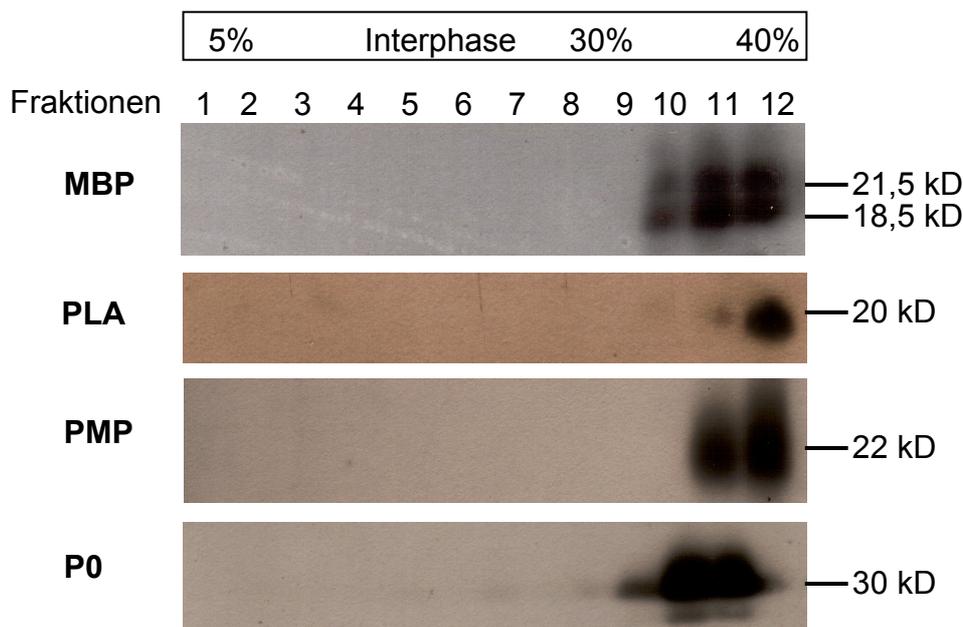


Abbildung 6: Westernblot-Analyse der Triton-X-100 (TX-100) extrahierten Proteine aus Myelin von Ischiasnerven der Ratte. Aufgereinigtes Myelin wurde mit β -Methyl-Cyclodextrin (β -CD) vorbehandelt, anschließend mit TX-100 bei 4 °C extrahiert und in Saccharosestufengradienten floriert. 1 ml Fraktionen wurden von oben (5% Saccharose, Fraktionen 1-4) nach unten (40% Saccharose, Fraktionen 11-12) entnommen. Lipid Rafts wurden an der 5-30%igen Interphase gefunden (Fraktionen 5-7). Proteine wurden mit den angegebenen Antikörpern detektiert (s. 2.3.7). MBP: Myelin-basische Proteine; PLA: Plasmolipin; PMP: Peripheres Myelin Protein 22 und P0: Protein Zero. Die Markierungen rechts geben die Mobilität der Proteine in Kilo Dalton (kD) wieder.

3.1.4 Detergenzlöslichkeit und Entzug von Cholesterin in transient transfizierten HeLa-Zellen

Um festzustellen, ob die beobachtete Assoziation von Plasmolipin, PMP22 und P0 mit Lipid Rafts ein charakteristisches Merkmal von myelinisierenden Schwannzellen ist, wurde die Verteilung dieser Proteine in Transient Transfizierten HeLa-Zellen untersucht. Hierzu wurden die cDNAs von PMP22, P0 und Plasmolipin aus Ratte in den pIRES2-EGFP-Expressionsvektor kloniert und in HeLa-Zellen transfiziert. Die Transfizierten Zellen wurden mit Triton-X-100 bei 4 °C und 37 °C extrahiert und das Material durch Saccharose-Gradienten-Zentrifugation in nicht-lösliche und lösliche Fraktionen getrennt. Die Analyse der Proteine erfolgte über SDS-PAGE und Westernblot mit spezifischen Antikörpern.

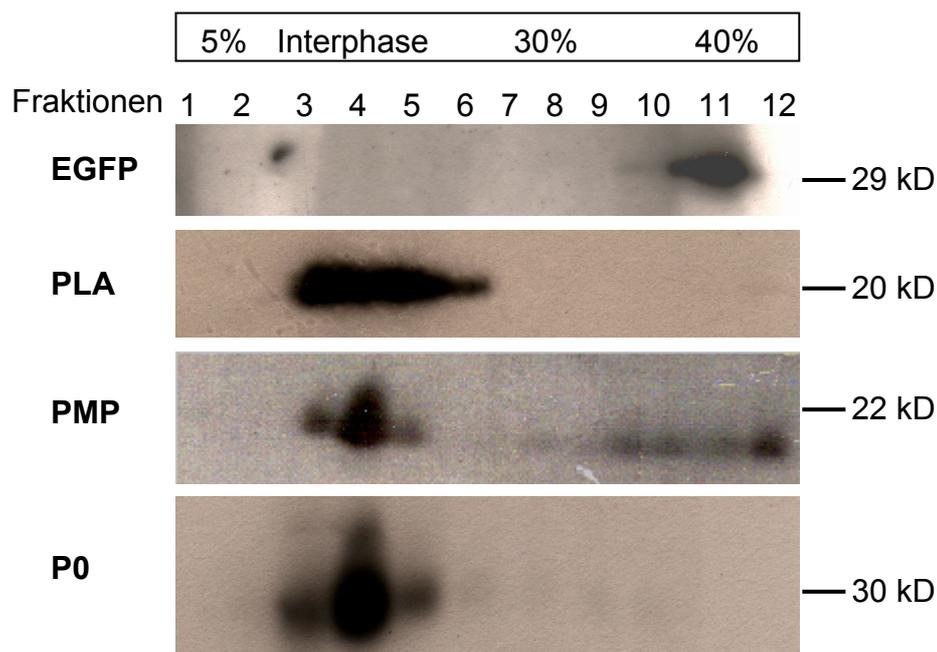


Abbildung 7: Westernblot-Analyse der Triton-X-100 (TX-100) extrahierten Proteine aus transient Transfizierten HeLa-Zellen. Zellen wurden mit Plasmolipin, PMP22 und P0 transfiziert und nach 48 h mit TX-100 bei 4 °C extrahiert. Zellextrakte wurden in Saccharosestufengradienten floriert. Ein Milliliter Fraktionen wurden von oben (5% Saccharose, Fraktionen 1-2) nach unten (40% Saccharose, Fraktionen 11-12) entnommen. Lipid Rafts wurden an der 5-30%igen Interphase gefunden (Fraktionen 2-5). Proteine wurden mit den angegebenen Antikörpern detektiert (s. 2.3.7). EGFP: Enhanced Green Fluorescence Protein, EGFP wurde aus den Fraktionen von PMP22 transfizierten Zellen nachgewiesen; PLA: Plasmolipin; PMP: Peripheres Myelin Protein 22 und P0: Protein Zero. Die Markierungen rechts geben die Mobilität der Proteine in Kilo Dalton (kD) wieder.

Nach der Behandlung mit TX-100 bei 4 °C konnte Plasmolipin, P0 und nahezu alles PMP22-Protein in den nicht-löslichen Fraktionen 3-5 detektiert werden, während das koexprimierte Kontroll-Protein EGFP (Enhanced Green Fluorescence Protein) nur in den löslichen Fraktionen 11 und 12 gefunden wurde.

Extraktion bei 37 °C führte bei allen untersuchten Proteinen zu einer Verschiebung von Fraktionen niedriger Dichte zu Fraktionen hoher Dichte (10-12).

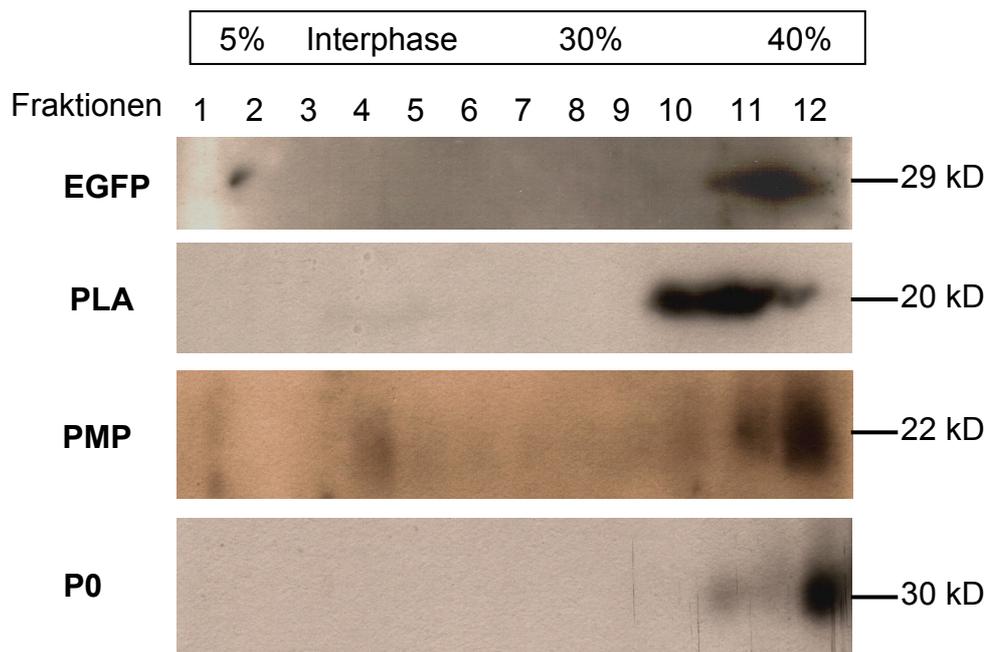


Abbildung 8: Westernblot-Analyse der Triton-X-100 (TX-100) extrahierten Proteine aus transient transfizierten HeLa-Zellen. Zellen wurden mit Plasmolipin, PMP22 und P0 transfiziert und nach 48 h mit TX-100 bei 37 °C extrahiert. Zellextrakte wurden in Saccharosestufen-gradienten floriert. 1 ml Fraktionen wurden von oben (5% Saccharose, Fraktionen 1-2) nach unten (40% Saccharose, Fraktionen 11-12) entnommen. Lipid Rafts wurden an der 5-30%igen Interphase gefunden (Fraktionen 2-5). Proteine wurden mit den angegebenen Antikörpern detektiert (s. 2.3.7). EGFP: Enhanced Green Fluorescence Protein, EGFP wurde aus den Fraktionen von PMP22 transfizierten Zellen nachgewiesen; PLA: Plasmolipin; PMP: Peripheres Myelin Protein 22 und P0: Protein Zero. Die Markierungen rechts geben die Mobilität der Proteine in Kilo Dalton (kD) wieder.

Um zu testen, ob der Verlust der Rafts Assoziation von Plasmolipin, PMP22 und P0 nur bei einem Cholesterin-Entzug aus Myelin stattfindet, wurde die Löslichkeit der Proteine aus transfizierten Zellen nach der Inkubation mit β -CD analysiert. Während die untersuchten Proteine in unbehandelten Zellen größtenteils oder absolut

unlöslich waren, zeigte sich nach dem Cholesterin-Entzug, dass alle Proteine nur in den löslichen Fraktionen detektiert werden konnten. Unter allen getesteten Bedingungen wurde das koexprimierte Kontroll-Protein EGFP ausschließlich in den löslichen Fraktionen mit hoher Dichte gefunden.

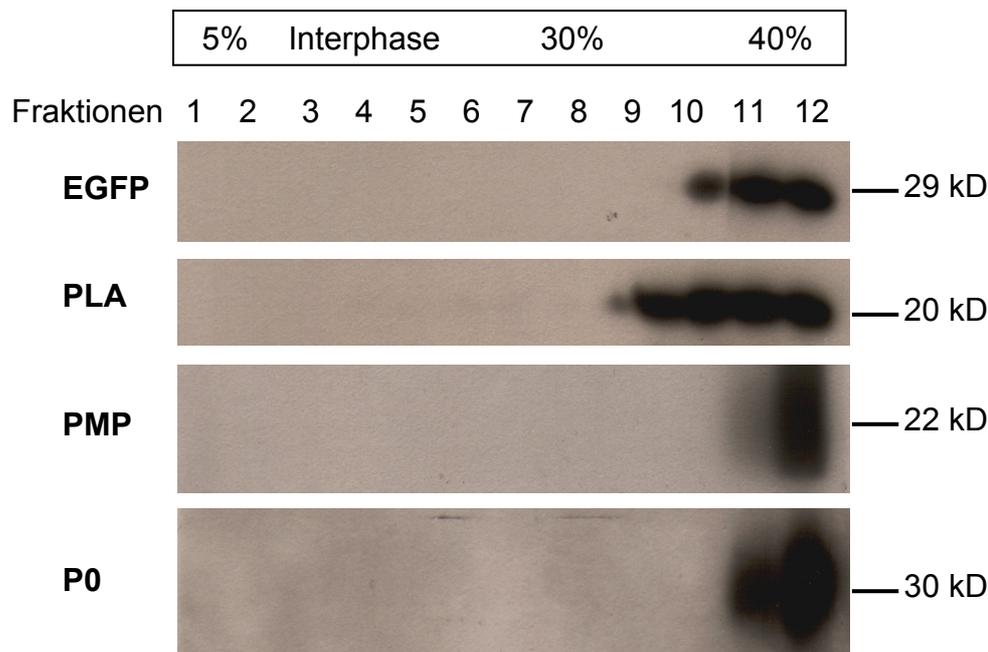


Abbildung 9: Westernblot-Analyse der Triton-X-100 (TX-100) extrahierten Proteine aus transient transfizierten HeLa-Zellen. Zellen wurden mit Plasmolipin, PMP22 und P0 transfiziert und nach 48 h mit β -Methyl-Cyclodextrin vorbehandelt und anschließend mit TX-100 bei 4 °C extrahiert. Zellextrakte wurden in Saccharosestufengradienten floriert. 1 ml Fraktionen wurden von oben (5% Saccharose, Fraktionen 1-2) nach unten (40% Saccharose, Fraktionen 11-12) entnommen. Lipid Rafts wurden an der 5-30%igen Interphase gefunden (Fraktionen 2-5). Proteine wurden mit den angegebenen Antikörpern detektiert (s. 2.3.7). EGFP: Enhanced Green Fluorescence Protein, EGFP wurde aus den Fraktionen von PMP22 transfizierten Zellen nachgewiesen; PLA: Plasmolipin; PMP: Peripheres Myelin Protein 22 und P0: Protein Zero. Die Markierungen rechts geben die Mobilität der Proteine in Kilo Dalton (kD) wieder.

3.2 PMP22 und P0 bilden Komplexe in Lipid Rafts

Um zu Überprüfen, ob PMP22 und P0 auch in Lipid Rafts miteinander interagieren, wurden Immunpräzipitationsprotokolle etabliert. Bei den Protokollen wurde darauf geachtet, das Antigen möglichst nativ zu belassen, da eine Denaturierung des

Antigens der experimentellen Fragestellung nach Interaktion dieser Proteine entgegenstehen würde. Um die Existenz solcher Interaktionen in Lipid Rafts zu überprüfen, wurden die mit den α PMP22- oder α P0-Serum präzipitierten Proteine im Westernblot getestet. Abbildung 10 bestätigt, dass mit α PMP22 P0 kopräzipitiert (Abb. 10B) und in dem reversen Experiment α P0 auch PMP22 kopräzipitiert (Abb.10A). Diese Beobachtung gilt zum größtenteils für Immunpräzipitationen aus der Lipid-Rafts-haltigen Fraktion 6. Eine Kopräzipitation von PMP22 mit α P0 ist auch in Fraktion 12 zu erkennen. Es wurden keine Signale in den Kopräzipitationen mit den Präimmunseren dieser Antikörper gefunden.

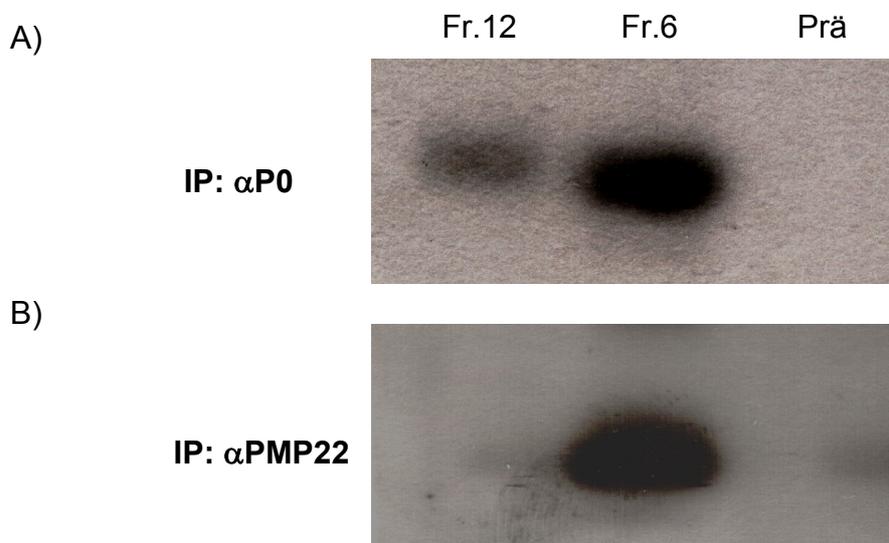


Abbildung 10: Immunpräzipitationen von PMP22 und P0

Myelin aus Ischiasnerven adulter Ratten wurde wie unter 2.3.1 beschrieben präpariert und in Saccharosegradienten floriert um lösliche und nicht-lösliche Fraktionen zu erhalten. Proteine aus Fraktion 12 (Fr.12, lösliche Proteine) und Fraktion 6 (Fr.6, nicht-lösliche Proteine) wurden mit den Antiseren inkubiert. Die Antigen/Antikörper-Komplexe wurden durch Protein-A-Sepharose präzipitiert. Die Abbildung zeigt in A) die Westernblot-Analyse mit α PMP22 nach Immunpräzipitation (IP) mit α P0 und in B) die Analyse mit α P0 nach Präzipitation mit α PMP22. Zur Kontrolle wurden Proteine aus Fraktion 6 auch mit den Präimmunseren (Prä) von PMP22 und P0 präzipitiert.

3.3 Produktion von stabil transduzierten HeLa-Zellen

Um die Interaktion zwischen PMP22 und P0 näher zu definieren wurden HeLa-Zellen mit retroviralen Konstrukten der kodierenden cDNAs von PMP22, P0 und Plasmolipin stabil infiziert. Die Expression der Konstrukte und die Stabilität der Expression wurde in regelmäßigen Zeitabständen durch RT-PCR (Daten wurden von Dr. Frank Bosse generiert) mit Konstrukt-spezifischen Primern bestätigt. Um sicher zu gehen, dass jedes Protein exprimiert und in die Zell-Plasmamembran inseriert wird, wurden intakte Zellen jeder Zellpopulation mit nicht-membrangängigen Biotinylierungsreagenz markiert und mit Neutravidin gekoppelter Sepharose präzipitiert. Das präzipitierte Material wurde über SDS-PAGE fraktioniert, auf Nitrocellulose-Membranen transferiert und in Westernblots mit den spezifischen Antikörpern gegen PMP22, P0 und Plasmolipin überprüft. Zur Kontrolle wurden von jeder transduzierten Zellgruppe (P0, PMP22 und Plasmolipin) nicht-markierte Zellen mitgeführt. Abbildung 11 zeigt, dass alle drei Proteine exprimiert und in die Zelloberfläche der Zellen inseriert werden.

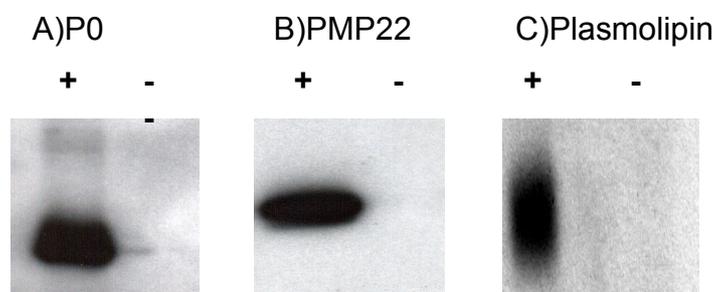
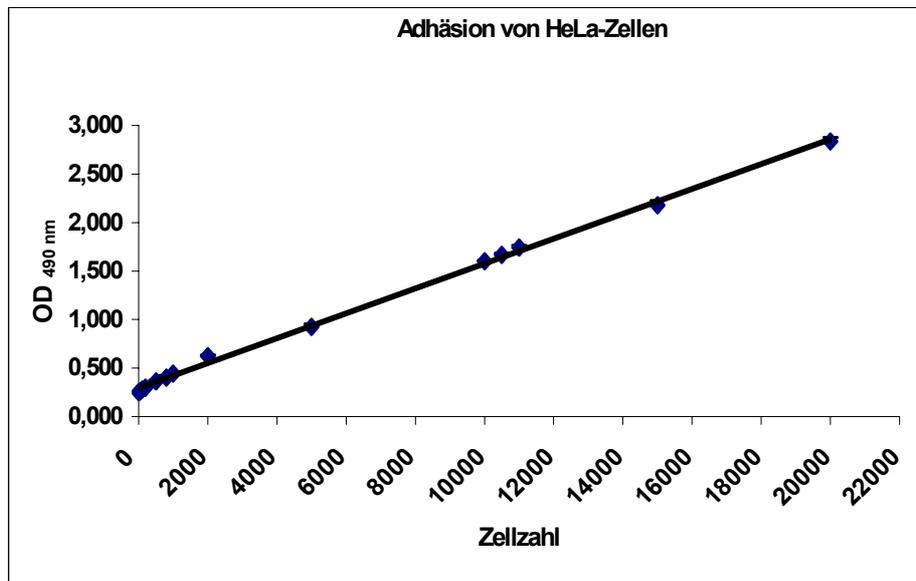


Abbildung 11: Western blot-Analyse der biotinylierten Zelloberflächenproteine aus stabil transduzierten HeLa-Zellpopulationen. Zellen wurden mit cDNAs von P0, PMP22 und Plasmolipin retroviral transduziert und mit Geneticin selektioniert. Die Zelloberflächenproteine jeder Zellpopulation wurden mit einem Biotinylierungsreagenz markiert und mit Neutravidin-Sepharose präzipitiert. Präzipitate wurden mittels SDS-PAGE fraktioniert, auf Nitrocellulose-membranen transferiert und mit Antikörpern gegen P0, PMP22 und Plasmolipin getestet. (A) P0, (B) PMP22 und (C) Plasmolipin sind in der Zellplasmamembran lokalisiert und werden von den stabil transduzierten HeLa-Zellen exprimiert (+ mit Biotin markiert). Es konnten keine Signale in den Präzipitaten von nicht-biotinylierten Kontrollzellen, die diese Proteine exprimieren, detektiert werden (- keine Biotinmarkierung).

3.4 Zell-Adhäsionstest

Im Verlauf dieser Promotion sollte ein funktioneller Test entwickelt werden, der es ermöglicht, die Interaktion zwischen PMP22 und P0 aufzuklären. Zu diesem Zweck wurde ein Proliferationstest (im Folgenden als MTS-Test bezeichnet) zur Messung der Adhäsion von Zellen verwendet. Zum Nachweis der Linearität und Sensitivität des verwendeten MTS-Tests wurden verschiedene Verdünnungen von stabil transduzierten HeLa-Zellen angefertigt und auf Mikrotiterplatten ausplattiert. Die Zellen wurden nach drei Stunden Adhäsion mit PBS gewaschen und mit 100 μ l frischem Medium und dem MTS-Reagenz inkubiert. Nach dreistündiger Farbreaktion wurde die optische Dichte (OD) bei 490 nm gemessen. Abbildung 12 zeigt die gemessene OD₄₉₀ in Abhängigkeit zur Zellzahl aufgetragen. Der verwendete MTS-Test ist in weiten Bereichen linear und die OD₄₉₀ ist proportional zur Zellzahl, und kann somit zur geplanten Messung der Adhäsion verwendet werden. Allerdings liegt der Startpunkt der OD₄₉₀ hier nicht bei 0, sondern bei 0,25 dem Absorptionwert des zellfreien Mediums (Abb.12). Des Weiteren ermöglicht dieser Test bzw. die Messdaten einen Unterschied von 500 Zellen, in den Bereichen höherer Zelldichten festzustellen. Dies würde der Zelladhäsion auf einen bereits vorgelegten Zellrasen entsprechen. In den Bereichen niedriger Zelldichte kann dieser Test bereits einen Unterschied von 100 Zellen detektieren. Dies würde der Zell-Adhäsion auf einem Substrat, wie z.B. GST-Fusionspeptiden, entsprechen. Zur Bestimmung der Zell-Zell-Adhäsion wurden 5.000 Zellen eingesetzt, die auf einen Zellrasen von 10.000 Zellen (initial wurden 5.000 Zellen ausgesät, die sich über Nacht verdoppelten, siehe nächster Abschnitt) adhären sollten. Zur Bestimmung der Zelladhäsion auf GST-Fusionspeptide wurden 15.000 Zellen eingesetzt. Bei standardmäßig eingesetzten 15.000 Zellen entspricht der detektierbare Unterschied von 500 Zellen mindestens 3,3% der Gesamtzellzahl. Somit können mit diesem MTS-Test auch schon sehr geringe Adhäsionsvorgänge detektiert werden.

A)



B)

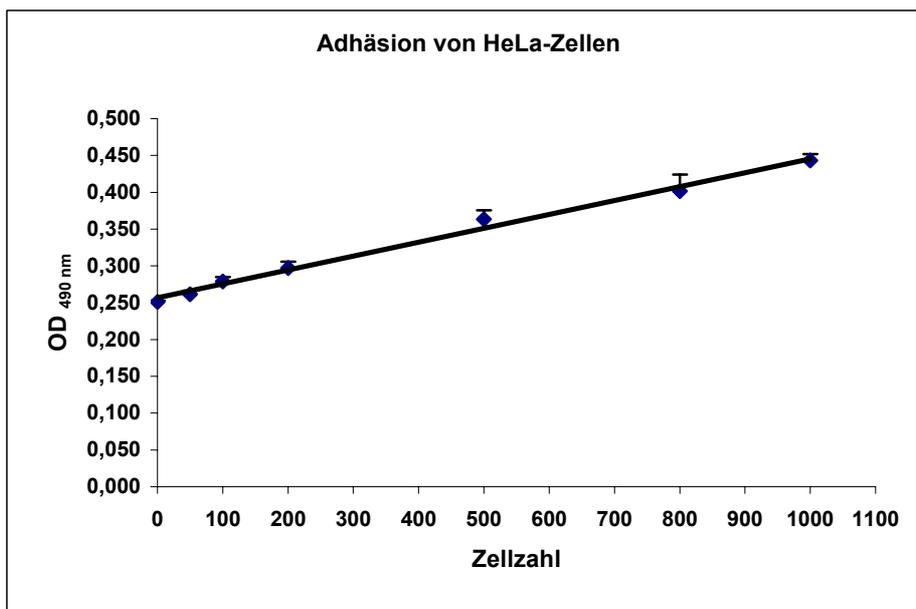


Abbildung 12: Adhäsion von HeLa-Zellen in verschiedenen Zelldichten

HeLa-Zellen wurden in verschiedenen Verdünnungen von 0-20.000 Zellen auf Mikrotiterplatten gegeben und für drei Stunden im Brutschrank inkubiert. Die adhärenierten Zellen wurden gewaschen und die Proliferation der adhärenierten Zellen mittels MTS-Test photometrisch bestimmt. Die gemessene optische Dichte (OD) bei 490 nm ist proportional zur Zellzahl aufgetragen. A) zeigt die Regressionsgerade des insgesamt vermessenen Bereichs von 0-20000 Zellen. B) zeigt die Regressionsgerade aus dem Bereich niedriger Zelldichte von 0-1000 Zellen. Jede Zellverdünnung wurde dreifach gemessen. Punkte repräsentieren die Ergebnisse \pm Standardabweichung von zwei verschiedenen Experimenten.

Als nächster Schritt wurde überprüft, ob die vorgelegten einschichtigen Zellrasen der verschiedenen Transduktionen, die gleiche Proliferation zeigen. Hierzu wurden 5000 Zellen jeder Zellgruppe über Nacht ausplattiert und bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Diese wurden am darauffolgenden Tag mit PBS gewaschen und die Proliferationsrate wurde mittels MTS-Test ermittelt. Wie Abbildung 13 zeigt, ist die Proliferationsrate der getesteten P0-, PMP22-, Plasmolipin- und Wildtyp-Zellen nahezu identisch. Es konnte somit davon ausgegangen werden, dass die über den MTS-Test ermittelte Adhäsion an einen vorgegebenen Zellrasen nur auf die unterschiedliche Anzahl von adhärenierten Zellen zurückzuführen ist und nicht auf eine unterschiedliche Proliferation der verwendeten Zellrasen. Aufgrund der vorbereitenden Messung der Proliferationsrate der unterschiedlichen Zellen ergab sich die oben genannte Beobachtung, dass sich die ausgesäten 5000 Zellen über Nacht verdoppelten (Daten nicht gezeigt).

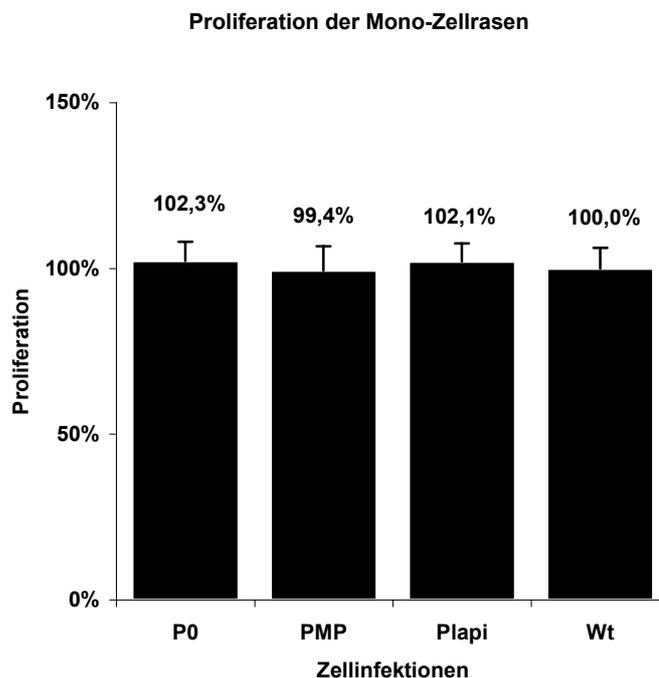


Abbildung 13: Proliferation der vier Zellpopulationen nach Infektion
HeLa-Zellen wurden mit den cDNAs von P0, PMP22 und Plasmolipin retroviral transduziert und mit Geneticin selektioniert, um HeLa-Zellen zu erhalten. 5000 Zellen jeder Infektion wurden ausplattiert und über Nacht im Brutschrank bei 37 °C gelagert. Die Proliferation dieser HeLa-Zellen (I transduziert mit P0 (P0), PMP22 (PMP), Plasmolipin (Plapi) und nicht-transduzierten Zellen (Wt)) wurde photometrisch mittels MTS-Test ermittelt. Die Proliferation von nicht-transduzierten HeLa-Zellen (Wt) wurde als 100 % definiert, um die Proliferation der

anderen Zellen zu kalkulieren. Jeder Zelltyp wurde dreifach gemessen. Balken repräsentieren die Ergebnisse \pm Standardabweichung von vier verschiedenen Experimenten

Die Proliferation jeder Zellgruppe wurde in jedem Experiment parallel mitdetektiert und als Hintergrund abgezogen, um nur die Adhäsion der Zellen zu bestimmen.

3.5 PMP22 und P0 bilden adhäsive trans-homophile und trans-heterophile Zell-Zell-Interaktionen

Der MTS-Test wurde dazu verwendet zu testen, ob die stabil transduzierten Zellen die Fähigkeit besitzen heterophile oder homophile Interaktionen zu bilden. Hierzu wurde die Adhäsion von P0-, PMP-, Plasmolipin- oder Wildtyp-HeLa-Zellen auf einen vorgelegten Zellrasen bestehend aus HeLa-Zellen die entweder P0, PMP22, Plasmolipin oder keines dieser Proteine exprimierten gemessen. Nicht adhärierte Zellen wurden durch Waschen entfernt. Gebundene Zellen wurden 3 h mit dem MTS-Reagenz inkubiert und das von den Zellen umgesetzte lösliche Formazansalz wurde als Maß der adhärierten Zellen quantifiziert.

Die Adhäsion von P0 exprimierenden Zellen auf einen Zellrasen aus P0-Zellen zeigte im Vergleich mit der Adhäsion auf einen Zellrasen aus nicht-transduzierten Zellen einen Anstieg der Adhäsion von 57 % ($p < 0,0001$, Abb. 14). Interessanterweise konnte ebenfalls eine um 32 % erhöhte Bindung ($p < 0,001$, Abb. 14) von PMP22 exprimierenden Zellen an einen P0-Zellrasen festgestellt werden. Im Gegensatz dazu wurde kein signifikanter Effekt bei der Adhäsion von Plasmolipin- oder nicht-transduzierten-Zellen mit einem P0-Zellrasen (Abb. 14) beobachtet.

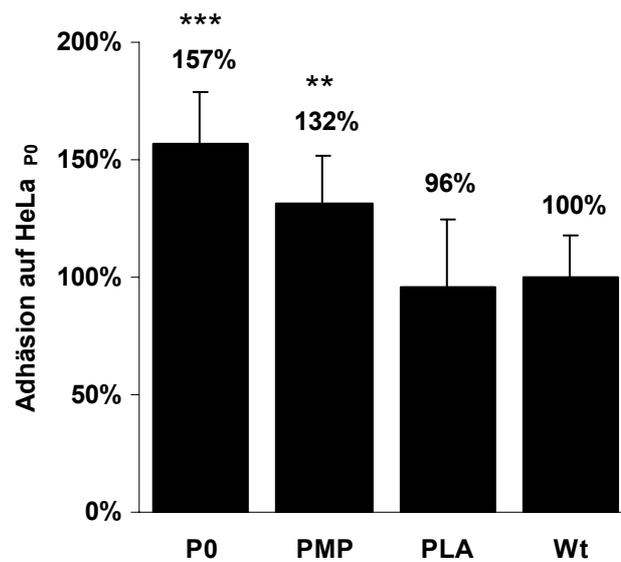


Abbildung 14: Adhäsion von transduzierten HeLa-Zellen auf HeLa_{P0}. HeLa-Zellen wurden mit den cDNAs von P0, PMP22 und Plasmolipin retroviral transduziert und mit Geneticin selektioniert, um unterschiedliche HeLa-Zellpopulationen zu erhalten. Die Adhäsion von HeLa-Zellen, transduziert mit P0 (P0), PMP22 (PMP), Plasmolipin (PLA) und nicht-transduzierten Zellen (Wt) auf einen Zellrasen aus P0 überexprimierenden (transduziert) Zellen (HeLa_{P0}), wurde photometrisch ermittelt (siehe Text). Die Adhäsion von nicht-transduzierten HeLa-Zellen (Wt) wurde als 100 % definiert, um die Adhäsion der anderen Zellen darauf zu normalisieren. Jeder Zelltyp wurde dreifach gemessen. Balken repräsentieren die Ergebnisse \pm Standardabweichung von vier verschiedenen Experimenten (***, $p < 0,0001$; **, $p < 0,001$; Signifikanzberechnung erfolgte mit Studentischem t Test).

In den reversen Experimenten, in denen P0-Zellen auf einen PMP22-Zellrasen gegeben wurden, konnte eine ähnliche Erhöhung der Adhäsionskapazität von 43 % ($p < 0,001$, Abb. 15) detektiert werden. Im Gegensatz zur Adhäsion von Plasmolipin exprimierenden Zellen zu PMP22-Zellen, konnte bei PMP22-Zellen ebenfalls eine signifikant erhöhte homophile Bindungskapazität von 35 % ($p < 0,001$, Abb. 15) an den vorgelegten PMP22-Zellrasen gemessen werden.

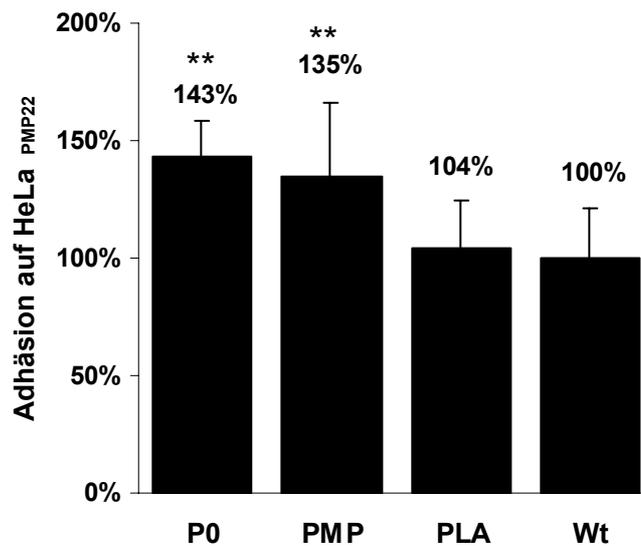


Abbildung 15: Adhäsion von transduzierten HeLa-Zellen auf HeLa_{PMP22}

HeLa-Zellen wurden mit den cDNAs von P0, PMP22 und Plasmolipin retroviral transduziert und mit Geneticin selektioniert, um unterschiedliche HeLa-Zellpopulationen zu erhalten. Die Adhäsion von HeLa-Zellen transduziert mit P0 (P0), PMP22 (PMP), Plasmolipin (PLA) und nicht-transduzierten Zellen (Wt) auf einen Zellrasen aus PMP22 transduzierten Zellen (HeLa_{PMP22}) wurde photometrisch ermittelt (siehe Text). Die Adhäsion von nicht-transduzierten HeLa-Zellen (Wt) wurde als 100 % definiert, um die Adhäsion der anderen Zellen zu kalkulieren. Jeder Zelltyp wurde dreifach gemessen. Balken repräsentieren die Ergebnisse \pm Standardabweichung von vier verschiedenen Experimenten (***, $p < 0,0001$; **, $p < 0,001$; Signifikanzberechnung erfolgte mit Studentischem t Test).

In keinem der durchgeführten Experimente konnte eine erhöhte Adhäsion von P0- oder PMP-Zellen an einen Plasmolipin-Zellrasen (Abb. 16) oder einen Zellrasen aus nicht-transduzierten Wt-Zellen (Abb.17) detektiert werden.

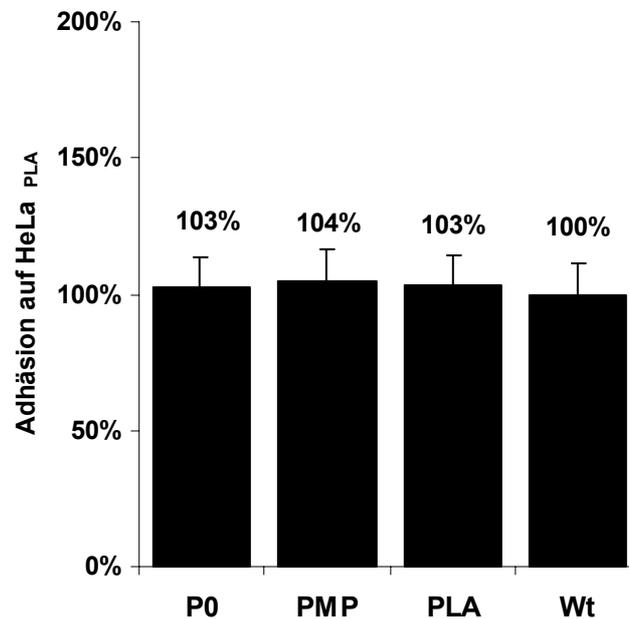


Abbildung 16: Adhäsion von transduzierten HeLa-Zellen auf HeLa_{PLA}. HeLa-Zellen wurden mit den cDNAs von P0, PMP22 und Plasmolipin retroviral transduziert und mit Geneticin selektioniert, um unterschiedliche HeLa-Zellpopulationen zu erhalten. Die Adhäsion von HeLa-Zellen transduziert mit P0 (P0), PMP22 (PMP), Plasmolipin (PLA) und nicht-transduzierten Zellen (Wt) auf einen Zellrasen aus Plasmolipin transduzierten Zellen (HeLa_{PLA}) wurde photometrisch ermittelt (siehe Text). Die Adhäsion von nicht-transduzierten HeLa-Zellen (Wt) wurde als 100 % definiert, um die Adhäsion der anderen Zellen zu kalkulieren. Jeder Zelltyp wurde dreifach gemessen. Balken repräsentieren die Ergebnisse \pm Standardabweichung von vier verschiedenen Experimenten.

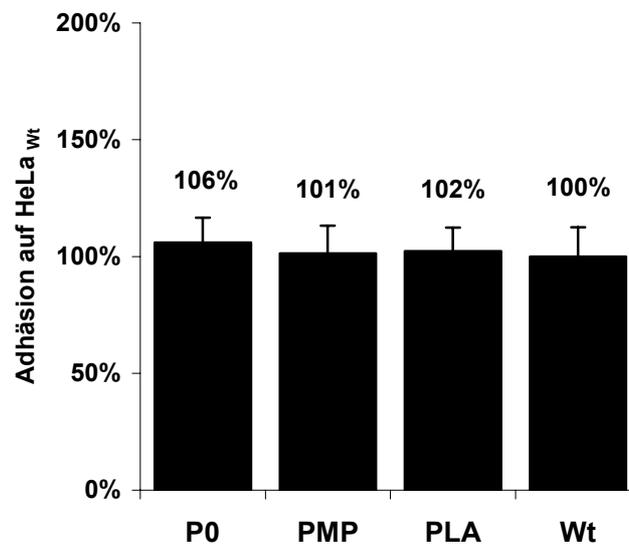


Abbildung 17: Adhäsion von transduzierten HeLa-Zellen auf HeLa_{wt}. HeLa-Zellen wurden mit den cDNAs von P0, PMP22 und Plasmolipin retroviral transduziert und mit Geneticin selektioniert, um unterschiedliche HeLa-Zellpopulationen zu erhalten. Die Adhäsion von HeLa-Zellen transduziert mit P0 (P0), PMP22 (PMP), Plasmolipin (PLA) und nicht-transduzierten Zellen (Wt) auf einen Zellrasen aus nicht-transduzierten Zellen (HeLa_{wt}) wurde photometrisch ermittelt (siehe Text). Die Adhäsion von nicht-transduzierten HeLa-Zellen (Wt) wurde als 100 % definiert, um die Adhäsion der anderen Zellen zu kalkulieren. Jeder Zelltyp wurde dreifach gemessen. Balken repräsentieren die Ergebnisse \pm Standardabweichung von vier verschiedenen Experimenten.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die beiden Proteine PMP22 und P0 im Gegensatz zu Plasmolipin sowohl homophile als auch heterophile adhäsive Trans-Interaktionen ausbilden. Zusätzlich konnte demonstriert werden, dass dieser neu etablierte Zell-Adhäsions-Test ein nützliches Instrument ist um Protein-Interaktionen zwischen verschiedenen Zellen zu untersuchen.

3.6 Klonierung, Expression und Aufreinigung von GST-Fusionspeptiden

Im weiteren Verlauf dieser Promotionsarbeit sollten die gefundenen adhäsiven homophilen und heterophilen Trans-Interaktionen von PMP22 und P0 strukturell weiter aufgeklärt werden. Der Zell-Zell-Adhäsions-Test lieferte erste Hinweise über die Art bzw. mögliche Domänen, die an diesen Interaktionen beteiligt sind. Da Trans-Interaktionen gemessen wurden, lag die Vermutung nahe, dass die extrazellulären Domänen dieser Proteine an dieser Bindung beteiligt sein könnten. Um diese Vermutung zu bestätigen, wurden mit Hilfe spezifischer Primer (mit zusätzlichen Nukleaseschnittstellen) DNA-Fragmente zur Klonierung in den pGEX-4T2-GST-Fusionsvektor erzeugt. Die erzeugten DNA-Fragmente enthielten entweder die kodierende Sequenz für die extrazelluläre Domäne von P0 (P0ex; 125-493 Bp), jeweils eine der beiden extrazellulären Domänen von PMP22 (PMPex1, 301-399 Bp; PMPex2, 565-609 Bp) oder die zweite extrazelluläre Domäne von Plasmolipin (PLAex, 576-638 Bp). Die gezielt mutierten extrazellulären Domänen von P0 wurden

entsprechend hergestellt. Abbildung 18 zeigt beispielhaft ein Ethidiumbromid-Agarosegelgel mit den erzeugten DNA-Fragmenten von PMPex1 (Bande 4), PMPex2 (Bande 5) und PLAex (Bande 7).

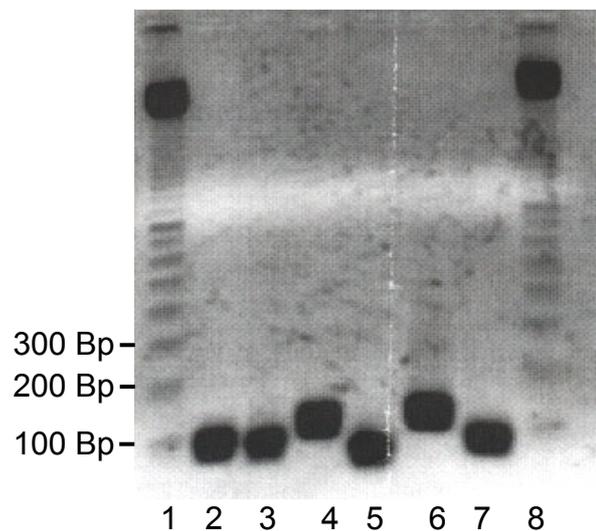


Abbildung 18: PCR-Amplifikation der kodierenden Regionen von PMP22 und Plasmolipin. Durch PCR wurden die kodierenden Regionen für die extrazellulären Domänen von PMP22 und Plasmolipin amplifiziert. PMPex1 (erste extrazelluläre Domäne von PMP22, 4), PMPex2 (zweite extrazelluläre Domäne von PMP22, 5) und PLAex (zweite extrazelluläre Domäne von Plasmolipin, 7). Die Markierung links gibt die Mobilität der Marker in Basenpaaren (Bp) an (1 und 8). Banden 2, 3 und 6 geben die Amplifikationen anderer Domänen wieder, die in dieser Arbeit nicht weiter behandelt wurden.

Die durch PCR generierten cDNA-Fragmente der verschiedenen extrazellulären Domänen wurden durch Klonierung in den pGEX-4T2-Expressionsvektor mit dem Leserahmen von GST fusioniert, wodurch eine Erkennung und Reinigung der exprimierten Fusionspeptide ermöglicht wird.

Zur Expression und Aufreinigung der rekombinanten Fusionspeptide wurden die Vektorkonstrukte in den proteasedefizienten Bakterienstamm BL21 transformiert. Die Expression der Proteine wurde mit 0,5 mM IPTG für zwei Stunden entweder bei 37 °C oder für die P0-Konstrukte bei 25 °C induziert. Anschließend wurden die Bakterien lysiert und mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt. Der Verlauf der Expression und die nachfolgenden Aufreinigungen wurden durch SDS-PAGE und Coomassie-Blue-Färbungen dokumentiert. Abbildung 19 zeigt beispielhaft die

Coomassie-Blue gefärbten SDS-Gele der aufgereinigten Fusionspeptide der extrazellulären Domänen von PMP22 (GST-PMPex1, Abb.19A) und Plasmolipin (GST-PLAex, Abb.19B). Die Gele zeigen, dass neben den gewünschten Fusionspeptiden auch Degradationsprodukte der Fusionspeptide aufgereinigt werden (Abb.19).

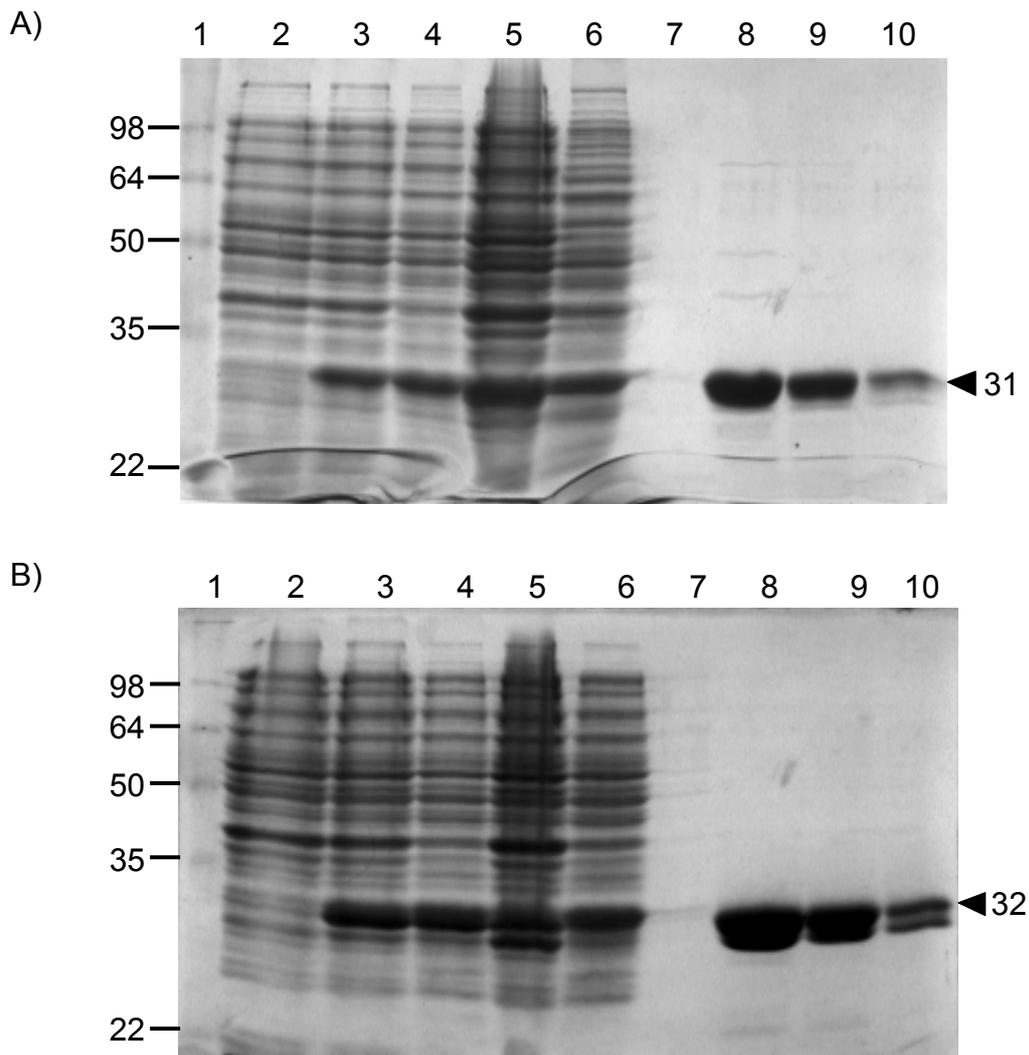


Abbildung 19: Coomassie-Blue-Gele (10% PAA) zur Darstellung der Expression und Aufreinigung von GST-Fusionspeptiden am Beispiel von GST-PMPex1 und GST-PLAex. A) GST-PMPex1 (erste extrazelluläre PMP22-Domäne) fusioniert an GST. B) GST-PLAex (zweite extrazelluläre Domäne von Plasmolipin) fusioniert an GST. Die zu erwartenden Molekulargewichte der aufgereinigten Produkte von 31kD und 32kD sind durch eine Pfeilspitze markiert. 1: Marker, 2: Vor Induktion mit IPTG, 3: Nach Induktion mit IPTG, 4:

Überstund nach Aufschluss der Bakterien, 5: Pellet nach Aufschluss der Bakterien, 6: Säulen-Durchfluss, 7:1.Waschschritt und 8-10: Elutionsschritte 1-3. Die Markierungen links demonstrieren die Mobilität der entsprechenden Molekulargewichtsmarker-Proteine in KiloDalton

3.6.1 Unterschiedliche Bindungseigenschaften der extrazellulären Domänen von PMP22

Zur Identifizierung von Protein-Domänen, die an den trans-Interaktionen von PMP22 und P0 beteiligt sein könnten, wurden GST-Fusionspeptide generiert, die die extrazellulären Domänen von P0, PMP22 oder Plasmolipin, an GST fusioniert, trugen. Die Fähigkeit dieser Fusionsproteine Adhäsion zu bewirken, wurde in dem modifizierten Zell-Adhäsions-Test untersucht. Hierzu wurden die mit spezifischen monoklonalen anti-GST-Antikörpern gekoppelten Vertiefungen von Mikrotiterplatten mit jeweils 500 ng von GST-P0ex, GST-PMPex1, GST-PMPex2, GST-PLAex oder, als zusätzliche Kontrolle, mit rekombinanten GST (rGST) inkubiert. Zu jedem dieser Fusionsproteine wurden anschließend jeweils 5000 P0, PMP, Plasmolipin überexprimierende Zellen oder nicht-transduzierte HeLa-Zellen (Wt) für 2 h hinzugegeben. Die Quantifizierung der adhärenen Zellen erfolgte wie oben beschrieben (s.3.3).

Neben der starken adhäsiven homophilen Interaktion von P0-Zellen (P0) an die aufgereinigte extrazelluläre Domäne von P0 (P0ex, 45 %, $p < 0,001$, Abb. 20), konnte eine ebenfalls distinkte und hoch signifikante heterophile Bindung von PMP22-Zellen (PMP) an die extrazelluläre Domäne von P0 (P0ex, 59 %, $p < 0,0001$, Abb.20) detektiert werden. Die Adhäsion von Plasmolipin-Zellen (PLA, Abb.20) oder der nicht-transduzierten HeLa-Zellen (Wt, Abb.20) fiel vergleichsweise sehr schwach aus und zeigte keine Signifikanz.

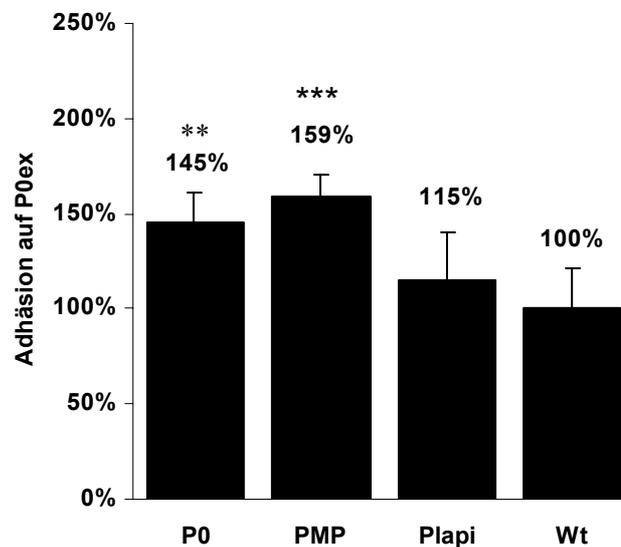


Abbildung 20: Zelladhäsion an die extrazelluläre Domäne von P0 (P0ex)

HeLa-Zellen wurden mit den cDNAs von P0, PMP22 und Plasmolipin retroviral transduziert und mit Geneticin selektioniert, um unterschiedliche HeLa-Zellpopulationen zu erhalten. Die Adhäsion von HeLa-Zellen transduziert mit P0 (P0), PMP22 (PMP), Plasmolipin (Plapi) und nicht-transduzierten Zellen (Wt) auf GST-P0ex (P0ex) beschichtetem Untergrund wurde photometrisch ermittelt (siehe Text). Die Adhäsion von nicht-transduzierten HeLa-Zellen (Wt) wurde als 100 % definiert, um die Adhäsion der anderen Zellpopulationen zu kalkulieren. Jeder Zelltyp wurde dreifach gemessen. Balken repräsentieren die Ergebnisse \pm Standardabweichung von vier verschiedenen Experimenten (***, $p < 0,0001$; **, $p < 0,001$; Signifikanzberechnung erfolgte mit Studentischem t Test).

Die Bindung von P0-Zellen an die erste extrazelluläre Domäne von PMP22 war mit 24,0 % erheblich schwächer ausgeprägt (PMPex1, $p < 0,005$, Abb. 21), als die Bindung an die eigene Domäne (Abb.20). Interessanterweise zeigten PMP22-Zellen, im Gegensatz zu P0-Zellen, eine sehr starke und hoch signifikante homophile Adhäsion an ihre eigene erste extrazelluläre Domäne (GST-PMPex1, 88 %, $p < 0,0001$, Abb. 21). Auch hier konnte keine erhöhte Bindungskapazität von Plasmolipin (PLA) exprimierenden oder nicht-transduzierten (Wt) Zellen (Abb. 21) festgestellt werden.

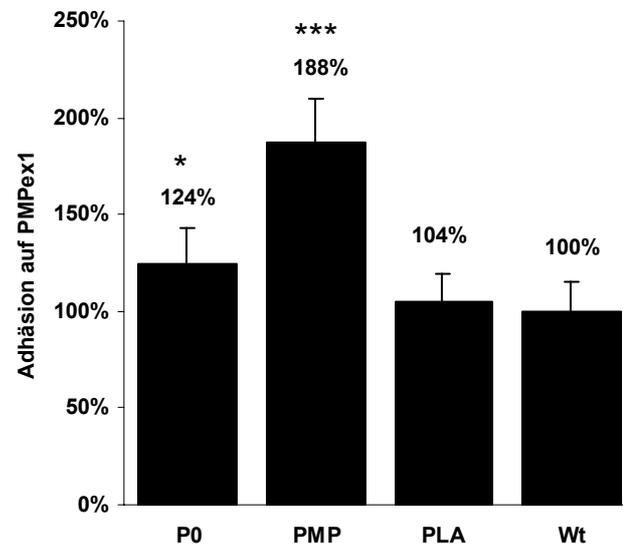


Abbildung 21: Zelladhäsion an die erste extrazelluläre Domäne von PMP22 (PMPex1)
HeLa-Zellen wurden mit den cDNAs von P0, PMP22 und Plasmolipin retroviral transduziert und mit Geneticin selektioniert, um unterschiedliche HeLa-Zellpopulationen zu erhalten. Die Adhäsion von HeLa-Zellen transduziert mit P0 (P0), PMP22 (PMP), Plasmolipin (PLA) und nicht-transduzierten Zellen (Wt) auf GST-PMPex1 (PMPex1) beschichteten Untergrund wurde photometrisch ermittelt (siehe Text). Die Adhäsion von nicht-transduzierten HeLa-Zellen (Wt) wurde als 100 % definiert, um die Adhäsion der anderen Zellen zu kalkulieren. Jeder Zelltyp wurde dreifach gemessen. Balken repräsentieren die Ergebnisse \pm Standardabweichung von vier verschiedenen Experimenten (***, $p < 0,0001$; *, $p < 0,005$; Signifikanzberechnung erfolgte mit Studentischem t Test).

Im Vergleich zur Adhäsion an die erste extrazelluläre Domäne adhären PMP22 exprimierende Zellen mit weitaus geringerer Affinität an ihre zweite extrazelluläre Domäne (PMPex2, 39 %, $p < 0,001$, Abb. 22). Dagegen konnte aber eine distinkte und hoch signifikante heterophile Adhäsion von P0-Zellen an die zweite extrazelluläre Domäne von PMP22 (PMPex2, 65 %, $p < 0,0001$, Abb. 22) detektiert werden. Auch hier zeigten Plasmolipin (PLA) exprimierende oder nicht-transduzierte (Wt) Zellen keine signifikant erhöhte Adhäsion an die zweite extrazelluläre Domäne von PMP22 (Abb. 22).

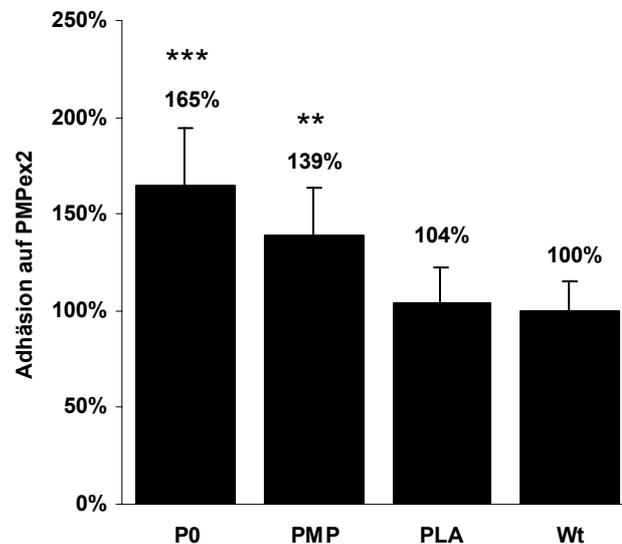


Abbildung 22: Zelladhäsion an die zweite extrazelluläre Domäne von PMP22 (PMPex2) HeLa-Zellen wurden mit den cDNAs von P0, PMP22 und Plasmolipin retroviral transduziert und mit Geneticin selektioniert, um unterschiedliche HeLa-Zellpopulationen zu erhalten. Die Adhäsion von HeLa-Zellen transduziert mit P0 (P0), PMP22 (PMP), Plasmolipin (PLA) und nicht-transduzierten Zellen (Wt) auf GST-PMPex2 (PMPex2) beschichtetem Untergrund wurde photometrisch ermittelt (siehe Text). Die Adhäsion von nicht-transduzierten HeLa-Zellen (Wt) wurde als 100 % definiert, um die Adhäsion der anderen Zellen zu kalkulieren. Jeder Zelltyp wurde dreifach gemessen. Balken repräsentieren die Ergebnisse \pm Standardabweichung von vier verschiedenen Experimenten (***, $p < 0,0001$; **, $p < 0,001$; Signifikanzberechnung erfolgte mit Studentischem t Test).

In keinem der Experimente konnte eine signifikante Bindung von PMP22- oder P0-Zellen an die zweite extrazelluläre Domäne von Plasmolipin (PLAex, Abb. 23) gefunden werden. Auch eine homophile Adhäsion von Plasmolipin-Zellen an die eigene zweite extrazelluläre Domäne (PLAex) zeigte mit 8 % ($p > 0,005$, Abb. 23) keine signifikante Erhöhung und konnte somit ausgeschlossen werden.

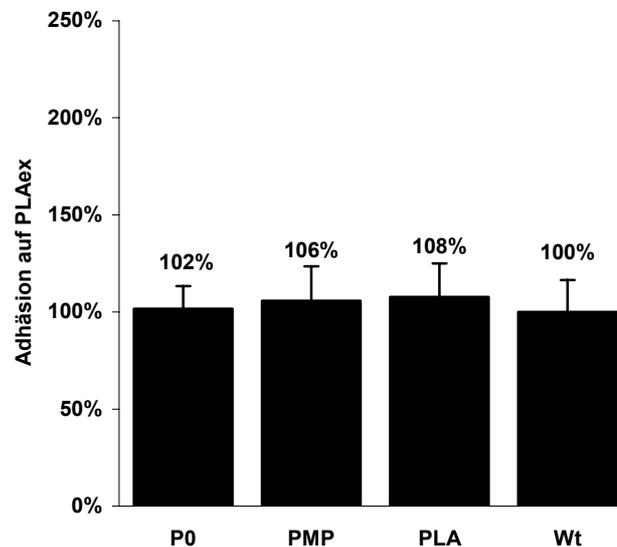


Abbildung 23: Zelladhäsion an die zweite extrazelluläre Domäne von Plasmolipin (PLAex) HeLa-Zellen wurden mit den cDNAs von P0, PMP22 und Plasmolipin retroviral transduziert und mit Geneticin selektioniert, um unterschiedliche HeLa-Zellpopulationen zu erhalten. Die Adhäsion von HeLa-Zellen transduziert mit P0 (P0), PMP22 (PMP), Plasmolipin (PLA) und nicht-transduzierten Zellen (Wt) auf GST-PLAex (PLAex) beschichtetem Untergrund wurde photometrisch ermittelt (siehe Text). Die Adhäsion von nicht-transduzierten HeLa-Zellen (Wt) wurde als 100 % definiert, um die Adhäsion der anderen Zellen zu kalkulieren. Jeder Zelltyp wurde dreifach gemessen. Balken repräsentieren die Ergebnisse \pm Standardabweichung von vier verschiedenen Experimenten.

Da alle aufgereinigten Fusionspeptide mit GST fusioniert waren, wurde als zusätzliche Kontrolle die Adhäsion der vier unterschiedlichen Zellpopulationen auf rekombinantem GST (rGST, Abb.24) gemessen. Die nur sehr schwach erhöhten Adhäsionswerte von P0-Zellen (12 %, Abb.24) und PMP22-Zellen (7 %, Abb.24) zeigten keine statistische Signifikanz.

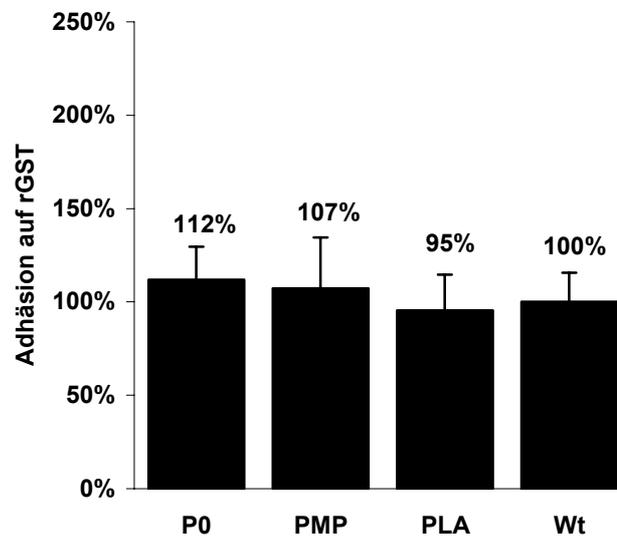


Abbildung 24: Zelladhäsion an rekombinantes GST (rGST)

HeLa-Zellen wurden mit den cDNAs von P0, PMP22 und Plasmolipin retroviral transduziert und mit Geneticin selektioniert, um unterschiedliche HeLa-Zellpopulationen zu erhalten. Die Adhäsion von HeLa-Zellen transduziert mit P0 (P0), PMP22 (PMP), Plasmolipin (PLA) und nicht-transduzierten Zellen (Wt) auf rGST beschichtetem Untergrund wurde photometrisch ermittelt (siehe Text). Die Adhäsion von nicht-transduzierten HeLa-Zellen (Wt) wurde als 100 % definiert, um die Adhäsion der anderen Zellen zu kalkulieren. Jeder Zelltyp wurde dreifach gemessen. Balken repräsentieren die Ergebnisse \pm Standardabweichung von vier verschiedenen Experimenten.

Diese Ergebnisse bestätigen zum einen die Daten der Zell-Zell-Adhäsionsexperimente und liefern zusätzlich sehr starke Hinweise dafür, dass die heterophile trans-Interaktion von P0- und PMP22-Proteinen überwiegend durch die zweite Domäne von PMP22 vermittelt wird, während die homophile trans-Interaktion von PMP22 Proteinen größtenteils über die erste extrazelluläre Domäne vermittelt wird. Weder Plasmolipin exprimierende Zellen, noch nicht-transduzierte Zellen zeigen eine erhöhte Bindung zu den untersuchten Proteindomänen (Abb.20-24).

3.6.2 Detektion von direkten homophilen und heterophilen Protein-Interaktionen

Um zu klären, ob die in dem Adhäsions-Test beobachteten Interaktionen zwischen Zelle und Protein über direkte Protein-Protein-Interaktionen der extrazellulären Domänen von PMP22 und P0 mit dem jeweiligen zellulären Protein vermittelt wird, wurde ein GST-Bindungs-Test etabliert. Für die direkten Bindungs-Studien wurden frisch präparierte, nicht aufgereinigte Bakterien-Zelllysate von den an GST fusionierten extrazellulären Domänen von P0 (GST-P0ex), PMP22 (GST-PMPex1 und GST-PMPex2) und Plasmolipin (GST-PLAex) hergestellt. Die Fusionsproteine wurden an Glutathion-Sepharose gebunden und jeder Ansatz wurde separat mit frisch präpariertem Lysat von P0- oder PMP22-Zellen inkubiert. Die auf diese Weise präzipitierten zellulären Proteine wurden durch SDS-PAGE fraktioniert und mittels Westernblot analysiert. Zuerst wurde geprüft, ob jedes GST-Fusionsprotein an die Glutathion-Sepharose gebunden hat, da diese Bindung Voraussetzung für eine mögliche Ko-Bindung zellulärer Proteine ist. Abbildung 25 zeigt die Westernblot-Analyse mit einem anti-GST-Antikörper und bestätigt, dass alle verwendeten Fusionsproteine (Doppelbestimmung, da jedes Fusionspeptid mit Proteinlysaten aus transduzierten P0- und PMP22-Zellpopulationen getestet wurde) an die Glutathion-Sepharose gebunden habe.

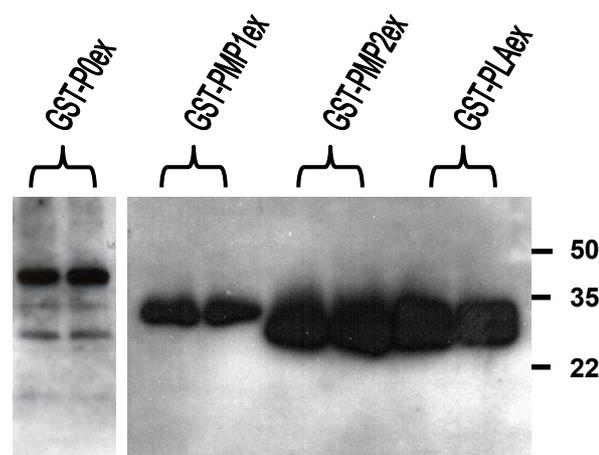


Abbildung 25: Westernblot-Analyse der GST-Fusionspeptide. Bakterien wurden zwei Stunden nach IPTG-Induktion der GST-Fusionspeptid-Expression lysiert und die GST-Fusionspeptide an Glutathion-Sepharose gebunden. Nach Inkubation

der gebundenen Fusionspeptide mit Gesamtproteinlysaten aus PMP22- oder P0-transduzierten Zellen wurden die Proteinkomplexe durch Aufkochen denaturiert und im Westernblot auf das Vorhandensein von GST-Fusionspeptiden mit α GST analysiert. Jedes Fusionspeptid wurde doppelt aufgetragen. GST-P0ex, 40 kD, extrazelluläre Domäne von P0; GST-PMPex1, 31 kD, erste extrazelluläre Domäne von PMP22; GST-PMPex2, 29 kD, zweite extrazelluläre Domäne von PMP22 und GST-PLAex, 32 kD, zweite extrazelluläre Domäne von Plasmolipin. Die Markierungen demonstrieren die Mobilität der entsprechenden Molekulargewichtsmarker-Proteine in KiloDalton.

Nachfolgende Westernblot-Analysen mit einem P0-spezifischen Antikörper (Abb. 26A) zeigen eine direkte Bindung von P0 sowohl an die eigene extrazelluläre Domäne (GST-P0ex) in homophiler Interaktion als auch an die zweite Domäne von PMP22 (GST-PMPex2) in heterophiler Interaktion. Es konnten keine Interaktionen von P0 mit GST-PMPex1 oder mit GST-PLAex in diesem Test detektiert werden. Weitere Analysen mit einem anti-PMP22-Antikörper (Abb. 26B) enthüllten die direkten Assoziationen von PMP22 mit der extrazellulären Domäne von P0 (GST-P0ex) in heterophiler Bindung und mit der eigenen ersten Domäne (GST-PMPex1) in homophiler Bindung. An Glutathion-Sepharose gebundenes GST-PMPex2 oder GST-PLAex verursachte keine Bindung an PMP22.

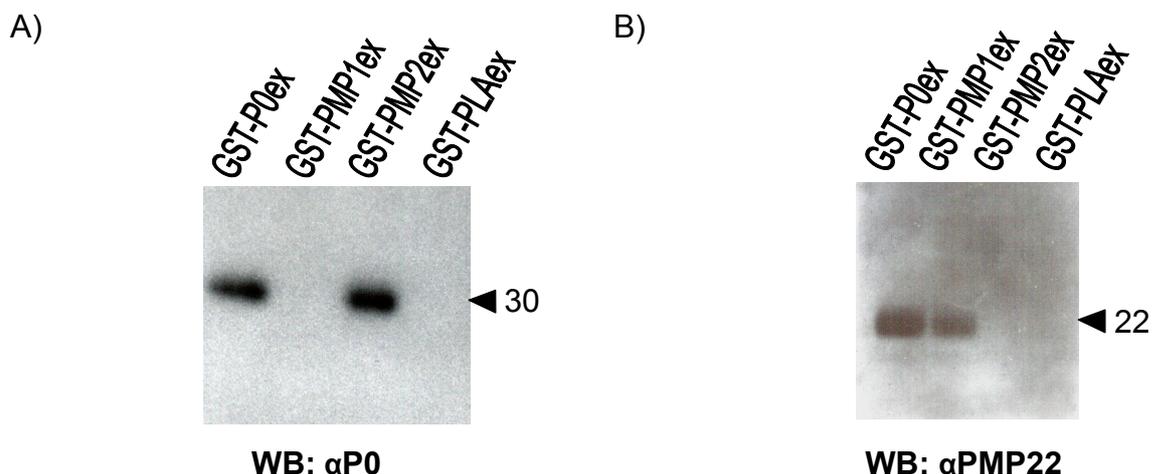


Abbildung 26: Westernblot-Analyse der gebundenen zellulären Proteine.

Bakterien wurden zwei Stunden nach Induktion der GST-Fusionspeptid-Expression lysiert und die Fusionspeptide an Glutathion-Sepharose gebunden. Nach Inkubation eines jeden Fusionspeptides mit Proteinlysaten aus PMP22- oder P0-transduzierten Zellen, wurden die Proteinkomplexe durch Aufkochen denaturiert und im Westernblot (WB) mit A) α P0 und B)

α PMP22 analysiert. A) zeigt die Bindung von zellulärem P0-Protein an GST-P0ex (extrazelluläre Domäne von P0) und GST-PMPex2 (zweite extrazelluläre Domäne von PMP22). GST-PMPex1 (erste extrazelluläre Domäne von PMP22) oder GST-PLAex (zweite extrazelluläre Domäne von Plasmolipin) verursachten keine Bindung von zellulärem PMP22 oder P0. B) zeigt die Bindung von zellulärem PMP22-Protein an GST-P0ex (extrazelluläre Domäne von P0) und GST-PMPex1 (zweite extrazelluläre Domäne von PMP22). GST-PMPex2 (zweite extrazelluläre Domäne von PMP22) oder GST-PLAex (zweite extrazelluläre Domäne von Plasmolipin) verursachten keine Bindung von zellulärem PMP22 oder P0. Die Pfeilspitzen markieren die gebundenen Proteine P0 (A) und PMP22 (B) mit ihren Molekulargewichten in Kilo Dalton.

3.6.3 Mutationen in der extrazellulären Domäne von P0 beeinträchtigen die homophilen und heterophilen Interaktionen von P0 und PMP22

In einem nächsten Schritt wurde untersucht, ob klinisch relevante CMT1 oder DSS assoziierte Mutationen des P0 Proteins die heterophile Adhäsion an PMP22 und/oder die homophile Adhäsion an P0 beeinträchtigen. Zu diesem Zweck wurden drei weitere GST-Fusionspeptide mit spezifischen Mutationen in der extrazellulären Domäne von P0 mittels PCR-Mutagenese generiert und mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt. Die folgenden Aminosäuresubstitutionen wurden vorgenommen und untersucht: Val32Phe (P0mut1), Tyr68Cys (P0mut2) und Cys128Tyr (P0mut3). Alle drei Mutationen wurden in Patienten mit CMT1- und DSS-Neuropathien beschrieben und führen zu einer starken Beeinträchtigung der Myelinschicht im peripheren Nervensystem (Sorour et al., 1998; Haites et al., 1998 und Nelis et al., 1999). Der Adhäsions-Test wurde wie oben beschrieben durchgeführt, allerdings wurde hier nur die Adhäsion von P0- und PMP22-Zellen auf mutiertes und zur Kontrolle auf nicht-mutiertes P0-Fusionspeptid gemessen. Abbildung 27 zeigt eine schematische Darstellung der positionsbezogenen P0-Mutationen, die in die extrazelluläre Domäne eingefügt wurden.

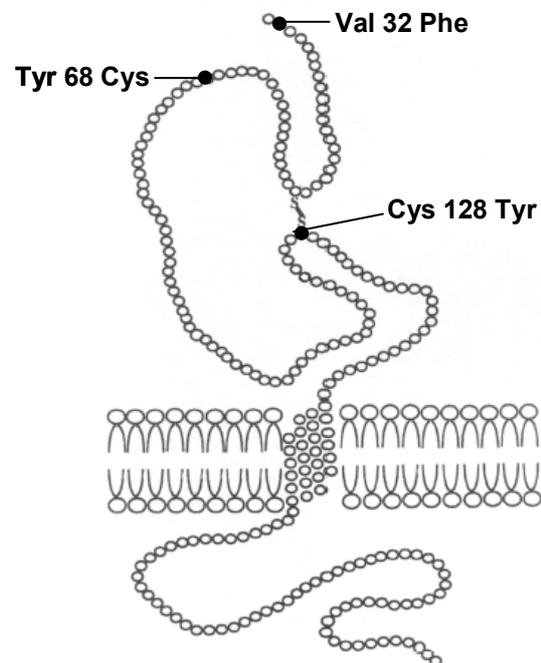


Abbildung 27: Schematische Darstellung der Proteinstruktur von P0

Die drei untersuchten Mutationen sind positionsbezogen mit den vorgenommenen Aminosäuresubstitutionen in der extrazellulären Domäne von P0 markiert. Val: Valin, Phe: Phenylalanin, Cys: Cystein, Tyr: Tyrosin, die Zahlen geben die Positionen in der Aminosäuresequenz an. Abbildung wurde modifiziert nach Filbin et al., 1993.

Die Adhäsion von P0 exprimierenden Zellen an das P0mut1-GST-Fusionsprotein, das die Val32Phe Substitution trägt (Abb. 28), zeigt eine hoch signifikante Reduktion in der Fähigkeit, homophile Interaktionen auszubilden. Eine ähnliche, aber geringfügig stärkere Reduktion von ca. 75 % gegenüber der Adhäsion an nicht-mutiertes Fusionspeptid (P0ex, Abb. 29) konnte bei der Adhäsion des mutierten P0mut3-Fusionspeptid (Cys128Tyr) detektiert werden. Auch die Tyr68Cys-Mutation (P0mut2) führte, verglichen mit der Adhäsion von P0-Zellen an nicht-mutiertes P0 (P0ex, Abb. 28), zu einer ausgeprägten Reduktion in der Bildung von homophilen Interaktionen mit P0-Zellen (Abb. 28).

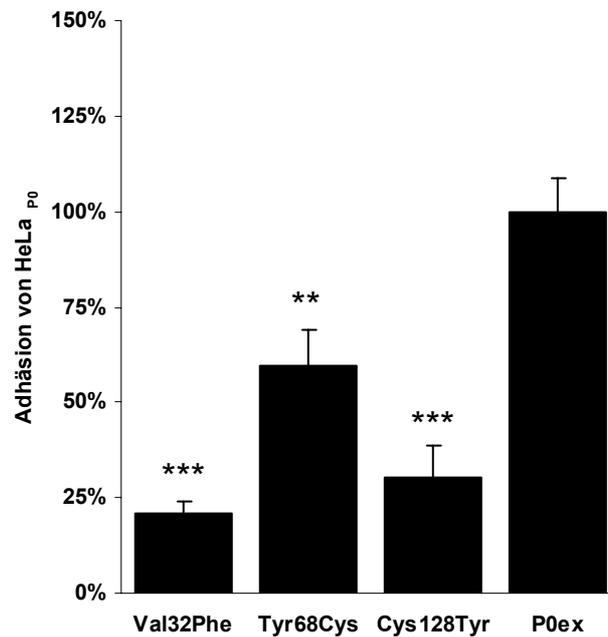


Abbildung 28: Adhäsion von HeLa_{P0} an mutierte GST-Fusionspeptide

HeLa-Zellen wurden mit der cDNA von P0 retroviral transduziert und mit Geneticin selektiert, um eine P0-HeLa-Zellpopulation zu erhalten. Die Adhäsion von HeLa-Zellen transduziert mit P0 (HeLa_{P0}), auf Untergrund beschichtet mit drei verschiedenen mutierten und nicht-mutierten GST-Fusionspeptiden der extrazellulären Domäne von P0, wurde photometrisch ermittelt (siehe Text). Folgende Aminosäuresubstitutionen wurden eingefügt und getestet: P0mut1:Val32Phe, P0mut2:Tyr68Cys und P0mut3:Cys128Tyr. Die Adhäsion von HeLa_{P0} auf die nicht-mutierte extrazelluläre Domäne von P0 (P0ex) wurde als 100 % definiert, um die Adhäsion auf die mutierten Proteine zu kalkulieren. Jedes GST-Fusionspeptid wurde sechsfach gemessen. Balken repräsentieren die Ergebnisse \pm Standardabweichung von drei verschiedenen Experimenten (***, $p < 0,0001$; **, $p < 0,001$; Signifikanzberechnung erfolgte mit Studentischem t Test).

Die gleichen Aminosäureaustausche in der extrazellulären Domäne von P0 wurden auf ihr Vermögen, heterophile Interaktionen auszubilden, getestet. Die Mutation P0mut2 bewirkte eine ebenso starke Verminderung in der heterophilen Interaktion mit PMP22-Zellen (Abb. 29), wie in der homophilen Interaktion mit P0-Zellen (Abb. 28). Im Vergleich zur Adhäsion an nicht-mutiertes P0 verhinderte die Mutation P0mut3 (Abb. 29) nahezu eine heterophile Interaktion mit PMP22-Zellen. Dagegen führte die Substitution von Val32Phe nur zu einer sehr geringen Veränderung der heterophilen Bindung von PMP22-Zellen an P0-mut1 (Abb. 29).

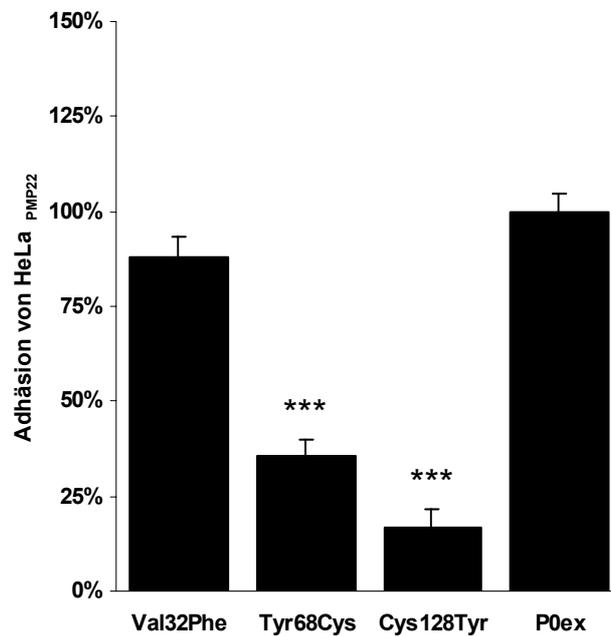


Abbildung 29: Adhäsion von HeLa_{PMP22} an mutierte GST-Fusionspeptide

HeLa-Zellen wurden mit der cDNA von PMP22 retroviral transduziert und mit Geneticin selektioniert, um eine PMP22-HeLa-Zellpopulation zu erhalten. Die Adhäsion von PMP22-überexprimierenden Zellen (HeLa_{PMP22}) auf die verschiedenen mutierten und nicht-mutierten GST-Fusionspeptide der extrazellulären Domäne von P0, wurde photometrisch ermittelt (siehe Text). Folgende Aminosäuresubstitutionen wurden eingefügt und getestet: P0mut1:Val32Phe, P0mut2:Tyr68Cys und P0mut3:Cys128Tyr. Die Adhäsion von HeLa_{PMP22} auf die nicht-mutierte extrazelluläre Domäne von P0 (P0ex) wurde als 100 % definiert, um die Adhäsion auf die mutierten Proteine zu kalkulieren. Jedes GST-Fusionspeptid wurde sechsfach gemessen. Balken repräsentieren die Ergebnisse \pm Standardabweichung von drei verschiedenen Experimenten (***, $p < 0,0001$; Signifikanzberechnung erfolgte mit Studentischem *t* Test).

Die vorliegenden Ergebnisse demonstrieren deutlich, dass die drei untersuchten Krankheits-assoziierten Mutationen in der extrazellulären Domäne von P0, die heterophile und die homophile adhäsive trans-Interaktion von PMP22 und P0 Proteinen unterschiedlich beeinträchtigen.

4 Diskussion

Myelin ist eine hoch spezialisierte Plasmamembran, die Segmente von Axonen umwickelt und als Isolator die saltatorische Propagation der Impulsfortleitung entlang der Nerven ermöglicht. Wenn es durch Krankheit oder Läsion zerstört wird, oder durch Defekte im genetischen Programm nicht normal gebildet werden kann, führt dies zu neurologischen Symptomen, einschließlich motorischer und sensorischer Defizite. Während der postnatalen Entwicklung des PNS hören Schwannzellen auf sich zu teilen und beginnen die Umwicklung der Axone in einer losen Spirale. Während die Myelinisierung voran schreitet, werden bis zu 100 dieser Spiralen gebildet und kompaktiert, was zu der typischen multilamellaren Struktur des Myelins führt. Die Kompaktierung der Myelinlamellen ist ein kritisches Ereignis für die korrekte Funktion des Myelins. Die Myelinmembran besteht zum Größtenteil aus Lipiden und enthält ein spezifisches Set an Proteinen. Die Hauptproteine und Lipidkomponenten des Myelins sind gut charakterisiert, aber die molekularen Interaktionen dieser Myelinproteine, sowohl untereinander als auch mit Lipiden der Membran, sind bisher weitgehend unverstanden, obwohl die präzise Anordnung der peripheren und integralen Membranproteine eine funktionelle Bedeutung nahe legt. Unbekannt ist auch, wie die Assemblierung dieser Myelinmembranen vollzogen wird und wie diese multilamellaren Strukturen zusammengehalten werden. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Interaktionen der peripheren Myelinproteine PMP22 und P0 näher zu charakterisieren und Hinweise darauf zu erhalten, inwiefern diese Interaktionen an der Bildung und Erhaltung des Myelins peripherer Nerven beteiligt sind. Wichtige Erkenntnisse über die molekulare Konfiguration und biologische Funktion dieser Interaktion fehlten bisher weitestgehend. Interaktionsstudien sowie neue Erkenntnisse über die Verteilung der Proteine im Myelin und den Aufbau von Myelinmembranen ermöglichen die Entwicklung eines Modells, um die Funktionen der gefundenen Interaktionen von PMP22 und P0 sowohl im normalen als auch im pathologischen Zustand zu beschreiben.

4.1 Die homophilen und heterophilen adhäsiven trans-Interaktionen von PMP22 und P0

Frühere Studien konnten P0 als ein Transmembranprotein mit homophiler Adhäsionskapazität identifizieren (D'Urso et al., 1990; Filbin et al., 1990; Schneider-Schaulies et al., 1990). Durch Röntgenstrukturanalyse konnte gezeigt werden, dass die extrazelluläre Domäne von P0 Homotetramere bildet, die in der Membran in cis- und trans-Konfiguration interagieren (Shapiro et al., 1996). Inoyue und Mitarbeiter (1999) bestätigten, dass auch das vollständige P0-Protein Homotetramere bildet die homophil in cis und trans interagieren. Zusätzlich wurde gezeigt, dass die sehr basische intrazelluläre Domäne von P0 elektrostatische Interaktionen mit dem Zytoskelett (Wong und Filbin, 1996) und mit Lipiden der Myelinmembran (Ding und Brunden, 1994) eingeht und so die Adhäsion der intrazellulären Schichten des kompakten Myelins vermitteln könnte. Diese Daten führten zu der Hypothese, dass die Myelinmembran an den IPLs („Intra Period Lines“) durch homophile Interaktionen der extrazellulären Domänen von P0, und an den MDLs („Major Dense Lines“) durch heterophile Interaktionen der zytoplasmatischen Domäne von P0 mit Lipiden zusammengehalten werden könnten. In dieser Arbeit konnte die adhäsive, homophile trans-Interaktion von P0-Proteinen, vermittelt durch die extrazelluläre Domäne, mit drei unterschiedlichen Testsystemen basierend auf Zell-Zell-, Zell-Protein- und Protein-Protein-Interaktionen experimentell bestätigt werden. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass P0 auch spezifisch mit der zweiten extrazellulären Domäne von PMP22 interagiert. Die adhäsive heterophile trans-Interaktion wird durch die spezifische Bindung von P0-Zellen und von P0-Protein an die zweite extrazelluläre Domäne von PMP22 (Abb.22) und durch spezifische Bindung von PMP22-Zellen und Protein an die extrazelluläre Domäne von P0 (Abb.20) vermittelt. Diese Daten bestätigen die frühere Beobachtung, dass PMP22 und P0 im Myelin peripherer Nerven und in rekombinanten HeLa-Zellen, die beide Proteine koexprimieren, interagieren können (D'Urso et al., 1999).

Frühere Experimente lieferten Hinweise darauf, dass PMP22 sowohl Homodimere als auch Oligomere in der Myelinmembran bilden kann (Tobler et al., 1999; Ryan et

al., 2000). Aber bisher wurden weder die beteiligten Proteindomänen noch die notwendigen Konfigurationen dieser homophilen Interaktion identifiziert. In dieser Arbeit konnte durch die drei angewandten Testsysteme erstmals gezeigt werden, dass PMP22-Proteine adhäsive homophile trans-Interaktionen bilden (Abb.15 und 21), die im Gegensatz zur heterophilen trans-Interaktion von PMP22 und P0, überwiegend durch die erste extrazelluläre Domäne von PMP22 (Abb.21) vermittelt werden. Die detektierte Adhäsionskapazität von PMP22 stimmt mit der vor kurzem gemachten Beobachtung überein, dass PMP22 in interzellulären Kanälen von Epithel-Zellen lokalisiert ist, in denen es die Bildung von Zell-Zell-Kontakten und/oder die Stabilisierung von Membrankontakten vermitteln soll (Notterpek et al., 2001). Bei den wesentlich schwächer ausgeprägten Adhäsionen von PMP22-Zellen an die eigene zweite extrazelluläre Domäne (Abb.22) und von P0-Zellen an die erste extrazelluläre Domäne von PMP22 (Abb.21) könnte es sich um transiente Assoziationen handeln. Denkbar wäre, dass diese leichten Assoziationen zur Stabilisierung der eigentlichen Interaktionen dienen.

Interessanterweise konnte weder eine heterophile Protein-Protein-Interaktion zwischen PMP22 und Plasmalipin bzw. P0 und Plasmalipin, noch eine homophile Plasmalipin Interaktion detektiert werden. Dies ist ein weiterer starker Hinweis darauf, dass die gefundenen molekularen Interaktionen zwischen PMP22 und P0 spezifisch sind. Da die präzise Stöchiometrie der homophilen und heterophilen PMP22 und P0 trans-Komplexe hier nicht quantifiziert wurde, wäre es denkbar, dass P0-Monomere oder P0-Tetramere mit PMP22-Dimeren oder auch PMP22-Oligomeren in heterophiler trans-Konfiguration Proteinkomplexe bilden. Die Existenz von PMP22-Oligomeren als auch die Bildung von P0-Tetrameren konnte kürzlich gezeigt werden (Shapiro et al., 1996; Inoyue et al., 1999; Tobler et al., 1999). Die Formierung oder Existenz ähnlicher Komplexe in cis-Konfiguration kann anhand der erhobenen Daten ebenfalls nicht ausgeschlossen werden.

4.2 Der Einfluss von Glykosylierungen auf die homophilen und heterophilen adhäsiven trans-Interaktionen von PMP22 und P0

Bei der Adhäsion von P0-Zellen an die eigene extrazelluläre Domäne des GST-Fusionspeptids (Abb.20) wurde im Vergleich mit der Zell-Zell-Interaktion von P0-Zellen (Abb.14) eine Abschwächung der Adhärenz beobachtet. Allerdings konnte sehr wohl eine direkte Protein-Protein-Interaktion von rekombinanten P0-Fusionspeptid mit zellulärem P0-Protein detektiert werden (Abb.26A). Mögliche Erklärungen für die beobachtete Abnahme der homophilen P0-P0-Adhäsion wären zum einen die fehlende Glykosylierung in der extrazellulären Domäne von P0 und/oder die fehlende intrazelluläre P0-Domäne. Beide Proteine, PMP22 und P0 sind glykosylierte Transmembranproteine die eine Zuckerseitenkette in ihrer extrazellulären Domäne tragen und es wird vermutet, dass diese adhäsiven Protein-Protein-Interaktionen vermitteln können (Griffith et al., 1992). Die beiden gemeinsame L2/HNK1-Zuckerseitenkette ist bei PMP22 kovalent über das Stickstoffatom von Asparagin 41 an die erste extrazelluläre Domäne gebunden (Manfioletti et al., 1990; Snipes et al., 1992b) und bei P0 über Asparagin 93 (Lemke und Axel, 1985; Bollensen und Schachner, 1987). Sowohl für die homophile P0-P0- (Griffith et al., 1992; Shapiro et al., 1996) als auch für die heterophile PMP22-P0-Interaktion (D`Urso et al., 1999) konnte gezeigt werden, dass die Glykosylierung für die direkte Interaktion nicht benötigt wird. Andererseits wird vermutet, dass die Zuckerseitenkette für die homophile Adhäsion von P0-Proteinen funktionell wichtig sei (Filbin und Tennekoon, 1991) und dass alle P0-Moleküle glykosyliert sein müssen, um Adhäsion zu bewirken (Filbin und Tennekoon, 1993). Die hier gezeigten Bindungsstudien wurden entweder mit nicht-glykosylierten rekombinanten Proteinen, aufgereinigt aus einem bakteriellen Expressionssystem, und mit rekombinanten Proteinen, exprimiert in nicht-neuralen Zellen, durchgeführt. Da eine signifikante, homophile Adhäsion von P0 detektiert werden konnte (Abb.20) ist ein großer Einfluss der Glykosylierung auf die Adhäsion auszuschließen. Bestärkt wird diese Vermutung dadurch, dass P0 unterschiedlich glykosyliert werden kann (Bollensen und

Schachner, 1987; Voshol et al., 1996) und bisher nicht gezeigt werden konnte, welche Art der Glykosylierung bei der homophilen Adhäsion von P0 eine Rolle spielen könnte. Weiterhin ist nicht anzunehmen, dass rekombinant exprimiertes P0-Protein in HeLa-Zellen mit der für das Myelin charakteristischen Zuckerseitenkette modifiziert wird.

Einen stärkeren Einfluss auf die homophile Adhäsion von P0 hat vermutlich das Fehlen der intrazellulären Domäne am P0-Fusionspeptid. Da diese Domäne elektrostatische Wechselwirkungen mit dem Zytoskelett eingeht (Wong und Filbin, 1996), könnte ein Fehlen dieser Domäne zu einer leichten Destabilisierung von homophilen P0-Komplexen führen, was sich in einer geringen Abnahme der Adhäsionskapazität bemerkbar machen könnte. Weiterhin wurde kürzlich demonstriert, dass Serine der intrazellulären Domäne von P0 durch Protein Kinase C (PKC) phosphoryliert werden. Eine Zerstörung dieser Serine durch Mutation bewirkte eine starke Beeinträchtigung der homophilen P0-Adhäsion in L-Zellen (Xu et al., 2001). Dass dieser Effekt, in dem hier angewandten Testsystem, nicht stärker ausfällt könnte daran liegen, dass die P0-Proteine in den HeLa-Zellen phosphoryliert werden und somit die Wechselwirkungen mit dem Zytoskelett weiterhin ausüben könnten. Diese Stabilisierung würde dann nur auf Seiten der P0-Fusionspeptide fehlen.

Für die Bildung der heterophilen P0-PMP22 trans-Interaktionen ist ein wesentlicher Einfluss der Glykosylierung und ein Einfluss der Phosphorylierung indirekt auszuschließen, da die Adhäsion von PMP22 an rekombinantes, nicht-glykosyliertes und nicht-phosphoryliertes P0-Fusionspeptid sowie die Adhäsion von P0 an die zweite extrazelluläre Domäne von PMP22 nahezu identische Werte zeigen (Abb.20 und 22). Auch für die homophile Adhäsion von PMP22 an die im Myelin glykosyliert vorliegende erste extrazelluläre Domäne von PMP22 konnte kein Effekt aufgrund der fehlenden Glykosylierung detektiert werden (Abb.21). Weitere Hinweise hierzu liefern Tobler und Mitarbeiter (1999) die zeigen konnten, dass die Glykosylierung von PMP22 zur Bildung von Homodimeren nicht erforderlich ist.

Basierend auf diesen Daten kann ein neues Modell der Protein-Protein-Interaktionen im peripheren Myelin postuliert werden (Abb. 30). Die in dieser Arbeit

charakterisierten adhäsiven homophilen und heterophilen trans-Interaktionen von PMP22 und P0 könnten eine wichtige Rolle in der Adhäsion von benachbarten Membranschichten im kompakten Myelin peripherer Nerven spielen.

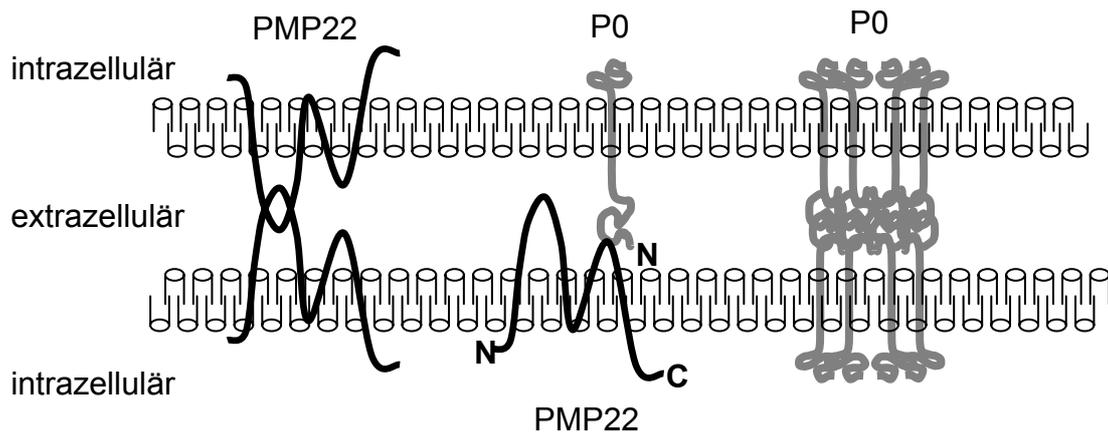


Abbildung 30: Schematische Darstellung der drei postulierten homophilen und heterophilen adhäsiven trans-Interaktionen von PMP22 und P0 im Myelin peripherer Nerven. N: N-terminus und C: C-Terminus

4.3 Der Einfluss von Krankheits-assoziierten Mutationen auf die adhäsive heterophile und homophile trans-Interaktion von P0 und PMP22

Durch das Einfügen von spezifischen CMT1B- und DSS-assoziierten Mutationen in die extrazelluläre Domäne von GST-P0-Fusionspeptiden konnte gezeigt werden, dass beide trans-Interaktionen von P0 und PMP22, die heterophile und die homophile, unterschiedlich beeinträchtigt werden. Der Aminosäureaustausch in der N-terminalen Region von P0 (Val32Phe, P0mut1, Abb.28) verursachte eine starke Reduktion in der homophilen Bindung von P0-Zellen, hatte aber nur einen minimalen Effekt auf die heterophile Interaktion mit PMP22. Diese Beobachtung liefert einen starken Hinweis darauf, dass der N-Terminus von P0 eine wichtige funktionelle

Bedeutung für die homophile trans-Interaktion von P0-Proteinen (Abb.28) aufweist. Im Gegensatz dazu führte die Zerstörung der Disulfidbrücke durch den Austausch des Cysteins gegen ein Tyrosin, in der extrazellulären Domäne von P0 (Cys128Tyr), zu einer weitgehenden Verhinderung beider Bindungen, der homophilen und der heterophilen. Daraus lässt sich der Schluss ziehen, dass die Ausbildung der Immunglobulin-ähnlichen Domäne eine fundamentale funktionelle Voraussetzung ist, um beide Arten der P0-Interaktion einzugehen. Die Bedeutung der Immunglobulin-Domäne für die Adhäsion von P0 steht im Einklang mit der kürzlich gemachten Beobachtung, dass P0 mutiert am Cystein 21, welches ebenfalls an der Bildung der Disulfidbrücke beteiligt ist, sich nicht mehr wie ein Adhäsionsmolekül verhält (Zhang und Filbin, 1994). Zusätzlich konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass Konformationsänderungen in dieser Region, verursacht durch das Einfügen eines zusätzlichen Cysteins (Tyr68Cys), einen stärkeren negativen Einfluss auf die heterophile Adhäsion von PMP22 (Abb.29) haben, als auf die homophile Interaktion von P0 (Abb.28). Dies ist ein Hinweis darauf, dass die heterophile Interaktion mit PMP22 wesentlich empfindlicher auf Veränderungen oder Modifikationen der Immunglobulin-Domäne reagiert, als die homophile Interaktion (Abb.29). Insgesamt deuten die Ergebnisse darauf hin, dass Veränderungen im P0-Protein, welche die Ausbildung von homophilen und heterophilen Protein-Komplexen stören, zu einer Destabilisierung der Myelinstruktur und infolge dessen zu einer Erkrankung an CMT1B oder DSS führen könnten.

Aufgrund der gefundenen unterschiedlichen Beeinträchtigungen der heterophilen und homophilen Interaktionen von P0 und PMP22 lassen sich Korrelationen zwischen den hier getesteten P0-Mutationen bzw. den gefundenen Effekten und der Schwere der Erkrankung aufstellen. Die Mutation Val32Phe zeigte die geringsten Auswirkungen und beeinträchtigt nur die homophile Interaktion von P0 sehr stark. Diese Mutation wurde in Patienten beschrieben, die an CMT1B erkrankt sind (Haites et al., 1998). Die Mutation Tyr68Cys wurde in Patienten gefunden, die an einer schweren Form von CMT1B erkrankt sind (Sorour et al., 1998). Im Gegensatz zur Val32Phe-Mutation führte diese zu einer extrem starken Beeinträchtigung der heterophilen Interaktion mit PMP22 und zu einer starken Reduktion der homophilen

Interaktion mit P0. Die dritte getestete Mutation (Cys128Tyr) affiziert beide Interaktionen extrem stark und wurde in Patienten beschrieben, die an DSS erkrankt sind, eine der sehr schwer verlaufenden Variante der peripheren Neuropathien (Haite et al., 1998). Alle drei Mutationen führen zu einer Beeinträchtigung der Myelinschicht des peripheren Nervensystems bei den betroffenen Patienten (Nelis et al., 1999). Aber leider sind keine histopathologischen Daten zur Myelinstruktur dieser Patienten verfügbar. Zur Unterscheidung der Schwere der Erkrankungen werden heutzutage keine Nervenbiopsien mehr durchgeführt, sondern der Beginn der Erkrankung und die Verlangsamung der Nervenleitgeschwindigkeiten bestimmt. Hierbei korrelieren der frühe Beginn der Erkrankung und die Stärke der Verlangsamung der Nervenleitgeschwindigkeit mit der Schwere der Verlaufsform bzw. der Art der Erkrankung. Je langsamer die Nervenleitgeschwindigkeit ist desto stärker ist die Myelinschicht in den betroffenen Patienten beeinträchtigt. Leider werden bei diesen Kriterien keine eindeutigen Grenzen gezogen, die eine Unterscheidung von z.B. DSS und schwerer Form von CMT1B ermöglichen. Dies führt dazu, dass identische Mutationen sowohl mit schwerer CMT1B als auch mit DSS assoziiert werden (Nelis et al., 1998). Das Fehlen von strikten diagnostischen Kriterien verhindert somit eine zuverlässige Genotyp-Phänotyp-Korrelation (Nelis et al., 1998).

Das hier etablierte und angewandte Testsystem könnte eine wirkungsvolle Methode zur Aufstellung von Genotyp-Phänotyp-Korrelationen bei Erkrankung an CMT1B, schwerer Form von CMT1B und DSS darstellen, da dieser Test es ermöglicht, Mutationen der extrazellulären Domäne von P0 auf funktionelle Aktivität hin zu untersuchen und deren Auswirkung eindeutig mit der Schwere der Erkrankung korrelieren kann. Allerdings stellt sich hier die Frage, inwiefern dieses Testsystem der tatsächlichen Situation im pathologischen Myelin entspricht. Bisher wurden keine Mutationen beschrieben, die beide Allele der Patienten betreffen, also homozygot vorliegen. Die hier getestete Situation entspricht einer Untersuchung von homozygot vorliegenden Mutationen. Aber auch eine Untersuchung von heterozygot vorliegenden Mutationen, zum Beispiel durch Mischung der mutierten und nicht-mutierten P0-Konstrukte, zu gleichen Teilen, würde die eigentliche Situation im

Myelin nicht zwangsläufig wiedergeben. Einige der bisher untersuchten Mutationen in der extrazellulären Domäne von P0 akkumulieren im Zytoplasma und werden somit nicht in die Zellplasmamembran transportiert (Zhang et al., 1994; Previtali et al., 2000). Diese mutierten P0-Proteine üben einen dominant-negativen Effekt auf das Wildtyp-Protein aus (Zhang et al., 1998) und verhindern somit *per se* die Ausbildung von Interaktionen zwischen P0 und PMP22. Des Weiteren konnte in unserem System hier nicht überprüft werden, ob Mutationen im PMP22-Protein zu einer Beeinträchtigung der heterophilen und homophilen Interaktionen führt. Interessanterweise wurde bisher keine Krankheits-assoziierte Mutation in der extrazellulären Domäne von PMP22 beschrieben. Die meisten Mutationen werden in einer der vier Transmembranregionen von PMP22 gefunden. Aber auch für diese Mutationen konnten frühere Studien zeigen, dass mutiertes PMP22 nicht zur Plasmamembran transportiert wird und einen starken dominant-negativen Effekt auf den Transport des Wildtyp-Proteins ausüben (Aldkofer et al., 1997; Naef et al., 1997; D'Urso et al., 1998; Naef et al., 1999; Notterpek et al., 1999).

4.4 Der Einfluss von Lipid Rafts auf die Verteilung, den Aufbau und die Protein-Interaktionen im peripheren Myelin.

Die Beobachtung, dass sich apikale und basolaterale Membrankompartimente charakteristisch in ihrer Lipid- und Protein-Zusammensetzung unterscheiden, führte zur sogenannten Lipid Rafts Hypothese. Diese besagt, dass bestimmte Proteine der apikalen Membran im Trans-Golgi-Netzwerk in Cholesterin- und Glykosphingolipid-angereicherte Mikrodomänen (Lipid Rafts) verpackt werden, bevor sie zur apikalen Plasmamembran transportiert werden (Simons und van Meer 1988; Simons und Ikonen 1997; Rothberg et al., 1990). In der zellulären Membran können sich diese kleinen dynamischen Ansammlungen von Lipiden und Proteinen relativ frei bewegen, sich aber auch zu größeren und geordneteren Plattformen zusammen finden (Simons und Ehehalt, 2002; Simons und Toomre, 2000). Da die Glykosphingolipid-

angereicherten apikalen Membranen epithelialer Zellen sehr dem Myelin ähneln (Shayman und Radin 1991; Pfeiffer et al., 1993; Frank et al., 1998) werden Myelinproduzierende Zellen als polarisierte Zellen angesehen.

Das Myelinprotein MBP wurde bei 4 °C ausschließlich in den Triton-X-100 löslichen Fraktionen detektiert. Dies weist darauf hin, das MBP nicht mit Lipid Rafts assoziiert ist und lässt vermuten das MBP keine Lipid Rafts für die Ausübung seiner biologischen Funktion innerhalb des peripheren Myelins benötigt (Hasse et al, 2002). Dies konnte auch für MBP aus Myelinpräparationen des ZNS gezeigt werden (Krämer et al., 1997; Kim und Pfeiffer, 1999). Ein weiterer starker Hinweis hierfür wird durch frühere Studien geliefert, die zeigen, dass MBP nicht im Endoplasmatischen Retikulum oder im Golgi-Apparat, dem Entstehungsort von Lipid Rafts, synthetisiert wird, sondern die Translation des Proteins erst an der Plasmamembran stattfindet (Colman et al., 1982).

Im Gegensatz zu MBP, wurde nahezu die gesamte Menge des vier Transmembran-Proteolipidproteins Plasmolipin sowohl in Präparationen aus peripherem Myelin als auch in Homogenaten aus transient transfizierten HeLa-Zellen bei 4 °C in den Triton-X-100 unlöslichen Fraktionen gefunden. Es konnte gezeigt werden, das Plasmolipin in Triton-X-100 bei 37 °C oder nach Vorbehandlung mit β -CD bei 4 °C komplett löslich wird. Da Lipid Rafts nur bei niedrigen Temperaturen gegenüber Detergenz stabil sind führt ein Wechsel zu 37 °C zur Zerstörung dieser Mikrodomänen und somit zur Solubilisierung der assoziierten Proteine. Die Löslichkeit von Plasmolipin nach Entzug von Cholesterin, deutet auf eine Assoziation dieses Proteins mit Cholesterin-angereicherten Membranen hin (Hasse et al., 2002). Die Assoziation von Plasmolipin mit Lipid Rafts konnte auch in Myelinpräparationen des ZNS gezeigt werden (Bosse et al., 2003). Kürzlich konnte MAL, ein weiteres vier Transmembran-Proteolipidprotein, als ein Bestandteil des PNS und ZNS (Kim et al., 1995; Schaeren-Wiemers et al., 1995) charakterisiert werden, wo es mit Lipid Rafts assoziiert vorliegt (Kim et al., 1995; Frank et al., 1998). Weiterhin findet sich MAL in epithelialen Zellen zum Beispiel der Niere oder der Schilddrüse und zwar ausschließlich in Vesikeln und in der apikalen Membran. Hier ist MAL ebenfalls mit Lipid Rafts assoziiert (Zacchetti et al., 1995). Untersuchungen mit ektopisch exprimiertem MAL in Insekten-Zellen

zeigten, dass MAL an der Bildung vesikulärer Strukturen im Trans-Golgi-Netzwerk beteiligt ist, zwischen Golgi-Apparat und Plasmamembran zu zirkulieren scheint und somit an der Rafts-vermittelten Proteinsortierung für die apikale Zellmembran beteiligt sein könnte (Puertollano et al., 1997). Es ist früh darauf hingewiesen worden, dass Plasmolipin ähnlich wie MAL, auch in PNS- und ZNS-Myelin (Cochary et al., 1990; Sapirstein et al., 1991), apikalen Membranen der Niere und anderen Geweben, die polarisierte Zellen enthalten, lokalisiert ist (Gillen et al., 1996; Hamacher et al., 2001; Bosse et al., 2003). Zusammen mit den Ähnlichkeiten in der Struktur und Expression von Plasmolipin und MAL (Alonso und Weissman 1987; Schaeren-Wiemers et al., 1995; Frank et al., 1998), einem Mitglied der gleichen Genfamilie (Magyar et al., 1997; Perez et al., 1997), lassen diese Daten vermuten, dass Plasmolipin eine ähnliche Rolle in der apikalen Proteinsortierung oder als Strukturprotein in apikalen Membranen spielen könnte.

Ein weiteres Ergebnis dieser Arbeit ist die selektive Assoziation von P0 mit Lipid Rafts aus aufgereinigtem Myelin. Weniger als die Hälfte von P0 wurde in den unlöslichen Fraktionen gefunden, während der größte Anteil des Proteins in den löslichen Fraktionen detektiert wurde. Im Gegensatz dazu, ist P0 aus Transient Transfizierten HeLa-Zellen exklusiv mit den Detergenz unlöslichen Mikrodomänen assoziiert. Es ist möglich, dass die „lösliche Form von P0“ nur ein Merkmal von myelinisierenden Schwannzellen ist. Sowohl in Myelin als auch in HeLa-Zellen konnte das Lipid Rafts assoziierte P0 durch Temperaturerhöhung auf 37 °C oder nach Behandlung mit β -CD solubilisiert werden und erfüllte somit die Kriterien für eine Assoziation mit Lipid Rafts. Die unterschiedliche Segregation von P0 lässt vermuten, dass dieses Protein zwei alternative Formen haben könnte. Eine ähnlich unterschiedliche Segregation konnte kürzlich für die ZNS-Myelinproteine CNPase und MOG (Kim und Pfeiffer, 1999) gezeigt werden. Da Rafts als spezialisierte Strukturen beschrieben wurden, die Komponenten des Signaltransduktionsapparates miteinander verbinden können, wie zum Beispiel die Kinasen der src-Familie und ihre Substrate (Rietveld und Simons, 1998; Brown und London, 1998; Millan et al., 1997), scheint es möglich zu sein, dass die Rafts-assoziierte Form von P0 auch in Signaltransduktionswege involviert sein könnte. Übereinstimmend mit dieser

Hypothese ist das Vorhandensein eines „Immunrezeptor Tyrosin-basierenden Inhibitorischen Motivs“ (ITIM) in der intrazellulären Domäne von P0 (Xu et al., 2000). Es konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung dieses ITIMs die Interaktion von P0 mit anderen Tyrosin-phosphorylierten Signalmolekülen vermittelt (Xu et al., 2000; Iyer et al., 2000). Andererseits kann nicht ausgeschlossen werden, dass die unterschiedliche Segregation von P0 in Myelin verglichen mit transfizierten HeLa-Zellen aufgrund der unterschiedlichen Extraktionsprotokolle zustande kommt. Die Konzentration von Triton-X-100 zur Extraktion von Myelin war höher als die zur Extraktion der Plasmamembranen von HeLa-Zellen. Da die hoch spezialisierte Myelinmembran, welche einen außerordentlich hohen Gehalt an Lipiden und hydrophoben Proteinen aufweist, ungewöhnliche Solubilisierungseigenschaften besitzt wurde hier eine höhere Konzentration verwendet. Für HeLa-Zellen wurde die Standardprozedur von Brown und Rose (1992) benutzt, um Lipid Rafts aufzureinigen.

Ein weiterer wichtiger Punkt ist die unterschiedliche Hydrophobizität und die Solubilisierungseigenschaften von Proteinen mit einer (P0) oder vier (Plasmolipin und PMP22) Transmembrandomänen. Durch Untersuchungen an dem Sieben-Transmembrandomänen-Rezeptor CXCR4 konnten Kozak und Mitarbeiter (2002) demonstrieren, dass die Assoziation von Proteinen mit Lipid Rafts unabhängig von der Hydrophobizität oder der Anzahl der Transmembrandomänen ist. Der CXCR4-Rezeptor wird in T-Lymphozyten exprimiert und wurde ausschließlich in den nicht-Rafts assoziierten Fraktionen gefunden (Kozak et al., 2002).

Nahezu der gesamte Anteil des vier Transmembranprotein PMP22 aus dem Myelin peripherer Ischiasnerven und transfizierten HeLa-Zellen konnte bei 4 °C in den Triton-X-100 unlöslichen Fraktionen gefunden werden. Die Ergebnisse belegen weiterhin einen offensichtlichen Wechsel dieses Proteins in die löslichen Fraktionen bei Temperaturerhöhung auf 37 °C. Auch die Zerstörung der Assoziation mit Lipid Rafts nach Entzug von Cholesterin führt zu einer Solubilisierung von PMP22. Somit erfüllt auch PMP22 die Kriterien für eine Assoziation mit Lipid Rafts. Die Beobachtung, dass PMP22 und P0 in Lipid Rafts lokalisiert sind (Hasse et al., 2002; Erne et al., 2002) könnte für den Transport und die Interaktion dieser Proteine von

zentraler Bedeutung sein. Die Bildung von Rafts-Strukturen und die Absonderung von Vesikeln für den Transport in die Plasmamembran finden im Trans-Golgi-Netzwerk statt (Brown und London, 1998). Im Einklang mit einem möglichen Transport von PMP22 und P0 durch Lipid Rafts stehen Ergebnisse früherer Studien die zeigen, dass P0 im Endoplasmatischen Retikulum synthetisiert und durch den Golgi-Apparat prozessiert wird (Trapp et al., 1981; Voshol et al., 1996; Brunden, 1992). Im Trans-Golgi-Netzwerk wird P0 in spezifische Vesikel sortiert, welche entlang am Mikrotubuli transportiert werden bis sie an der für die Bildung von kompakten Myelin entsprechenden Membranseite fusionieren (Trapp et al., 1995). Auch für PMP22 konnte die Synthese im Endoplasmatischen Retikulum und eine Kolokalisation mit dem Entstehungsort von Lipid Rafts, dem Golgi-Apparat, gezeigt werden (Pareek et al., 1993; D`Urso et al., 1997).

Durch Ko-Immünpräzipitationen konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass PMP22 und P0 in Lipid Rafts interagieren (Abb.10). Da Lipid Rafts nicht nur eine Plattform für die Assoziation und Aktion von Komponenten des Signaltransduktionsweges darstellen, sondern auch die adhäsiven Funktionen von Proteinen fördern (Harder et al., 1998; Leitinger und Hogg, 2002), könnte die Konzentration von PMP22 und P0 Molekülen innerhalb einer gemeinsamen Mikroumgebung die Bildung von homophilen und heterophilen PMP22- und P0-Komplexen fördern. Die in dieser Arbeit beschriebenen heterophilen und homophilen trans-Interaktionen implizieren, dass Komplexe zwischen PMP22- und P0-Molekülen in Mikrodomänen von gegenüberliegenden Membranlamellen ausgebildet werden. Allerdings kann eine Interaktion dieser Proteine in cis-Konfiguration, d.h. innerhalb der gleichen intramembranen Mikrodomäne, nicht ausgeschlossen werden.

Da die Assoziation dieser Proteine mit Lipid Rafts auch in transfizierten nicht-neuralen Zellen gezeigt werden konnte ist zu vermuten, dass es universelle Signale oder Motive in der Aminosäuresequenz von Plasmolipin, PMP22 und P0 geben muss, die eine Verankerung dieser Proteine mit den speziellen Mikrodomänen sowohl in HeLa-Zellen als auch im Myelin ermöglichen.

Insgesamt können die hier gezeigten Assoziationen der peripheren Myelinproteine Plasmolipin, PMP22 und P0 mit Lipid Rafts auf eine wichtige Rolle in der

Myelinbildung, Myelinerhaltung aber auch in der Sortierung von Myelinkomponenten hinweisen und könnten das oben beschriebene hypothetische Modell (Abb. 31) über den Aufbau und Zusammenhalt der multilamellaren Myelinschicht von Schwannzellen im peripheren Nerv erweitern (Abb. 31).

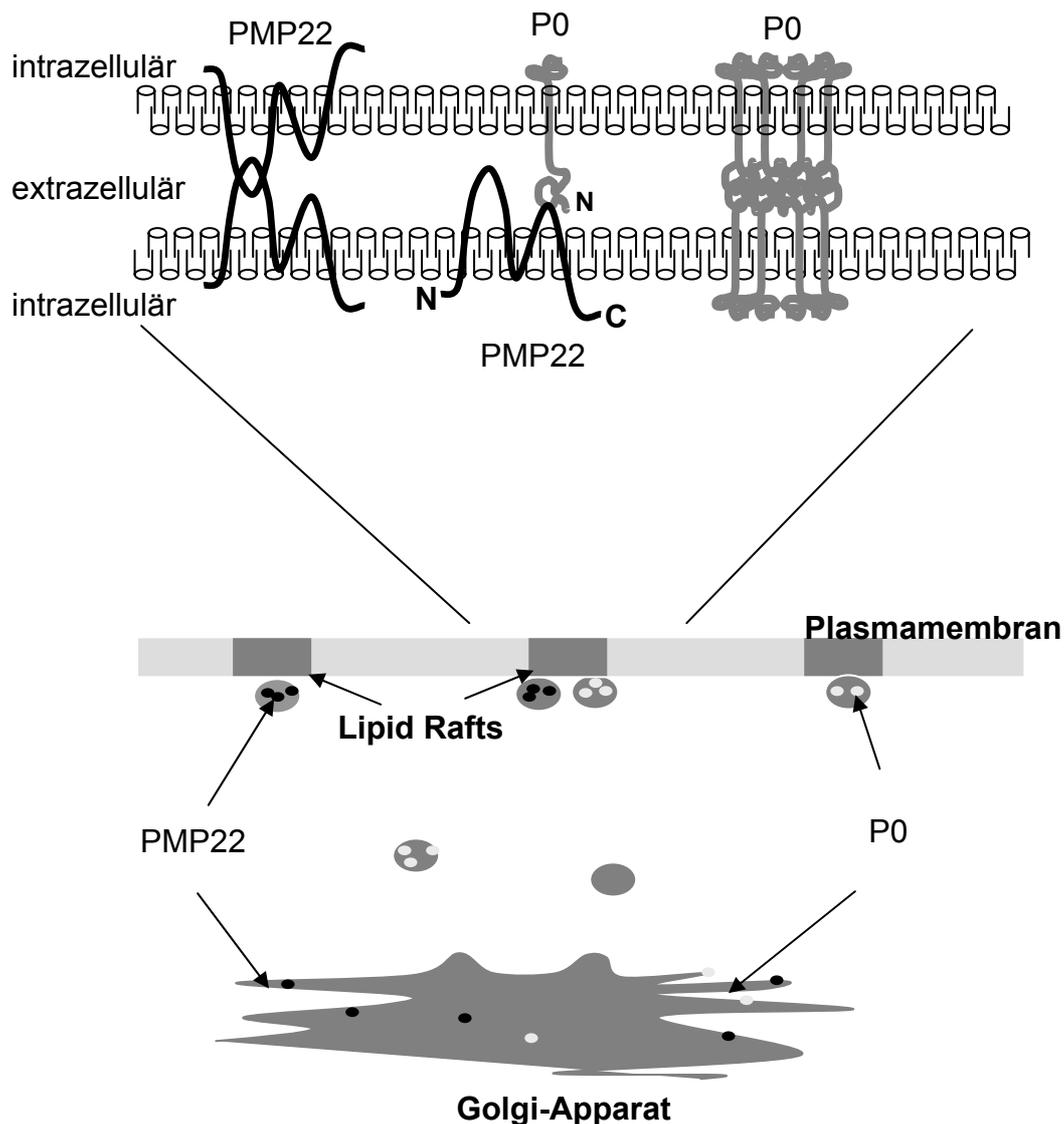


Abbildung 31: Modell zur Bedeutung von PMP22 und P0 in der molekularen Architektur von kompaktem Myelin in Schwannzellen.

PMP22 und P0 werden im Golgi-Apparat in Lipid Rafts eingebaut und gelangen über Vesikel in die Plasmamembran. Innerhalb der Membranen könnten Lipid Rafts dazu beitragen, dass PMP22 und P0 in räumlicher Nähe konzentriert werden und so die adhäsiven homophilen und heterophilen trans-Interaktionen ausbilden. Diese Interaktionen könnten den Zusammenhalt der multilamellaren Myelinschicht von Schwannzellen im peripheren Nerv bewirken. N: N-Terminus und C: C-Terminus.

Denkbar wäre, dass PMP22 und P0 im Golgi-Apparat in Lipid Rafts eingebaut werden und über Vesikel in die Plasmamembran transportiert werden. Die nahezu freie Beweglichkeit von Rafts in Membranen trägt dazu bei, dass PMP22 und P0 in räumlicher Nähe akkumuliert werden und so die Rafts-vermittelten adhäsiven homophilen und heterophilen trans-Interaktionen ausbilden.

5 Zusammenfassung

Das Periphere Myelin Protein 22 kD (PMP22) und das Protein Zero (P0) sind zwei glykosylierte integrale Membranproteine. Beide Proteine sind im kompakten Myelin peripherer Nerven lokalisiert und mit hereditären demyelinisierenden Neuropathien, wie der Charcot-Marie-Tooth (CMT) Typ1 und dem Dejerine-Sottas-Syndrom (DSS), assoziiert.

Durch Etablierung eines Zell-Adhäsionstests mit retroviral transduzierten HeLa-Zellpopulationen, die PMP22 und P0 ektopisch überexprimieren, konnten homophile und heterophile adhäsive trans-Interaktionen dieser Proteine festgestellt werden. Zur Identifizierung möglicher Bindungsdomänen, die diese Interaktionen vermitteln, wurden mit Glutathion-S-Transferase (GST) fusionierte Peptide der extrazellulären Domänen von PMP22 und P0 hergestellt, aufgereinigt und auf ihre Fähigkeit getestet Zelladhäsion zu bewirken. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die adhäsive heterophile trans-Interaktion von PMP22 mit der extrazellulären Domäne von P0 durch die zweite extrazelluläre Domäne von PMP22 vermittelt wird. Während die adhäsive homophile trans-Interaktion von PMP22-Proteinen über die erste extrazelluläre Domäne von PMP22 vermittelt wird. Nachfolgende GST-Bindungsstudien mit diesen aufgereinigten, spezifischen Peptiden konnten zeigen, dass diese molekularen Interaktionen auf direkte Protein-Protein-Bindungen zurückzuführen sind. Die Untersuchung von drei unterschiedlichen CMT1- und DSS-assoziierten Punktmutationen der extrazellulären Domäne von P0 ergaben, dass die homophile und heterophile Interaktionen von P0 bzw. P0-PMP22 unterschiedlich beeinträchtigt werden. Dabei korreliert die Schwere der Erkrankung mit der Reduktion der Adhäsionskapazität von P0 und PMP22.

Zusätzlich konnte durch Dichte-Gradienten-Zentrifugationen von aufgereinigtem Myelin peripherer Nerven und Homogenaten transient transfizierter HeLa-Zellen sowie durch Koimmunpräzipitationsexperimente gezeigt werden, dass PMP22 und P0 mit Lipid Rafts assoziiert sind und in diesen spezialisierten Membranstrukturen interagieren.

Diese Ergebnisse führen zu der Annahme, dass die adhäsiven homophilen und heterophilen trans-Interaktionen von P0 und PMP22 bei der Adhäsion von benachbarten Membranschichten im kompakten Myelin und/oder in der Stabilisierung und dem Erhalt der Myelinschicht in peripheren Nerven beteiligt sein könnten. Bei der Ausübung der adhäsiven Interaktionen von PMP22 und P0 und dem Transport dieser Proteine könnten Lipid Rafts eine wichtige Rolle spielen.

6 Literatur

Archelos JJ, Roggenbuck K, Schneider-Schaulies J, Linington C, Toyka KV, Hartung HP (1993) Production und characterization of monoclonal antibodies to the extracellular domain of P0. *J Neurosci Res* 35: 46-53.

Adlkofer K, Martini R, Aguzzi A, Zielasek J, Toyka KV, Suter U (1995) Hypermyelination und demyelinating peripheral neuropathy in Pmp22- deficient mice. *Nat Genet* 11: 274-280.

Adlkofer K, Frei R, Neubergh DH, Zielasek J, Toyka KV, Suter U (1997) Heterozygous peripheral myelin protein 22-deficient mice are affected by a progressive demyelinating tomaculous neuropathy. *J Neurosci* 17: 4662-4671.

Alonso MA, Weissman SM (1987) cDNA cloning und sequence of MAL, a hydrophobic protein associated with human T-cell-differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 84: 1997-2001.

Ansorge W, (1985) Fast und sensitive detection of protein und DNA bunds by treatment with potassium permanganate. *J. Biochem. Biophys. Methods* 11: 13-20.

Barbarese E, Braun PE, Carson JH (1977) Identification of prelarge und presmall basic proteins in mouse myelin und their structural relationship to large und small basic proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74: 3360-3364.

Bergoffen J, Scherer SS, Wang S, Oranzi-Scott M, Bone L, Paul DL, Chen K, Lensch MW, Chance P, Fischbeck K (1993) Connexin mutations in X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *Science* 262: 2039-2042.

Bird TD, Ott J, Giblett ER (1982) Evidence for linkage of Charcot-Marie-Tooth neuropathy to the Duffy locus on chromosome 1. *Am J Hum Genet* 34: 388-394.

Bollensen E, Schachner M (1987) The peripheral myelin glycoprotein P0 expresses the L2/HNK-1 und L3 carbohydrate structures shared by neural adhesion molecules. *Neurosci. Lett* 82: 77-82.

Bosse F, Zoidl G, Wilms S, Gillen CP, Kuhn HG, Müller HW (1994) Differential expression of two mRNA species indicates a dual function of peripheral myelin protein PMP22 in cell growth und myelination. *J Neurosci Res* 37: 529-537.

Bosse F, Hasse B, Pippirs U, Greiner-Petter R, Müller HW (2003) Proteolipid plasmolipin: lokalization in polarized cells, regulated expression und lipid raft association in CNS und PNS myelin. *J. Neurochem* 86: 508-518.

Brancolini C, Marzinotto S, Edomi P, Agostoni E, Fiorentini C, Müller HW, Schneider C (1999) Rho-dependent regulation of cell spreading by the tetraspan membrane protein Gas3/PMP22. *Mol Biol Cell* 10: 2441-2459.

Brancolini C, Edomi P, Marzinotto S, Schneider C (2000) Exposure at the cell surface is required for gas3/PMP22 to regulate both cell death und cell spreading: implication for the Charcot-Marie-Tooth type 1A und Dejerine-Sottas diseases. *Mol Biol Cell* 11: 2901-2914.

Brockes JP, Raff MC, Nishiguchi DJ, Winter J (1980) Studies on cultured rat Schwann cells. III. Assays for peripheral myelin proteins. *J. Neurocytol* 9: 67-77.

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

Brown DA, London E (1998) Structure und origin of ordered lipid domains in biological membranes. *J Membr Biol* 164: 103-114.

Brunden KR (1992) Age dependent changes in the oligosaccharide structure of the major myelin glycoprotein, P0. *J. Neurochem* 58: 1659-1666.

- Brunden KR, Poduslo JF (1987) Lysosomal delivery of the major myelin glycoprotein in the absence of myelin assembly: posttranslational regulation of the level of expression by Schwann cells. *J Cell Biol* 104: 661-669.
- Chance PF, Alderson MK, Leppig KA, Lensch MW, Matsunami N, Smith B, Swanson PD, Odelberg SJ, Disteché CM, Bird TD (1993) DNA deletion associated with hereditary neuropathy with liability to pressure palsies. *Cell* 72: 143-151.
- Cochary EF, Bizzozero OA, Sapirstein VS, Nolan CE, Fischer I (1990) Presence of the Plasmamembran proteolipid (plasmolipin) in myelin. *J. Neurochem* 55: 602-610.
- Colman DR, Kreibich G, Frey AB, Sabatini DD (1982). Synthesis und incorporation of myelin polypeptides into CNS myelin. *J. Cell Biol* 95: 598-608.
- D'Urso D, Brophy PJ, Staugaitis SM, Gillespie CS, Frey AB, Stempak JG, Colman DR (1990) Protein zero of peripheral nerve myelin: biosynthesis, membrane insertion, und evidence for homotypic interaction. *Neuron* 4: 449-460.
- D'Urso D, Muller HW (1997) Ins und outs of peripheral myelin protein-22: mapping transmembrane topology und intracellular sorting. *J Neurosci Res* 49: 551-562.
- D'Urso D, Prior R, Greiner-Petter R, Gabreels-Festen AA, Muller HW (1998) Overloaded endoplasmic reticulum-Golgi compartments, a possible pathomechanism of peripheral neuropathies caused by mutations of the peripheral myelin protein PMP22. *J Neurosci* 18: 731-740.
- D'Urso D, Ehrhardt P, Muller HW (1999) Peripheral myelin protein 22 und protein zero: a novel association in peripheral nervous system myelin. *J Neurosci* 19: 3396-3403.
- De Jonghe P, Timmerman V, Nelis E, Martin JJ, van Broeckhoven C (1997) Charcot-Marie-Tooth disease und related peripheral neuropathies. *J Peripher Nerv Syst* 2: 370-387.

Ding Y, Brunden KR (1994) The cytoplasmic domain of myelin glycoprotein P0 interacts with negatively charged phospholipid bilayers. *J Biol Chem* 269: 10764-10770.

Dyck PJ, Chance PF, Lebo R, Carney JA (1992) Hereditary motor und sensory neuropathies. In: *Disease of peripheral nervous system.* (Dyck PJ, Thomas PK, eds), pp 1094-1136. Saunders.

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

Fabbretti E, Edomi P, Brancolini C, Schneider C (1995) Apoptotic phenotype induced by overexpression of wild-type *gas3/PMP22*: its relation to the demyelinating peripheral neuropathy CMT1A. *Genes Dev* 9: 1846-1856.

Fannon AM, Sherman DL, Ilyina-Gragerova G, Brophy PJ, Friedrich Jr VL, Colman DR (1995) Novel E-cadherin-mediated adhesion in peripheral nerve: Schwann cell architecture is stabilized by autotypic adherens junctions. *J. Cell Biol* 129: 189-202.

Filbin MT, Walsh FS, Trapp BD, Pizzey JA, Tennekoon GI (1990) Role of myelin P0 protein as a homophilic adhesion molecule. *Nature* 344: 871-872.

Filbin MT, Tennekoon GI (1991) The Role of Complex Carbohydrates in Adhesion of the Myelin Protein, Po. *Neuron* 7: 845-855.

Filbin MT, Zhang K (1993) The Ig-Disulfide Bond of Myelin Po Protein Is Essential to Its Adhesion. *Journal of Neurochemistry* 61: S194.

Filbin MT, Tennekoon GI (1993) Homophilic Adhesion of the Myelin Po Protein Requires Glycosylation of Both Molecules in the Homophilic Pair. *Journal of Cell Biology* 122: 451-459.

Frank M, van der Haar ME, Schaeren-Wiemers N, Schwab ME (1998) rMAL is a glycosphingolipid-associated protein of myelin und apical membranes of epithelial cells in kidney und stomach. *J Neurosci* 18: 4901-4913.

Gabreels-Festen AA, Hoogendijk JE, Meijerink PH, Gabreels FJ, Bolhuis PA, van Beersum S, Kulkens T, Nelis E, Jennekens FG, de Visser M, van Engelen BG, van Broeckhoven C, Mariman EC (1996) Two divergent types of nerve pathology in patients with different P0 mutations in Charcot-Marie-Tooth disease. *Neurology* 47: 761-765.

Garbay B, Heape AM, Boiron-Sargueil F, Cassagne C (2000) Myelin syntheses in the peripheral nervous system. *Prog. Neurobiol* 61: 267-304.

Giese KP, Martini R, Lemke G, Soriano P, Schachner M (1992) Mouse P0 gene disruption leads to hypomyelination, abnormal expression of recognition molecules, und degeneration of myelin und axons. *Cell* 71: 565-576.

Gilbert WR, Garwood MM, Agrawal D, Schmidt RE, Agrawal HC (1982) Immunoblot identification of phosphorylated basic proteins of rat und rabbit CNS und PNS myelin: evidence for four phosphorylated basic proteins und P2 in rat PNS myelin. *Neurochem. Res* 7: 1495-1506.

Gillen C, Gleichmann M, Greiner-Petter R, Zoidl G, Kupfer S, Bosse F, Auer J, Muller HW (1996) Full-length cloning, expression und cellular localization of rat plasmalipin mRNA, a proteolipid of PNS und CNS. *Eur J Neurosci* 8: 405-414.

Greenfield S, Brostoff S, Eylar EH, Morell P (1973) Protein composition of myelin of the peripheral nervous system. *J Neurochem* 20: 1207-1216.

Griffith LS, Schmitz B, Schachner M (1992) L2/HNK-1 carbohydrate und protein-protein interactions mediate the homophilic binding of the neural adhesion molecule P0. *J Neurosci Res* 33: 639-648.

Griffiths IR, Mitchell LS, McPhilemy K, Morisson S, Kyriakides E, Barrie JA (1989) Expression of myelin protein genes in Schwann cells. *J. Neurocytol* 18: 345-352.

Gupta SK, Poduslo JF, Mezei C (1988) Temporal changes in P0 und MBP gene expression after crush-injury of the adult peripheral nerve. *Mol. Brain Res* 4: 133-141.

Haites NE, Nelis E, van Broeckhoven C (1998) 3rd workshop of the European CMT consortium: 54th ENMC international workshop on genotype/phenotype correlations in Charcot-Marie-Tooth type 1 und hereditary neuropathy with liability to pressure palsies, 28-30 November 1997, Naarden, The Netherlands. *Neuromuscul. Disord* 8: 591-603.

Hamacher M, Pippirs U, Kohler A, Muller HW, Bosse F (2001) Plasmalipin: genomic structure, chromosomal localization, protein expression pattern, und putative association with Bardet-Biedl syndrome. *Mamm Genome* 12: 933-937.

Hanenberg H, Hashino K, Konishi H, Hock RA, Kato I, Williams DA (1997) Optimization of fibronectin-assisted retroviral gene Transfer into human CD34+ hematopoietic cells. *Hum Gene Ther* 8: 2193-2206.

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

Hasse B, Bosse F, Muller HW (2002) Proteins of peripheral myelin are associated with glycosphingolipid/Cholesterin-enriched membranes. *J Neurosci Res* 69: 227-232.

Hayasaka K, Himoro M, Wang Y, Takata M, Minoshiba S, Shimizu N, Miura M, Uyemura K, Takada G (1993) Structure und chromosomal localization of the gene encoding the human myelin protein zero (MPZ). *Genomics* 17: 755-758.

Hayasaka K, Himoro M, Sawaishi Y, Nanao K, Takada G, Takahashi T, Nicholson GA, Ouvrier RA, Tachi N (1993b) De novo mutation of the myelin P0 gene in

Dejerine-Sottas disease (hereditary motor und sensory neuropathy type III). *Nature Genet* 5: 266-268.

Huxley C, Passage E, Manson A, Putzu G, Figarella-Branger D, Pellissier JF, Fontes M (1996) Construction of a mouse model of Charcot-Marie-Tooth disease type 1A by pronuclear injection of human YAC DNA. *Hum Mol Genet* 5: 563-569.

Ionasescu VV, Ionasescu R, Searby C, Neahring R (1995) Dejerine-Sottas disease with de novo dominant point mutation of the PMP22 gene. *Neurology* 45: 1766-1767.

Inouye H, Tsuruta H, Sedzik J, Uyemura K, Kirschner DA (1999) Tetrameric assembly of full-sequence protein zero myelin glycoprotein by synchrotron X-ray scattering. *Biophys. J* 76: 423-437.

Iyer S, Bianchi R, Eichberg J (2000) Tyrosine phosphorylation of PNS myelin P(0) occurs in the cytoplasmic domain und is maximal during early development. *J Neurochem* 75: 347-354.

Kim T, Fiedler K, Madison DL, Krueger WH, Pfeiffer SE (1995) Cloning und characterization of MVP17: a developmentally regulated myelin protein in oligodendrocytes. *J Neurosci Res* 42: 413-422.

Kim T, Pfeiffer SE (1999) Myelin glycosphingolipid/Cholesterin-enriched microdomains selectively sequester the non-compact myelin proteins CNP und MOG. *J Neurocytol* 28: 281-293.

Klein U, Gimpl G, Fahrenholz F (1995) Alteration of the myometrial plasma membrane Cholesterin content with beta-cyclodextrin modulates the binding affinity of the oxytocin receptor. *Biochemistry* 34: 13784-13793.

Kozak SL, Heard JM, Kabat D (2002) Segregation of CD4 und CXCR4 into distinct lipid microdomains in T lymphocytes suggests a mechanism for membrane destabilization by human immunodeficiency virus. *J Virol* 76: 1802-1815.

Krämer EM, Koch T, Niehaus A, Trotter J (1997) Oligodendrocytes direct glycosyl phosphatidylinositol-anchored proteins to the myelin sheath in glycosphingolipid-rich complexes. *J Biol Chem* 272: 8937-8945.

Kuhn G, Lie A, Wilms S, Müller HW (1993) Coexpression of PMP22 gene with MBP und P0 during de novo myelination und nerve repair. *Glia* 8: 256-264.

Kuhn R, Pravtcheva D, Ruddle F, Lemke G (1990) The gene encoding peripheral myelin protein zero is located on mouse chromosome 1. *J. Neurosci* 10: 205-209.

Kyhse-Undersen J (1984) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose: a simple apparatus without buffer tank for rapid Transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biophys Methods* 10: 203-209.

Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

Lee MJ, Brennan A, Blanchard A, Zoidl G, Dong Z (1997) P0 is constitutively expressed in the rat neural crest und embryonic nerves und is negatively und positively regulated by axons to generate non-myelin-forming und myelin-forming Schwann cells, respectively. *Mol. Cell. Neurosci* 8: 336-350.

Lee MJ, Calle E, Brennan A, Ahmed S, Sviderskaya E, Jessen KR, Mirsky R (2001) In early development of the rat mRNA for the major myelin protein P0 is expressed in nonsensory areas of the embryonic inner ear, notochord, enteric nervous system, und olfactory ensheathing cells. *Dev. Dyn* 222: 40-51.

LeGuern E, Gouider R, Mabin D, Tardieu S, Birouk N, Parent P, Bouche P, Brice A (1997) Patients homozygous for the 17p11.2 duplication in Charcot-Marie-Tooth type 1A disease. *Ann Neurol* 41: 104-108.

Leitinger B, Hogg N (2002) The involvement of lipid rafts in the regulation of integrin function. *J. Cell Sci* 115: 963-972.

Lemke G, Axel R (1985) Isolation and sequence of a cDNA encoding the major structural protein of peripheral myelin. *Cell* 40: 501-508.

Lemke G, Lamar E, Patterson J (1988) Isolation and analysis of the gene encoding peripheral myelin protein zero. *Neuron* 1: 73-83.

Lemke G, Chao M (1988) Axons regulate Schwann cell expression of the major myelin and NGF receptor genes. *Development* 102: 499-504.

Lemke G (1993) The molecular genetics of myelination: an update. *Glia* 7: 263-271.

London Y (1971) Ox peripheral nerve myelin membrane. Purification and partial characterization of two basic proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 249: 188-196.

Lupski JR, Oca-Luna RM, Slaugenhaupt S, Pentao L, Guzzetta V, Trask BJ, Saucedo-Cardenas O, Barker DF, Killian JM, Garcia CA (1991) DNA duplication associated with Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Cell* 66: 219-232.

Lupski JR, Garcia CA (1992) Molecular genetics and neuropathology of Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Brain Pathol* 2: 337-349.

Magyar JP, Martini R, Ruelicke T, Aguzzi A, Adlkofer K, Dembic Z, Zielasek J, Toyka KV, Suter U (1996) Impaired differentiation of Schwann cells in Transgenic mice with increased PMP22 gene dosage. *J Neurosci* 16: 5351-5360.

Magyar JP, Ebensperger C, Schaeren-Wiemers N, Suter U (1997) Myelin and lymphocyte protein (MAL/MVP17/VIP17) and plasmalogen are members of an extended gene family. *Gene* 189: 269-275.

Manfioletti G, Ruaro ME, Del Sal G, Philipson L, Schneider C (1990) A growth arrest-specific (gas) gene codes for a membrane protein. *Mol Cell Biol* 10: 2924-2930.

Martini R, Schachner M (1986) Immunoelectron microscopic localization of neural cell adhesion molecules (L1, N-CAM, und MAG) und their shared carbohydrate epitope und myelin basic protein in developing sciatic nerve. *J. Cell Biol* 106: 1735-1746.

Martini R, Zielasek J, Toyka KV, Giese P, Schachner M (1995a) Protein zero (P0)-deficient mice show myelin degeneration in peripheral nerves characteristic of inherited human neuropathies. *Nature Genet* 11: 281-286.

Matsunami N, Smith B, Ballard L, Lensch MW, Robertson M, Albertsen H, Hanemann CO, Muller HW, Bird TD, White R, . (1992) Peripheral myelin protein-22 gene maps in the duplication in chromosome 17p11.2 associated with Charcot-Marie-Tooth 1A. *Nat Genet* 1: 176-179.

McKusick VA (1994) Mendelian inheritance in man. The John Hopkins University Press, Baltimore.

Millan J, Puertollano R, Fan L, Rancano C, Alonso MA (1997) The MAL proteolipid is a component of the detergent-insoluble membrane subdomains of human T-lymphocytes. *Biochem J* 321 (Pt 1): 247-252.

Miller AD, Garcia JV, von Suhr N, Lynch CM, Wilson C, Eiden MV (1991) Construction und properties of retrovirus packaging cells based on gibbon ape leukemia virus. *J Virol* 65: 2220-2224.

Mitchell LS, Griffiths IR, Morrison S, Barrie JA, Kirkham D, McPhilemy K (1990) Expression of myelin protein gene Transcripts by Schwann cells of regenerating nerve. *J. Neurosci. Res* 27: 125-135.

Naef R, Adlkofer K, Lescher B, Suter U (1997) Aberrant protein trafficking in Trembler suggests a disease mechanism for hereditary human peripheral neuropathies. *Mol Cell Neurosci* 9: 13-25.

Naef R, Suter U (1999) Impaired intracellular trafficking is a common disease mechanism of PMP22 point mutations in peripheral neuropathies. *Neurobiol Dis* 6: 1-14.

Nelis E, De Jonghe P, De Vriendt E, Patel PI, Martin JJ, van Broeckhoven C (1998) Mutation analysis of the nerve specific promoter of the peripheral myelin protein 22 gene in CMT1 disease und HNPP. *J Med Genet* 35: 590-593.

Nelis E, Haites N, van Broeckhoven C (1999) Mutations in the peripheral myelin genes und associated genes in inherited peripheral neuropathies. *Hum Mutat* 13: 11-28.

Niemann S, Sereda MW, Suter U, Griffiths IR, Nave KA (2000) Uncoupling of myelin assembly und schwann cell differentiation by Transgenic overexpression of peripheral myelin protein 22. *J Neurosci* 20: 4120-4128.

Nobbio L, Mancardi G, Grundis M, Levi G, Suter U, Nave KA, Windebank AJ, Abbruzzese M, Schenone A (2001) PMP22 Transgenic dorsal root ganglia cultures show myelin abnormalities similar to those of human CMT1A. *Ann. Neurol* 50: 47-55.

Norreel JC, Jamon M, Riviere G, Passage E, Fontes M, Clarac F (2001) Behavioural profiling of a murine Charcot-Marie-Tooth disease type 1A model. *Eur. J. Neurosci* 13: 1625-1634.

Notterpek L, Shooter EM, Snipes GJ (1997) Upregulation of the endosomal-lysosomal pathway in the trembler-J neuropathy. *J Neurosci* 17: 4190-4200.

Notterpek L, Ryan MC, Tobler AR, Shooter EM (1999) PMP22 accumulation in aggresomes: implications for CMT1A pathology. *Neurobiol Dis* 6: 450-460.

Notterpek L, Roux KJ, Amici SA, Yazdanpour A, Rahner C, Fletcher BS (2001) Peripheral myelin protein 22 is a constituent of intercellular junctions in epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 14404-14409.

Pareek S, Suter U, Snipes GJ, Welcher AA, Shooter EM, Murphy RA (1993) Detection und processing of peripheral myelin protein PMP22 in cultured Schwann cells. *J Biol Chem* 268: 10372-10379.

Patel PI, Roa BB, Welcher AA, Schoener-Scott R, Trask BJ, Pentao L, Snipes GJ, Garcia CA, Francke U, Shooter EM, . (1992) The gene for the peripheral myelin protein PMP-22 is a candidate for Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Nat Genet* 1: 159-165.

Patel PI, Lupski JR (1994) Charcot-Marie-Tooth disease: a new paradigm for the mechanism of inherited disease. *Trends Genet* 10: 128-133.

Pfeiffer SE, Warrington AE, Bansal R (1993) The oligodendrocyte und its many cellular processes. *Trends Cell Biol* XX: 191-197.

Previtali SC, Quattrini A, Fasolini M, Panzeri MC, Villa A, Filbin MT, Li W, Chiu SY, Messing A, Wrabetz L, Feltri ML (2000) Epitope-tagged P0 glycoprotein causes Charcot-Marie-Tooth-like neuropathy in Transgenic mice. *J. Cell Biol* 151: 1035-1045.

Puertollano R, Li S, Lisanti MP, Alonso MA (1997) Recombinant expression of the MAL proteolipid, a component of glycolipid-enriched membrane microdomains, induces the formation of vesicular structures in insect cells. *J Biol Chem* 272: 18311-18315.

Puertollano R, Alonso MA (1999) Substitution of the two carboxyl-terminal serines by alanine causes retention of MAL, a component of the apical sorting machinery, in the endoplasmic reticulum. *Biochem Biophys Res Commun* 260: 188-192.

Rautenstrauss B, Nelis E, Grehl H, Pfeiffer RA, Van Broeckhoven C (1994) Identification of a de novo insertional mutation in P0 in a patient with a Dejerine-Sottas syndrome (DSS) phenotype. *Hum. Mol. Genet* 3: 1701-1702.

Rietveld A, Simons K (1998) The differential miscibility of lipids as the basis for the formation of functional membrane rafts. *Biochim Biophys Acta* 1376: 467-479.

Roa BB, Dyck PJ, Marks HJ, Chance PF, Lupski JR (1993a) Dejerine-Sottas syndrome associated with point mutation in the peripheral myelin protein 22 (PMP22) gene. *Nature Genet* 5: 269-273.

Rothberg KG, Ying YS, Kamen BA, Underson RG (1990) Cholesterin controls the clustering of the glycosphospholipid-anchored membrane receptor for 5-methyltetrahydrofolate. *J. Cell Biol* 111: 2931-2938.

Ryan MC, Notterpek L, Tobler AR, Liu N, Shooter EM (2000) Role of the peripheral myelin protein 22 N-linked glycan in oligomer stability. *J Neurochem* 75: 1465-1474.

Sakamoto Y, Kitumara K, Yoshimura K, Nishijima T, Uyemura K (1987) Complete amino acid sequence of P0 protein in bovine peripheral nerve myelin. *J. Biol. Chem* 262: 4208-4214.

Samsam M, Frei R, Marziniak M, Martini R, Sommer C (2002) Impaired sensory function in heterozygous P0 knockout mice is associated with nodal changes in sensory nerves. *J. Neurosci. Res* 67: 167-173.

Sancho S, Young P, Suter U (2001) Regulation of Schwann cell proliferation and apoptosis in PMP22-deficient mice and mouse models of Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Brain* 124: 1563-1577.

Sapirstein VS, Nolan CE, Fischer I, Cochary E, Blau S, Flynn CJ (1991) The phylogenetic expression of plasmalogen in the vertebrate nervous system. *Neurochem Res* 16: 123-128.

Schaeren-Wiemers N, Valenzuela DM, Frank M, Schwab ME (1995) Characterization of a rat gene, rMAL, encoding a protein with four hydrophobic domains in central and peripheral myelin. *J Neurosci* 15: 5753-5764.

Schneider C, King RM, Philipson L (1988) Genes especially expressed at growth arrest of mammalian cells. *Cell* 54: 787-793.

Schneider-Schaulies J, von Brunn A, Schachner M (1990) Recombinant peripheral myelin protein P0 confers both adhesion und neurite outgrowth-promoting properties. *J Neurosci Res* 27: 286-297.

Schulze KM, Hanemann CO, Muller HW, Hanenberg H (2002) Transduction of wild-type merlin into human schwannoma cells decreases schwannoma cell growth und induces apoptosis. *Hum Mol Genet* 11: 69-76.

Sereda M, Griffiths I, Puhlhofer A, Stewart H, Rossner MJ, Zimmerman F, Magyar JP, Schneider A, Hund E, Meinck HM, Suter U, Nave KA (1996) A Transgenic rat model of Charcot-Marie-Tooth disease. *Neuron* 16: 1049-1060.

Shapiro L, Doyle JP, Hensley P, Colman DR, Hendrickson WA (1996) Crystal structure of the extracellular domain from P0, the major structural protein of peripheral nerve myelin. *Neuron* 17: 435-445.

Shayman JA, Radin NS (1991) Structure und function of renal glycosphingolipids. *Am. J. Physiol* 260: F291-F302.

Shuman S, Hardy M, Pleasure D (1983) Peripheral nervous system myelin und Schwann cell glycoproteins: identification by lectin binding und partial purification of a peripheral nervous system myelin-specific 170,000 molecular mass glycoprotein. *J. Neurochem* 41: 811-818.

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

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

Simons K, Toomre D (2000) Lipid rafts und signal Transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1: 31-39.

Simons K, Eehalt R (2002) Cholesterin, lipid rafts, und disease. *J. Clin. Invest* 110: 597-603.

Skre H (1974) Genetic und clinical aspects of Charcot-Marie Tooth's disease. *Clin Genet* 6: 98-118.

Smith ME, Curtis BM (1979) Frog sciatic nerve myelin : a chemical characterization. *J. Neurochem* 33: 447-452.

Smith ME, Forno LS, Hofman WW (1979) Experimental allergic neuritis in the Lewis rat. *J. Neuropathol. Exp. Neurol* 38: 377-391.

Snipes GJ, Suter U, Welcher AA, Shooter EM (1992) Characterization of a novel peripheral nervous system myelin protein (PMP-22/SR13). *J Cell Biol* 117: 225-238.

Sorour E, Upadhyaya M (1998) Mutation analyses in Charcot-Marie-Tooth disease type 1 (CMT1). *Hum. Mutat. Suppl* 1: S242-S247.

Spreyer P, Kuhn G, Hanemann CO, Gillen C, Schaal H, Kuhn R, Lemke G, Muller HW (1991) Axon-regulated expression of a Schwann cell Transcript that is homologous to a 'growth arrest-specific' gene. *EMBO J* 10: 3661-3668.

Sternberger NH, Quarles RH, Itoyama Y, Webster H (1979) Myelin-associated glycoprotein demonstrated immunozytochemically in myelin und myelin-forming cells of developing rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 76: 1510-1514.

Suter U, Welcher AA, Ozcelik T, Snipes GJ, Kosaras B, Francke U, Billings-Gagliardi S, Sidman RL, Shooter EM (1992b) Trembler mouse carries a point mutation in a myelin gene. *Nature* 356: 241-244.

Suter U, Moskow JJ, Welcher AA, Otelik T, Snipes GJ, Kosaras B, Sidman RL, Buchberg AM, Shooter EM (1992a) A leucine-to-proline mutation in the putative first Transmembrane domain of the 22-kDa peripheral myelin protein in the trembler-J mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 89: 4382-4386.

Suter U, Snipes GJ, Schoener-Scott R, Welcher AA, Pareek S, Lupski JR, Murphy RA, Shooter EM, Patel PI (1994) Regulation of tissue-specific expression of alternative peripheral myelin protein-22 (PMP22) gene Transcripts by two promoters. *J Biol Chem* 269: 25795-25808.

Timmermann V, Nelis E, Van Hul W, Nieuwenhuijsen BW, Chen KL, Wang S, Othman KB, Cullen B, Leach RJ, Hanemann CO, De Jonghe P, Raeymaekers P, van Ommen G-JB, Martin J-J, Müller HW, Vance JM, Fischbeck KH, Van Broeckhoven C (1992) The peripheral myelin protein gene PMP22 is contained within the Charcot-Marie-Tooth disease type 1A duplication. *Nature Genet* 1: 171-175.

Tobler AR, Notterpek L, Naef R, Taylor V, Suter U, Shooter EM (1999) Transport of Trembler-J mutant peripheral myelin protein 22 is blocked in the intermediate compartment and affects the Transport of the wild-type protein by direct interaction. *J Neurosci* 19: 2027-2036.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 76: 4350-4354.

Trapp BD, Itoyama Y, Sternberger NH, Quarles RH, Webster HD (1981) Immunohistochemical localization of P0 protein in Golgi complex membranes and myelin of developing rat Schwann cells. *J. Cell Biol* 90: 1-6.

Trapp BD, Dubois-Dalcq M, Quarles RH (1984) Ultrastructural localization of P2 protein in actively myelinating rat Schwann cells. *J. Neurochem* 43: 944-948.

Trapp BD, Kidd GJ, Hauer P, Mulrenin E, Haney CA, Andrews SB (1995) Polarization of myelinating Schwann cell surface membranes: role of microtubules and the Trans-Golgi network. *J Neurosci* 15: 1797-1807.

Uyemura K, Tobar C, Hirano S, Tsukuda Y (1972) Comparative studies on the myelin proteins of bovine peripheral nerve and spinal cord. *J Neurochem* 19: 2607-2614.

Valentijn LJ, Ouvrier RA, van den Bosch NHA, Bolhuis PA, Baas F, Nicholson GA (1995) Dejerine-Sottas neuropathy is associated with a de novo PMP22 mutation. *Hum. Mut* 5: 76-80.

Valentijn LJ, Bolhuis PA, Zorn I, Hoogendijk JE, van den BN, Hensels GW, Stanton VP, Jr., Housman DE, Fischbeck KH, Ross DA, . (1992) The peripheral myelin gene PMP-22/GAS-3 is duplicated in Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Nat Genet* 1: 166-170.

Voshol H, van Zuylen CWEN, Orberger G, Vliegenthart JFG, Schachner M (1996) Structure of the HNK-1 carbohydrate epitope on bovine peripheral myelin glycoprotein P0. *J. Biol. Chem* 271: 22957-22960.

Warner LE, Roa BB, Lupski JR (1996) Absence of PMP22 coding region mutations in CMT1A duplication patients: further evidence supporting gene dosage as a mechanism for Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Hum Mutat* 8: 362-365.

Weise MJ, Greenfield S, Brostoff SW, Hogan EL (1983) Protein composition of PNS myelin: developmental comparison of control und Quaking mice. *J. Neurochem* 41: 448-453.

Welcher AA, Suter U, De Leon M, Snipes GJ, Shooter EM (1991) A myelin protein is encoded by the homologue of a growth arrest-specific gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 7195-7199.

Wiggins RC, Benjamins JA, Morell P (1975) Appearance of myelin proteins in rat sciatic nerve during development. *Brain Res* 89: 99-106.

Windebank AJ (1992) Hereditary motor und sensory neuropathies. In: *Disease of peripheral nervous system.* (Dyck PJ, Thomas PK, eds), pp 1143-1146. Saunders.

Wong MH, Filbin MT (1994) The cytoplasmic domain of the myelin P0 protein influences the adhesive interactions of its extracellular domain. *J Cell Biol* 126: 1089-1097.

Wong MH, Filbin MT (1996) Dominant-negative effect on adhesion by myelin P0 protein truncated in its cytoplasmic domain. *J Cell Biol* 134: 1531-1541.

Xu W, Manichella D, Jiang H, Vallat JM, Lilien J, Baron P, Scarlato G, Kamholz J, Shy ME (2000) Absence of P0 leads to the dysregulation of myelin gene expression und myelin morphogenesis. *J Neurosci Res* 60: 714-724.

Xu W, Shy M, Kamholz J, Elferink L, Xu G, Lilien J, Balsamo J (2001) Mutations in the cytoplasmic domain of P0 reveal a role for PKC-mediated phosphorylation in adhesion und myelination. *J Cell Biol* 155: 439-446.

Yancey PG, Rodriguez WV, Kilsdonk EP, Stoudt GW, Johnson WJ, Phillips MC, Rothblat GH (1996) Cellular Cholesterol efflux mediated by cyclodextrins. Demonstration of kinetic pools und mechanism of efflux. *J. Biol. Chem* 271: 16026-16034.

Zacchetti D, Peranen J, Murata M, Fiedler K, Simons K (1995) Vip17/MAL, a proteolipid in apical Transport vesicles. *FEBS Lett* 377: 465-469.

Zhang K, Filbin MT (1994) Formation of a disulfide bond in the immunoglobulin domain of the myelin P0 protein is essential for its adhesion. *J Neurochem* 63: 367-370.

Zhang K, Filbin MT (1998) Myelin P0 protein mutated at cys21 has a dominant-negative effect on adhesion of wildtype P0. *J. Neurosci. Res* 53: 1-6.

Zoidl G, Blass-Kampmann S, D'Urso D, Schmalenbach C, Muller HW (1995) Retroviral-mediated gene Transfer of the peripheral myelin protein PMP22 in Schwann cells: modulation of cell growth. *EMBO J* 14: 1122-1128.

7 Abkürzungen

Amp	Ampicillin
As	Aminosäure
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	(copy)Desoxyribonukleinsäure
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbeccos modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotid-Triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCS	fötales Kälberserum
g	Gravitationskonstante
GST	Glutathion-S-Transferase
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N,-(2-ethansulfonsäure)
HRP	Horseredichperoxidase
IPL	„Intra Period Line“
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid
kb	Kilobasen
kD	kilo Dalton
L	Liter
LB	Luria-Broth

m	milli
MBP	Myelin basische Proteine
MDL	„Major Dense Line“
min	Minute
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
NC	Nitrocellulosemembran
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PLA	Plasmolipin
PMP22	Peripheres Myelin Protein 22 kD
PNS	Peripheres Nervensystem
P0	Myelin Protein zero
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Sodiumdodecylsulfat
TBS	Tris gepufferte Saline
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
Upm	Umdrehungen pro Minute
ÜN	über Nacht
Wt	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem

8 Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand in der Arbeitsgruppe für molekulare Neurobiologie der Neurologischen Klinik der Heinrich-Heine-Universität.

Herrn Prof. Dr. Hans Werner Müller danke ich sehr herzlich für die interessante Fragestellung, seine wertvollen Anregungen und die engagierte Betreuung.

Herrn Prof. Dr. Ulrich Rütter danke ich herzlich für die Übernahme des Koreferates als Mitglied der mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät.

Herrn Dr. Frank Bosse danke ich für die Herstellung der retroviral transduzierten Zellen, seine unermüdliche Diskussionsbereitschaft und die stets vorhandene wissenschaftliche Unterstützung. Er war auch immer persönlicher Ansprechpartner.

Allen Mitarbeitern des Neurochemischen Labors möchte ich für die freundschaftliche Atmosphäre und die gute Zusammenarbeit danken.

Danken möchte ich insbesondere Christian Stephan und Dr. Michael Hamacher für die wertvollen Tipps in molekularbiologischen Fragen, die aufmunternden Worte und den vielen Spaß auch außerhalb des Labors.

Ein besonderer Dank gilt meinen FreundInnen, insbesondere Dina Jäger, für die moralische Unterstützung.

Ein ganz besonderer Dank und die Widmung dieser Arbeit gelten meiner Familie, insbesondere meiner Mom, für die nie endende Unterstützung in allen Belangen.

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit selbstständig und unter ausschließlicher Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen angefertigt zu haben. Alle Stellen, die aus veröffentlichten und nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, wurden als solche kenntlich gemacht. Diese Arbeit hat in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegen.

Düsseldorf, den