

Aus der Neurologischen Klinik der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Professor Dr. med. H.-P. Hartung

**Expression und Regulation der Transkriptionsfaktoren
Krox20, Krox24, Oct-6/SCIP, Mash1 und Mash2 in
kultivierten Rattenschwanzzellen**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt von

Tim Patrick Jürgens

2004

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Wolfgang H. M. Raab
Dekan

Referent: Univ.-Prof. Dr. Hans Werner Müller

Korreferent: Priv. Doz. Dr. Thorsten Rosenbaum

Meinen Eltern

»Ich bin ein Alchimist, weil ich einer bin«, sagte er, während er die Mahlzeit zubereitete.
»Ich erlernte diese Wissenschaft von meinen Vätern, die sie wiederum von ihren Vätern lernten, und so weiter bis zur Entstehung der Welt. Zu jener Zeit konnte die ganze Weisheit des Großen Werkes noch auf einem einfachen Smaragd geschrieben stehen. Aber die Menschen schenken den einfachen Dingen keine Beachtung und fingen an, Abhandlungen, Erläuterungen und philosophische Schriften zu verfassen. Sie fingen an zu behaupten, dass sie den Weg besser kannten als die anderen. Aber die Smaragdtafel ist bis heute wirksam.«

Paulo Coelho, Der Alchimist

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	8
1.1. Aufbau und Entwicklung des peripheren Nervensystems	8
1.1.1. Anatomie des peripheren Nervensystems	8
1.1.2. Allgemeine Grundlagen der Neurogenese	10
1.1.3. Myelinisierung im peripheren Nervensystem	12
1.1.4. Degeneration und Regeneration.....	13
1.2. Grundlagen der Genexpression	15
1.2.1. Regulation der eukaryontischen Genexpression	15
1.2.2. Allgemeine Grundlagen der Transkriptionsfaktoren	16
1.2.3. Grundlagen der Transkriptionsregulation	16
1.3. Die Helix-turn-helix Proteine	17
1.3.1. Allgemeine Aufbau der funktionellen Domäne.....	17
1.3.2. Homeobox-Proteine.....	18
1.3.3. POU-Domänen-Proteine.....	19
1.3.4. Oct-6/SCIP/Tst-1	21
1.4. Das Zinkfinger-Motiv	22
1.4.1. Allgemeine Aufbau der funktionellen Domäne.....	22
1.4.2. Die Familie der Krox-Gene	23
1.4.3. Krox20 (<i>egr2</i>).....	24
1.4.4. Krox24 (<i>egr1</i> , <i>NGFI-A</i> , <i>zif268</i>).....	26
1.5. Die bZIP-Domäne	27
1.5.1. Allgemeine Aufbau der funktionellen Domäne.....	27
1.6. Die bHLH-Domäne.....	28
1.6.1. Allgemeine Aufbau der funktionellen Domäne.....	28
1.6.2. Die Familie der achaete-scute Homologen in Mammalia (<i>Mash</i>)	30
1.6.3. <i>Mash1</i>	31
1.6.4. <i>Mash2</i>	31
1.7. Transkriptionsfaktoren in der Schwanzzellentwicklung.....	33
1.8. Fragestellung	36
2. MATERIAL UND METHODEN	37
2.1. Material	37
2.1.1. Puffer und Lösungen	37
2.1.2. Organische Lösungsmittel und Substanzen	38
2.1.3. Medien	38
2.1.4. Antibiotika	39
2.1.5. Enzyme	39
2.1.6. Transfektionsreagenzien	40
2.1.7. DNA-Molekulargewichtsstandard	40
2.1.8. Synthetische Oligonukleotide	41
2.1.9. <i>E. coli</i> - Bakterienstämme.....	42
2.1.10. Säulen.....	42
2.1.11. Plastikwaren für Zellkultur und Molekularbiologie.....	42
2.1.12. Geräte	42
2.1.13. Vektoren	42
2.2. Molekularbiologische Methoden.....	44
2.2.1. Isolation von Nukleinsäuren.....	44
2.2.1.1. Minipräparation von Plasmid-DNA mittels alkalischer Lyse	44
2.2.1.2. Maxipräparation von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i>	44

2.2.1.3.	RNA-Präparation nach Chomczynski und Sacchi (1987).....	44
2.2.1.4.	Qiagen RNA-Präparation.....	45
2.2.1.5.	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	45
2.2.1.6.	Phenol-Chloroform-Extraktion	46
2.2.2.	Bakterienkulturen.....	46
2.2.2.1.	Transformation	46
2.2.2.2.	Sonstige Techniken	47
2.2.3.	Elektrophoretische Auftrennung von DNA	47
2.2.3.1.	Agarose-Gelelektrophorese.....	47
2.2.4.	Klonierung.....	47
2.2.4.1.	Ligation, Dephosphorylieren.....	47
2.2.4.2.	Ligation von Fragmenten mit stumpfen DNA-Enden	48
2.2.4.3.	Fragmentierung von DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	48
2.2.5.	Reverse Transkription.....	48
2.2.5.1.	Elimination von Plasmid-DNA mit DNase I.....	48
2.2.5.2.	Reverse Transkription mit Superscript II	49
2.2.6.	Polymerase-Kettenreaktion	49
2.2.6.1.	DNA-PCR	49
2.2.6.2.	Semiquantitative RT-PCR	50
2.2.6.3.	Quantitative RT-PCR mit SYBR Green Assay	51
2.2.6.4.	Auswertung mittels vergleichender C _T -Methode	52
2.2.7.	Sequenzierung.....	54
2.2.7.1.	Probenvorbereitung	54
2.2.7.2.	Unidirektionale PCR-Amplifikation.....	54
2.2.7.3.	Automatische Sequenzierung.....	55
2.2.8.	Southern-Blot-Analyse.....	56
2.2.8.1.	Radioaktive Markierung von DNA-Sonden.....	56
2.2.8.2.	Southern-Blot.....	56
2.3.	Zellkultur-Methoden	57
2.3.1.	Zellkultur-Techniken	57
2.3.1.1.	Auftauen von Rattenschwanzzellen	57
2.3.1.2.	Passagieren von Rattenschwanzzellen.....	57
2.3.1.3.	Beschichten mit PDL	57
2.3.1.4.	Selektionierung zur Erstellung stabiler Zelllinien.....	58
2.3.1.5.	Ringklonieren.....	58
2.3.2.	Transfektion	58
2.3.2.1.	Optimierung der Transfektionseffizienz mittels Luziferase-Assay	58
2.3.2.2.	Bradford-Assay.....	59
2.3.2.3.	Transfektion eukaryontischer Zellen.....	59
2.3.2.4.	DOSPER	60
2.3.2.5.	FUGENE6.....	61
3.	ERGEBNISSE	62
3.1.	Erstellung der Expressionsvektoren pMash2/CDS und pMash2/Δ	62
3.1.1.	Klonierung von Mash2/CDS in pcDNA 3.1/Hygro(-)-Vektor	62
3.1.2.	Klonierung von Mash2/Δ in pcDNA 3.1/Hygro(-)-Vektor	64
3.2.	Expressionsprofile untransfizierter Rattenschwanzzellen	66
3.2.1.	Einleitung:	66
3.2.2.	Kultivierung und RNA-Gewinnung	66
3.2.3.	Semiquantitative RT-PCR.....	67
3.2.3.1.	Krox20	67
3.2.3.2.	Oct-6/SCIP	69
3.2.3.3.	Mash1	70
3.2.3.4.	Krox24	71

3.2.3.5.	Mash2.....	71
3.2.4.	Quantitative RT-PCR.....	71
3.2.4.1.	Mash2.....	71
3.2.4.2.	Krox24.....	74
3.3.	Erstellung stabiler Zelllinien.....	76
3.3.1.	Optimierung der Transfektionsbedingungen in Rattenschwanzzell-Kulturen ...	76
3.3.1.1.	Transfektion der Rattenschwanzzellen.....	76
3.3.1.2.	Luziferase-Assay und Bradford-Test.....	76
3.3.2.	Erstellung stabiler Zelllinien.....	78
3.3.2.1.	Transfektion und Selektion der transfizierten Zellen.....	78
3.3.3.	Analyse der transfizierten Zellen.....	79
3.3.3.1.	Zellyse und RNA-Präparation.....	79
3.3.3.2.	Molekulargenetische Charakterisierung:.....	80
4.	DISKUSSION.....	85
4.1.	Expressionsprofile untransfizierter Rattenschwanzzellen unter verschiedenen Kulturbedingungen:.....	85
4.1.1.	Krox20.....	88
4.1.1.1.	Beschreibung des Expressionsprofils:.....	88
4.1.1.2.	Vergleich mit anderen Expressionsprofilen:.....	88
4.1.1.3.	Vergleich der Expressionsdaten mit bekannten Daten:.....	88
4.1.1.4.	Vergleich mit Läsionsexperimenten:.....	91
4.1.2.	Krox24.....	92
4.1.2.1.	Beschreibung des Expressionsprofils:.....	92
4.1.2.2.	Vergleich mit anderen Expressionsprofilen:.....	92
4.1.2.3.	Vergleich der Expressionsdaten mit bekannten Daten:.....	92
4.1.2.4.	Vergleich mit Läsionsexperimenten:.....	94
4.1.3.	Oct-6/SCIP.....	94
4.1.3.1.	Zusammenfassung des Expressionsprofils:.....	94
4.1.3.2.	Vergleich mit anderen Expressionsprofilen:.....	95
4.1.3.3.	Vergleich der Expressionsdaten mit bekannten Daten:.....	95
4.1.3.4.	Vergleich mit Läsionsexperimenten:.....	99
4.1.4.	Mash1.....	99
4.1.4.1.	Zusammenfassung des Expressionsprofils:.....	99
4.1.4.2.	Vergleich mit anderen Profilen:.....	100
4.1.4.3.	Vergleich der Expressionsdaten mit bekannten Daten:.....	100
4.1.4.4.	Vergleich mit Läsionsexperimenten:.....	102
4.1.5.	Mash2.....	102
4.1.5.1.	Zusammenfassung des Expressionsprofils:.....	102
4.1.5.2.	Vergleich mit anderen Expressionsprofilen:.....	102
4.1.5.3.	Vergleich der Expressionsdaten mit bekannten Daten:.....	102
4.1.5.4.	Vergleich mit Läsionsexperimenten:.....	106
4.2.	Überexpression von Mash2 in Rattenschwanzzellen.....	107
4.2.1.	Reaktion der Schwanzzelle auf eine Überexpression von Mash2.....	107
4.2.2.	Transiente versus stabile Überexpression.....	108
4.3.	Zusammenfassende Bewertung und Ausblick:.....	109
4.3.1.	Zusammenfassende Bewertung:.....	109
4.3.2.	Ausblick:.....	111
5.	ABKÜRZUNGEN.....	113
5.1.	Allgemeine Abkürzungen.....	113
5.2.	Aminosäuren.....	116

6. ZUSAMMENFASSUNG	117
7. LITERATURVERZEICHNIS.....	118
8. ANHANG.....	142
8.1. Danksagung	142
8.2. Lebenslauf.....	143

1. EINLEITUNG

1.1. AUFBAU UND ENTWICKLUNG DES PERIPHEREN NERVENSYSTEMS

1.1.1. Anatomie des peripheren Nervensystems

Der Begriff „Nerv“ leitet sich vom lateinischen Wort „nervus“ ab, unter dem man ursprünglich Sehne verstand. Erst Herophilus beschrieb im 3. Jahrhundert vor Christus die Nerven als eigene anatomische Entität und grenzte sie damit von den Bestandteilen des Bewegungsapparates ab.

Das periphere Nervensystem, wozu man alle Strukturen (einschließlich der Hirnnerven) außerhalb des Gehirns und des Myelons zählt, stellt das Bindeglied zwischen zentralem Nervensystem und den motorischen, sensorischen, somatischen und viszerale Endorganen dar. Es besteht histologisch aus drei Grundstrukturen: den Neuronen, den die Myelinscheiden ausbildenden Schwannzellen sowie dem umgebenden Bindegewebe. Je distaler sich diese Strukturen befinden, desto komplexer werden ihre anatomischen Beziehungen. Aus diesen drei Grundstrukturen werden die 31 Spinalnerven gebildet. Sie weisen über weite Teile eine segmentale Gliederung auf. Dieses Prinzip wird im Bereich der die Extremitäten versorgenden Nerven und der 12 Gesichtsnerven aufgehoben. Im Bereich der Extremitäten kommt es zur Plexusbildung mit Verlagerung, Auflösung und Zusammenfassung der segmentalen Strukturen. Wesentliche strukturelle Elemente der 10^{10} im gesamten Nervensystem enthaltenen Nervenzellen sind Perikaryon, Dendriten und Axon. Das Perikaryon enthält als trophisches Zentrum der Zelle den zentral gelegen Nukleus mit deutlichem Nukleolus sowie das Zytoplasma, das auch als Nissl-Substanz beschriebene Aggregationen von rauhem endoplasmatisches Retikulum, Golgi-Apparate, Mitochondrien sowie Neurofilamente enthält. Dendriten sind die baumartig verzweigten Fortsätze des Neurons, die zur Kontaktbildung mit Axonen und Erregungsweiterleitung auf das Perikaryon hin dienen. Das Axon, welches jede Zelle nur einmal besitzt, stellt den efferenten Schenkel der Reizleitung dar und kann Längen bis zu 1000 mm erreichen. Es ist aus dem Nissl-freien Ursprungskegel, dem anschließenden Initialsegment, den proximal auftretenden Kollateralen, die oft zum Perikaryon zurücklaufen, einem verzweigten Axonende, dem Telodendron sowie vor allem in vegetativen Nervenzellen auftretenden Varikositäten aufgebaut. Das Axoplasma ist organellenarm (Mitochondrien, axoplasmatisches Retikulum, multivesikuläre und dichte lamelläre Körperchen membranöse Zisternen, Tuben und Vesikel), jedoch reich an Neurofibrillen und Neurotubuli. Der anterograde axonale Transport zur anschließenden Synapse hin erfolgt über zentral gelegene Neurotubuli als schnelle Komponente mit 100-400 mm/Tag sowie als langsame Komponente mit 1-8 mm/Tag. Der langsamere retrograde Transport über randständige Neurotubuli läßt sich ebenfalls in eine schnelle Komponente mit einer Geschwindigkeit von 100-200 mm/Tag sowie eine

langsamere mit 3-8 mm/Tag einteilen. Das distale Axonende stellt mit der präsynaptischen Membran als plasmalemmale Auftreibung ein Element der anschließenden Synapse dar. Die Neuroglia des peripheren Nervensystems umfaßt Schwannzellen, Mantelzellen der Ganglien, Nervenendkörperchen, Merkelzellen sowie Vater-Pacini-Lamellenkörperchen. Die Schwannzellen dienen der elektrischen Isolierung der Axone und bilden dem Axon unmittelbar aufliegende Myelinschichten aus. Nach Abschluß der Entwicklung verbleibt der Nukleus auf der Außenseite der Myelinscheide. Residuales Zytoplasma zwischen Myelinschichten stellt sich lichtmikroskopisch als Schmidt-Lantermann-Einkerbung dar. Eine Schwannzelle myelinisiert ein Axon auf einer Länge von etwa 0.2-1.5 mm. Die zwischen zwei Schwannzellen liegenden und auch als Ranvier-Schnürringe bezeichneten Interzellulargaps sind lediglich von Basallamina bedeckt und stellen die Grundlage für die saltatorische Erregungsleitung dar. Nicht-myelinisierte Axone, die peripher im wesentlichen dem vegetativen Nervensystem zugeordnet werden, sind einzeln oder auch in Gruppen von einem von der Schwannzelle gebildeten Mesaxon umgeben. Die funktionelle Einheit aus Axon und Schwannzelle bezeichnet man als Nervenfasern. Hinsichtlich der von ihnen innervierten Gewebe und Organe unterscheiden sich die Nervenfasern in ihrem Myelinisierungsgrad, ihrem Durchmesser und damit zusammenhängend in ihrer Leitungsgeschwindigkeit (Tab. 1).

Gruppe	Nervenfasern-Querschnitt (µm)	Leitungsgeschwindigkeit (m/sec)	Vorkommen
A α	10-20	60-120	Efferenzen zur quergestreiften Muskulatur
A β	7-15	40-90	Afferenzen Haut (Berührung)
A γ	4-8	15-30	Efferenzen von intrafasalen Fasern (Muskelspindeln)
A δ	3-5	5-25	Afferenzen aus Haut (Temperatur, Schmerz)
B	1-3	3-15	präganglionäre vegetative Fasern
C	0.3-1	0.5-2	postganglionäre vegetative Fasern, Schmerzleitung

Tab. 1. Eigenschaften der Muskelfasern nach Gruppen; A α – B: myelinisierte Fasern, C: nicht-myelinisiert.

Der periphere Nerv besteht als Zellverband aus einer Vielzahl von Faszikeln, die wiederum aus zahlreichen Nervenfasern zusammengesetzt sind. Sie werden zunächst vom Endoneuralraum umgeben, der im Bereich der proximalen Wurzelabschnitte zum Subarachnoidalraum hin und im Bereich der distalen Nerven zum Interstitium hin geöffnet und teilweise flüssigkeitsgefüllt ist. Der Endoneuralraum enthält zudem Histozyten, Mastzellen und Kollagenbündel. Im weiteren distalen Verlauf umschließt als zweite Hülle das Perineurium die einzelnen Faszikel, das durch längs und zirkulär orientierte elastische Fasern und Kollagenbündel einerseits Schutz vor Zugkräften bietet und andererseits durch ein mehrschichtiges Gewebe neuroektodermaler Genese mit bedeckender Basalmembran

und „tight junctions“ eine Diffusionsbarriere darstellt. Die äußere Schutzhülle des peripheren Nerven wird durch das Epineurium gebildet, welches als adventitielles Bindegewebe die Struktur zu benachbarten anatomischen Strukturen vermittelt und zugleich als Gleitlager dient. Es schützt zudem wesentlich vor Druckläsionen (Schiebler und Schmidt, 1991; Sunderland, 1991; Gardner und Bunge, 1993; Mumenthaler, 1993; Fernandez et al., 1996).

1.1.2. Allgemeine Grundlagen der Neurogenese

Die Ausbildung des Nervensystems läßt sich in vier wesentliche Schritte aufteilen: die Spezifizierung der neuronalen Identität (Glia oder Neuron), die Migration der Neurone und Aussprossen der Axone zu ihren Zielzellen, die Ausbildung von Synapsen mit den Zielzellen sowie die Modifikation und Feinabstimmung der synaptischen Übertragung durch Untergang von Axonbündeln oder programmierten Zelltod. Aus *Drosophila* ist bekannt, dass die frühe Phase der Entwicklung des Nervensystems im Neuroektoderm beginnt, das aus zwei longitudinalen Zellstreifen entlang der dorso-ventralen Achse besteht. In diesen proneuralen Clustern werden die basischen helix-loop-helix Proteine des *achaete-scute*-Komplexes (*achaete* und *scute*) sowie *atonal* gebildet, die als Initiatoren der neuronalen Spezifizierung gelten (Abb. 1A). Die Expression von *achaete-scute* Genen führt zur späteren Differenzierung der proneuralen Zellen zu äußeren Sinnesorganen, während sich unter dem Einfluß von *atonal* die chordotonalen Organe in *Drosophila* ausbilden (Skeath und Doe, 1996; Anderson und Jan, 1997; Wolpert et al., 1998a).

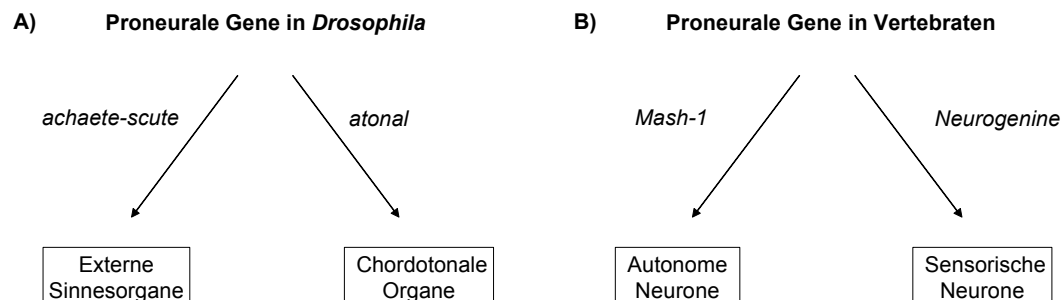


Abb. 1. Evolutionäre Konservierung proneuraler Gene bei der Festlegung der neuronalen Subtypen in peripheren Neuronen. A) *achaete scute* und *atonal* sind wichtige proneurale Gene in *Drosophila*, wobei die *achaete-scute* Gene für die Ausbildung der externen Sinnesorgane verantwortlich sind, während das *atonal* Gen eine vergleichbare Rolle in der Entwicklung der chordotonalen Organe einnimmt. B) In höheren Vertebraten nehmen die Homologe der *achaete-scute* Gruppe (insbesondere *Mash1*) eine wichtige Rolle in der Differenzierung von autonomen Neuronen, während die mit *atonal* verwandten *Neurogenine* eine vergleichbare Rolle in der Neurogenese sensorischer Neurone einnehmen (Anderson, 1999).

Im Mammalia spielen das *achaete-scute* Homologe *Mash1* zusammen mit dem *atonal*-Homologen *Neurogenin1* (*Ngn1*) und *Neurogenin2* (*Ngn2*) eine wesentliche Rolle in der Differenzierung von neuronalen Stammzellen im peripheren und zentralen Nervensystem (Abb. 1B). *Mash1* wird u.a. für die Differenzierung von Vorläuferzellen im ventralen Telencephalons

und des olfaktorischen Epithels, während die Neurogenine für Entstehung der kranialen und dorsalen Hinterwurzelganglien, des dorsalen Telencephalons und des vorderen Rückenmarks verantwortlich gemacht werden (Parras et al., 2002).

Durch laterale Inhibition, die durch den Liganden Delta und den Rezeptor Notch vermittelt wird, wird sichergestellt, dass sich jeweils nur eine Zelle des proneuralen Clusters zu einem Neuroblasten weiterentwickelt (Artavanis-Tsakonas et al., 1995; Wolpert et al., 1998a). In Vertebraten entsteht das Nervensystem aus der Neuralplatte, einer Zone säulenartig angeordneten Epithels, welches während der Gastrulation aus der dorsalen Oberfläche des Ektoderms abgespalten wird. In der Mitte der Neuralplatte bildet sich die Neuralrinne, die beidseitig von den Neuralwülsten begrenzt wird (Schiebler und Schmidt, 1991). Die laterale Inhibition erfolgt über die Interaktion von Delta und Notch mit Neurogenin, einem basischen Helix-loop-helix Protein. Die Expression von Neurogenin führt zur Bildung des basischen Helix-loop-helix Faktors NeuroD, der zur neuronalen Differenzierung nötig ist (Lee et al., 1995a). Gegen Ende der Gastrulation faltet sich die Neuralplatte und formt das Neuralrohr. Die Öffnung am oberen Ende, der Neuroporus rostralis verschließt sich am 25., der am unteren Ende gelegene Neuroporus caudalis am 27. Entwicklungstag. Danach entstehen als ektodermale Verdickungen die Ohrplakode, die Linsenplakode sowie die Riechplakode. Zudem wandern die ektodermalen Zellen der späteren Neuralleiste aus dem dorsalen Teil des Neuralrohrs aus. Aus der Neuralleiste entstehen im weiteren Verlauf die sensiblen Neurone des peripheren Nervensystem, die vegetativen Ganglien, periphere Gliazellen, Pigmentzellen (außer denen des Auges und des zentralen Nervensystems) sowie das Kopfmesenchym, aus welchem knöcherne und knorpelige Strukturen des Kopfes entstehen. Dem Neuralrohr entstammt das Gehirn und das Myelon (Schiebler und Schmidt, 1991). Wesentliche Regulatoren der Regionalisierung und positionalen Identität entlang der antero-posterioren Achse stellen dabei die Hox-Gene dar. Die dorso-ventrale Gliederung des Myelons wird durch die Transkriptionsfaktoren Sonic hedgehog, Pax3, Pax7 und die Wachstumsfaktoren BMP-4 und Dorsalin-1 der TGF- β Familie vermittelt (Placzek und Furley, 1996; Tanabe und Jessell, 1996; Wolpert et al., 1998a). Die Differenzierung der Motorneurone geht mit der differenziellen Expression von Proteinen mit einer LIM Homeodomäne einher. Zunächst exprimieren alle Motoneurone die Proteine Isl-1 und Isl-2. Im weiteren Verlauf werden dann in axialen Muskelgruppen die Proteine Isl-1, Isl-2 sowie LIM-3, in ventralen Muskelgruppen der Extremitäten die Proteine Isl-1 und Isl-2 sowie in dorsalen Extremitätenmuskeln die Proteine Lim-1 und Isl-2 exprimiert (Tsuchida et al., 1994; Thor und Thomas, 1997; Dambly-Chaudiere und Vervoort, 1998; Pfaff und Kintner, 1998; Wolpert et al., 1998a; Thor et al., 1999).

1.1.3. Myelinisierung im peripheren Nervensystem

Die Gruppe der Myelinge und ihrer Verwandten umfaßt das myelinassoziierte Glykoprotein (MAG), myelinbasisches Protein (MBP), Myelinprotein P₀ (P₀), Periaxin, peripheres Myelinprotein 22 (PMP22), Plasmolipin, Proteolipid-Protein (PLP) das fettsäurebindende Protein P₂ sowie das Gap-Junction-Protein Connexin32 (Cx32) (Narayanan et al., 1988; Gupta et al., 1990; Leblanc und Poduslo, 1990; Spreyer et al., 1991; Scherer et al., 1995a; Scherer et al., 1995b; Gillen et al., 1996; Jiang et al., 2000). Sowohl die entwicklungsabhängige Expression als auch die postläsionale Regulation nach Transektion oder Quetschläsion der Nerven verläuft weitgehend parallel. Im Rahmen der Entwicklung kommt es kurz nach der Geburt zur Myelinisierung der Nervenfasern, die durch axonale Signale induziert wird. In nicht-myelinisierenden Schwannzellen ist die Expression dieser Myelinge deutlich niedriger als in myelinisierenden Schwannzellen (Jessen und Mirsky, 1992, 2001). Daneben kann eine verminderte Expression von Proteinen, wie die Neuralen Zell-Adhäsionsmoleküle (NCAM), der Neurotrophinrezeptor, p75 und GFAP beobachtet werden, die vor allem in unreifen Schwannzell-Vorläuferzellen und nicht-myelinisierenden Schwannzellen nachgewiesen werden können (Mirsky und Jessen, 2001). Die Axon-Schwannzell-Interaktion wird durch zahlreiche Stoffe moduliert, wie Neurotrophine Brain-derived neurotrophic factor (BDNF), Neural growth factor (NGF), Neurotrophin 3 (NT-3), Neurotrophin 4 (NT-4) und die entsprechenden Rezeptoren. Daneben spielen Mitglieder der TGF- β - und der GDNF-Familie, der IGF- und FGF-Familie, der β -Neureguline sowie der Cadherine und Integrine eine wesentliche Rolle in der Interaktion zwischen Axon und Schwannzelle (Scherer und Salzer, 2001).

In Läsionsexperimenten konnte gezeigt werden, dass es ab dem ersten Tag postläsional zu einer verminderten Expression der Myelinge kommt, die erst nach etwa vier Wochen wieder das Ausgangsniveau erreicht (Gillen et al., 1997; Narayanan et al., 1988; Leblanc und Poduslo, 1990; Spreyer et al., 1991; Scherer et al., 1995a; Scherer et al., 1995b).

Das Myelinprotein P₀, auch MPZ ("Myelin protein zero") genannt, ist ein sogenanntes "single-pass" Transmembran-Protein, welches eine ähnliche Faltstruktur wie Immunglobuline hat und das häufigste periphere Myelinprotein ist (Greenfield et al., 1973). Die biologische Bedeutung von P₀ liegt in der Ausbildung kompakter Myelinstrukturen durch Ausbildung von P₀-Tetrameren, die mit den P₀-Tetrameren der anliegenden Myelinschichten interagieren (Shapiro et al., 1996). Die Beobachtung, dass das P₀-Gen auf Chromosom 1 in der Nähe des ersten Genlokus für Charcot-Marie-Tooth Erkrankung vom Typ 1B (CMT1B) lokalisiert wurde, führte zur Vermutung, dass P₀ ein mögliches Kandidatengen für diese erbliche Neuropathie sein könnte (Bird et al., 1982; Hayasaka et al., 1993; Wrabetz et al., 2001). "Knockout"-Mäuse, die homozygot für ein P₀-Nullallel sind, zeigen eine Myelinisierungsstörung mit weniger kompakten Myelinschichten (Giese et al., 1992). Im

folgenden konnten zahlreiche Mutationen im P_0 -Gen identifiziert werden, die zur Ausbildung von Neuropathien, wie dem Typ 1B der Charcot-Marie-Tooth Erkrankung (CMT1B) und dem Déjérine-Sottas-Syndrom (DSS), führen (Bruzzone und Ressot, 1997; Wrabetz et al., 2001). Das GJ β 1-Gen kodiert für Connexin32 (Cx32), welches als Gap-Junction-Protein im engeren Sinne kein reines Myeligen ist, sondern als Myelin-verwandtes Protein bezeichnet wird. Es wird im Rahmen der Entwicklung der peripheren Nerven während der Waller'schen Degeneration und während Regenerationsprozessen nach Nervenläsionen wie die bekannten Myelinge stadienabhängig differentiell exprimiert (Scherer et al., 1995a). Connexin32 ist ein Protein mit vier Transmembrandomänen, von denen sechs ein Oligomer ausbilden, welches auch als "Connexon" oder "Hemikanal" bezeichnet wird. Zwei Connexone von benachbarten Myelinschichten derselben Schwannzelle bilden dann einen radialen Kanal aus, durch den Ionen und kleine Moleküle diffundieren können und der eine Verbindung zwischen dem perinukleären Zytoplasma und der Axon-Myelin-Grenzschicht darstellt (Scherer et al., 1995a; Wrabetz et al., 2001). Mutationen im GJ β 1-Gen führen zur Ausbildung einer Neuropathie, der X-chromosomal gebundenen Form der Charcot-Marie-Tooth Neuropathie (CMTX), die pathologische Veränderungen in Form einer verzögerten Nervenleitgeschwindigkeit aufweist (Wrabetz et al., 2001). Interessanterweise führt eine Mutation im Promotor von Connexin32, die eine CMTX verursacht, zur Beeinträchtigung der Funktion des HMG-Box Transkriptionsfaktors SOX10 (Bondurand et al., 2001).

Das periphere Myelinprotein 22 (PMP22) gehört, ebenso wie das Proteolipid-Protein (PLP), Connexin32, Plasmolipin und das Myelin-vesikuläre Protein (MVP17 oder MAL) zur Gruppe der Transmembranproteine mit vier hydrophoben Transmembrandomänen, die als Kandidatengene für demyelinisierende Erkrankungen des PNS und ZNS gelten (Müller, 2000). Es existieren zwei alternative Transkripte von PMP22, CD25 und SR13/gas3 (Bosse et al., 1994). Natürlich auftretende Mutationen im PMP22-Gen in Mäusen führen zum Phänotyp einer demyelinisierenden Neuropathie, den sogenannten trembler- und tremblerJ-Mutationen (Suter et al., 1992a, 1992b; Magyar et al., 1996). Es sind zahlreiche Mutationen in Form von Punktmutationen, Deletionen und Duplikationen im PMP22-Gen bekannt, die zur Ausbildung einer Neuropathie vom Charcot-Marie-Tooth Typ 1a (CMT1a), vom HNPP-Typ (hereditäre Neuropathie mit vermehrter Anfälligkeit für Drucklähmungen) und dem Déjérine-Sottas-Typ (DSS) führen können (Müller, 2000).

Sinkt die Expression der Myelinge P_0 und PMP22 auf weniger als 50% (bezogen auf das Expressionsniveau dieser Myelinge in Homozygoten für das Wildtypallel), so kann sich eine Polyneuropathie ausbilden (Martini et al., 1995; Adlkofer et al., 1997).

1.1.4. Degeneration und Regeneration

Während das adulte periphere Nervensystem die Fähigkeit zur Regeneration nach Läsionen besitzt, fehlt dem zentralen Nervensystem dies, was bei Schädigungen zentraler Neurone zu

einem Aussprossen kurzer Axonfortsätze führt, ohne dass eine gerichtete Regeneration mit Restitution der funktionellen Integrität des geschädigten Areals erreicht wird. Folge ist meist eine dauerhafte Beeinträchtigung oder Behinderung. Im peripheren Nervensystem dagegen stellt die Waller'sche Degeneration eine wesentliche Voraussetzung für anschließende regenerative Prozesse dar. Distal des Läsionsortes kommt es durch einwandernde aktivierte Makrophagen und die Schwannzellen selber zu einer Phagozytose und zum Abbau des Myelindebris. Dabei werden im distalen Anteil des Nerven das Axon und die Myelinscheide bis auf die Basallamina mitsamt der intakten Endotuben sowie der Schwannzellen abgebaut, die als sogenannte Büngner'sche Bänder erkennbar bleiben. Die Schwannzellen bilden einen Phänotyp ähnlich dem einer nicht-myelinisierenden Vorläuferzelle aus. Proximal des Läsionsortes kommt es zur kurzen Phase der retrograden Degeneration des Perikaryons sowie des Axons, die später erneut in die erhaltenen Leitstrukturen des degenerierten distalen Anteils einsprossen können (Fawcett und Keynes, 1990).

Die vier wesentlichen Voraussetzungen für funktionelle Regeneration wurden für das periphere Nervensystem formuliert, gelten jedoch prinzipiell auch für das zentrale Nervensystem (Küry et al., 2001):

1. Regeneration setzt das Überleben von Neuronen nach einer Schädigung voraus, so dass sie vor apoptotischen Prozessen geschützt werden müssen.
2. Eine Reaktivierung früherer Entwicklungsschritte ist notwendig, um eine axonale Elongation zu ermöglichen. Im Rahmen dieser Prozesse müssen die auswachsenden Axone Wachstumssignale erkennen, um ihr früheres Zielgewebe wieder zu innervieren. Innerhalb des PNS ist dies nur möglich, wenn die Basallamina als Leitschiene erhalten bleibt.
3. Es muss sichergestellt sein, dass gliales Narbengewebe kein Hindernis für den auswachsenden Wachstumskegel oder das Axon darstellt. Dies erfolgt im PNS durch die Waller'sche Degeneration.
4. Es muss eine Remyelinisierung erfolgen, die durch axonalen Kontakt mit der Gliazelle induziert wird und durch eine gliale Differenzierung ermöglicht wird.

Im zentralen Nervensystem werden ungünstige Umgebungsbedingungen, wie Myelin-assoziierte Inhibitoren und die durch reaktive Astrozyten entstehende gliale Narbe, für ein fehlendes Regenerationspotential verantwortlich gemacht. Neuere experimentelle Daten deuten jedoch darauf hin, dass adulte Zellen prinzipiell ein intrinsisches Regenerationspotential besitzen (Küry et al., 2001; Abankwa et al., 2002; Küry et al., 2004). Interessanterweise hat sich im Rahmen der Neurochirurgie des peripheren Nervensystems bei Verletzungen oder Tumoren gezeigt, dass entgegen dem Dogma der Regenerationsfähigkeit des PNS Unterbrechungen in bestimmten Nervenabschnitten kaum

zur Regeneration führen und sich der - wenn durchgeführt zumeist frustranen - neurochirurgischen Rekonstruktion entziehen. So sistiert bei präganglionären Läsionen des trigeminalen Hauptastes die zentripetale Regeneration vorzeitig im Bereich der Eintrittszone, wie auch bei Verletzungen der präganglionären Anteile der Hinterstrangwurzel im Bereich der Cauda equina. Beeinträchtigungen der motorischen Wurzeln des lumbalen Myelons führen hingegen aufgrund ihrer langen Regenerationszeit durch die zu überbrückende Strecke (bis zu mehr als 1000 mm Länge) und die zwischenzeitlich eintretenden zumeist irreversiblen degenerativen Schäden der Endorgane (im wesentlichen der innervierten Muskulatur) oft nur zu unbefriedigendem Therapieerfolg (Fernandez et al., 1996).

1.2. GRUNDLAGEN DER GENEXPRESSION

1.2.1. Regulation der eukaryontischen Genexpression

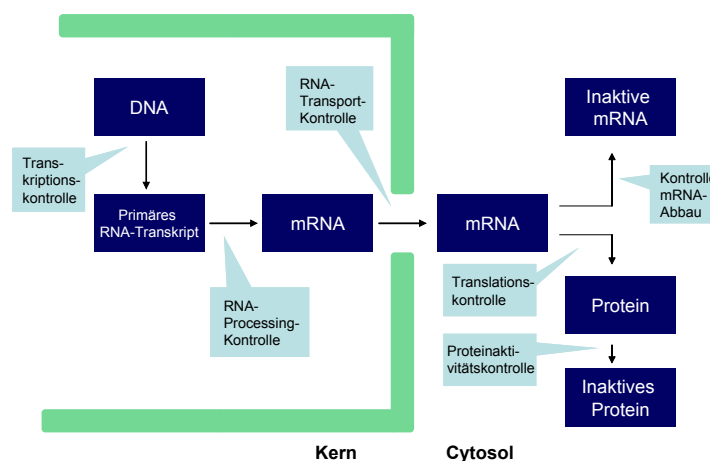


Abb. 2. Regulationsstufen der eukaryontischen Genexpression. (Alberts et al., 1994)

Eukaryontische Genexpression unterliegt einer Vielzahl von nukleären und zytosolischen Regulations- und Kontrollmechanismen (Abb. 2). Die transkriptionelle Kontrolle erfolgt unter anderem durch Transkriptionsfaktoren und ist entscheidend dafür, wann und wie oft ein Gen in mRNA transkribiert wird. Die sogenannte posttranskriptionelle Kontrolle beginnt ab der Stufe der RNA-Prozessierung. Hier erfolgt sie mittels alternativem RNA-Splicing, attenuierter Transkription und Modifikation des 3' Endes der mRNA durch Spaltung oder Poly-A-Addition. Auf Stufe der RNA-Transportkontrolle wird entschieden, welche mRNA ins Zytosol exportiert wird und in spezifische intrazelluläre Kompartimente der Zelle der Transport erfolgt, z.B. mittels spezifischer Sequenzen in der 3' untranslatierten Region (UTR) der mRNA. Dann erfolgt entweder ein gezielter Abbau spezieller mRNAs (mittels Abbau des Poly-A-Schwanzes in der 3' UTR oder Endonukleasen-vermittelter Abspaltung der 3' UTR) oder die

Translation in ein Protein. Auf Stufe der Proteinaktivitätskontrolle kommt es durch reversible Prozesse (z.B. Phosphorylierung) und irreversible Prozesse (Proteolyse) zu einer Modulation der Proteinaktivität (Alberts et al., 1994).

1.2.2. Allgemeine Grundlagen der Transkriptionsfaktoren

Transkriptionsfaktoren sind Regulatorproteine, die wesentlich zur Determinierung der zellulären Identität und Zellentwicklung beitragen. Sie enthalten in der Regel hochkonservierte DNA-Bindungsdomänen, die selektiv kurze DNA-Sequenzen erkennen. Man unterscheidet allgemeine Transkriptionsfaktoren, die ubiquitär exprimiert werden und basale Funktionen erfüllen, und spezifische Faktoren, die in Abhängigkeit von Zelltyp und -stadium exprimiert werden. Generelle Transkriptionsfaktoren bilden mit der RNA-Polymerase den basalen Transkriptionskomplex und binden an einen Promotor, wodurch die effiziente und korrekte Transkription als Grundlage der konstitutiven Genexpression ermöglicht wird. Bei der Transkription von Genen in mRNA spielen die RNA-Polymerase II, ribosomale und transfer-RNA sowie andere RNA-Arten eine wesentliche Rolle (Tamura et al., 1996). Der typische Aufbau der spezifischen Transkriptionsfaktoren umfasst eine in ihrer dreidimensionalen Struktur charakteristische DNA-Bindungsdomäne, die an eine spezifische DNA-Sequenz bindet, eine flexible und weniger genau definierte Transaktivierungsdomäne sowie eine Interaktionsdomäne, die Kontakte mit anderen Proteinen vermittelt und dadurch in ihrer regulatorischen Potenz moduliert wird. Typische DNA-Bindungsdomänen sind die basischen Regionen des Leucin-Zipper-Motives und des helix-loop-helix Motives, der Homöobox-Domäne, der POU-Domäne, der Zinkfinger-Domäne sowie der SRF-Domäne. Transaktivierungsdomänen beinhalten saure Domänen mit zahlreichen Glutaminsäure- und Asparaginsäureresiduen sowie andere glutaminreiche, prolinreiche, serin/threoninreiche und alaninreiche Domänen.

1.2.3. Grundlagen der Transkriptionsregulation

Charakteristische Interaktionen der Transkriptionsfaktoren finden einerseits auf Protein-DNA-Ebene, andererseits auch auf Protein-Protein-Ebene statt. Typische Protein-DNA-Wechselwirkungen umfassen die Bindung an eine Erkennungssequenz in der Genkontrollregion eines zu beeinflussenden Zielgens. Protein-Protein-Wechselwirkungen treten bei Bindung eines Komplexes an einen zellulären Rezeptor oder bei Ausbildung von Oligomeren mit Modifikation der aktivierenden oder reprimierenden Eigenschaften auf. Am Beispiel von MyoD wird deutlich, dass je nach Bindungspartner eine Homodimerenbildung mit Bindung an DNA ermöglicht wird oder - im Fall einer Heterodimerenformation aus MyoD und einem inhibitorischen Protein - die DNA-Bindung unterbleibt (Abb. 3). Inhibitorische Regulation durch Transkriptionsfaktoren kann durch indirekte Repression erfolgen, bei der der reprimierende Faktor einen aktivierenden Faktor von der DNA-Bindung kompetitiv

verdrängt. Vermittelt wird dies durch Reorganisation der Chromatinstruktur, Blockade der DNA-Bindungssequenz durch Kontakt mit einem hemmenden Faktor, Protein-Protein-Komplexbildung ohne DNA-Bindungsaffinität (Abb. 3) oder über Modulation der Aktivierungskraft eines Regulators durch inhibitorische Faktoren („Quenching“). Indirekte Repression erfolgt über Aktivitätsminderung oder Destabilisierung des basalen Transkriptionskomplexes mit RNA-Polymerase II.

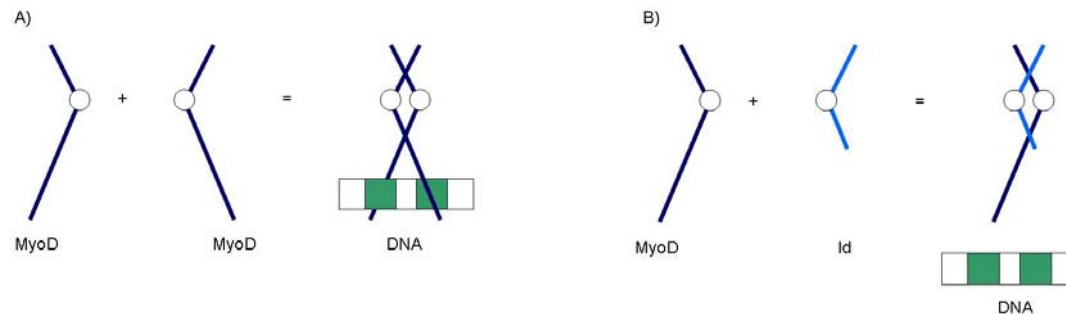


Abb. 3. Genregulation durch Dimerisation am Beispiel von MyoD. A) Bei Vorliegen von zwei identischen Monomeren (MyoD) kommt es zur Bildung eines Homodimers mit Bildung eines Protein-DNA-Komplexes. B) Bei Ausbildung eines Heterodimers aus MyoD und einem inhibitorisch wirkenden Id-Protein kann sich aus sterischen Gründen kein Protein-DNA-Komplex ausbilden.

Verantwortlich dafür sind Transkriptionsfaktoren, die direkt via Protein-Protein-Interaktion den Transkriptionskomplex beeinflussen und solche, die an spezifische DNA-Bindungssequenzen strangaufwärts im Zielpromoter binden und dann modulierend auf den Transkriptionskomplex einwirken (Latchman, 1996).

Probleme bei der Analyse der Regulationskaskaden von Transkriptionsfaktoren bestehen in den teilweise sehr komplexen Interaktionen der Faktoren untereinander, in der spezifisch stadien- und gewebeabhängigen sowie der positional determinierten Expression eines Faktors und der Präsenz bisher unbekannter Bindungspartner (Pabo und Sauer, 1992; Alberts et al., 1994; Knippers, 1997).

1.3. DIE HELIX-TURN-HELIX PROTEINE

1.3.1. Allgemeine Aufbau der funktionellen Domäne

Das Helix-turn-helix-Motiv ist zum Beispiel als zentrales Motiv in der DNA-Bindungsdomäne des Lac-Repressors beschrieben worden. Es konnte in kernspintomographischen Strukturanalysen gezeigt werden, dass es aus α -Helices zusammengesetzt ist, die durch definierte Drehungen ("turns") in der Polypeptid-Kette voneinander getrennt sind. Neben dem typischen Aufbau aus zwei α -Helices kann es auch aus drei aufeinanderfolgenden α -Helices bestehen. Eine zentrale Rolle nimmt die dem "turn" folgende α -Helix ein, die auch als

Erkennungshelix bezeichnet wird und sich in die große Rinne der DNA legt (Abb. 4).

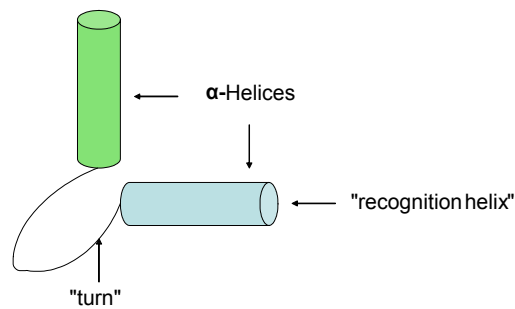


Abb. 4. Aufbau des Helix-turn-helix-Motiv. Es setzt sich aus α -Helices zusammen, die durch eine Drehung des Aminosäurekette ("turn") voneinander verbunden werden. Die dem "turn" folgende α -Helix dient der DNA-Erkennung und lagert sich der großen Rinne der DNA an. Die andere α -Helix liegt orthogonal dazu und dient der Stabilisierung.

Über Seitenketten von hydrophilen Aminosäuren (Glutamin, Serin, Tyrosin und Arginin) bilden sich mit Basenpaaren in den Bindungssequenzen der DNA spezifische Wasserstoffbrückenbindungen aus. Die α -Helix I und weitere liegen quer zur Erkennungshelix und sind für eine Stabilisierung des Protein-DNA-Komplexes wichtig (Pabo und Sauer, 1992; Alberts et al., 1994; Knippers, 1997).

1.3.2. Homeobox-Proteine

Die Gruppe der Homeobox-Proteine stellt eine große Familie von Transkriptionsfaktoren dar, die eine hochkonservierte 60 Aminosäuren große DNA-Bindungsdomäne mit einem helix-turn-helix Motiv, die Homeodomäne, enthalten. Bei Mutationsanalysen in *Drosophila melanogaster* wurden Mutationen dieser Transkriptionsfaktoren als Ursache für Störungen in der Differenzierung von Körpersegmenten identifiziert. Der Name leitet sich von homeotischen Transformationen ab, bei denen eine Struktur durch eine andere ersetzt wurde. So werden bei der Mutation *antp* (*antennapedia*) in einem Kopf-Segment die Antennen durch ein Paar Beine ersetzt. Weitere bekannte homeotische Transkriptionsfaktoren in *Drosophila* sind *eve* (*even skipped*), *ubx* (*ultrabithorax*), *en* (*engrailed*) und *ftz* (*fushi tarazu*) (Pabo und Sauer, 1992; Knippers, 1997). In Säugern konnte bei homozygoten knock out-Mutationen des *Hox-c8*-Gens ein achttes Paar Rippen am Sternumansatz sowie ein 14. Paar Rippen am ersten Lendenwirbelkörper beobachtet werden (Wolpert et al., 1998b; Van Den Akker et al., 2001). Beim Menschen führt eine Mutation von *Hox-d13* zu Synpolydaktylie. Mutationen im engsten Verwandten, dem *Hox-a13*-Gen, führen zum Hand-Fuß-Genital-Syndrom, bei dem Patienten Defekte der Finger und Zehen aufweisen. Der genitale Defekt besteht bei Frauen aus einem unvollständig fusionierten Müller-Gang, bei Männern aus einer Epispadie (Mortlock et al., 1996; Goff und Tabin, 1997; Goodman et al., 1997; Scott, 1997; Van Den Akker et al., 2001). Vertebraten haben vier

Kopien der jeweils 13 Hox-Gene, die als Cluster Hox-a bis Hox-d bezeichnet werden und jeweils auf unterschiedlichen Chromosomen lokalisiert sind. Im Laufe der Evolution sind sie vermutlich aus einem Urcluster durch Genduplikation entstanden. Die Gene eines Clusters weisen Sequenzähnlichkeiten auf und werden als Paraloge bezeichnet. Die Homologie der Homeodomäne untereinander ist am stärksten in den Homeodomänen ausgeprägt und nimmt im Bereich der flankierenden Sequenzen rapide ab (Sharkey et al., 1997). Als möglicher Bindungspartner für Hox-a2 und Hox-b2 wurde Krox20 identifiziert. Krox20 wird eine Rolle als trans-regulierender Transkriptionsfaktor, der mit dem Enhancer der Hoxgene interagiert, zugeschrieben (Nonchev et al., 1995; Lufkin, 1996).

Der strukturelle Aufbau der Homeodomäne besteht aus einem hochkonservierten DNA-Bindungsmotiv von etwa 60 Aminosäuren Länge, der Homeobox. Außerhalb dieser Homeobox kommt es, der Vielfalt der Funktionen dieser Gruppe entsprechend, zu einer nur noch sehr geringen Sequenzhomologie. Sie setzt sich, wie bereits für das Helix-turn-helix-Motiv beschrieben, aus drei α -Helices (I-III) zusammen. Helix I und II liegen in antiparalleler Richtung eng zusammen. Durch eine Polypeptid-Kette, die zu einer Drehung der Struktur führt, dem sogenannten "turn", liegt die dritte Helix orthogonal zur zweiten. Durch innenliegende, hydrophobe Seitengruppen wird der Komplex zudem stabilisiert. Die DNA-Erkennung wird durch die dritte Helix vermittelt, die sich als Erkennungshelix in die große Rinne der DNA legt und über Seitengruppen der Aminosäuren an DNA-Basen und Sauerstoff-Atome in Phosphodiester-Bindungen an die Zielsequenz bindet (Pabo und Sauer, 1992; Alberts et al., 1994; Knippers, 1997).

1.3.3. POU-Domänen-Proteine

Die POU-Domäne ist aus einem POU-spezifischen Teil im aminoterminalen Bereich sowie einer POU-Homeobox aufgebaut, die von einem flexiblen Teil mit 14-26 Aminosäuren Länge getrennt wird. Die DNA-Bindungsaffinität der POU-Homeobox wird durch den POU-spezifischen Teil um den Faktor 1000 gesteigert. Die POU-Homeobox lagert sich – analog der POU-spezifischen Domäne - zu einem Helix-turn-helix Motiv zusammen. Die α -Helices III sowohl der POU-spezifischen als auch der POU-Homeodomäne lagern sich als DNA-erkennendes Element an die große Rinne der DNA an, während die übrigen Helices maßgeblich für die Stabilität des Bindungskomplexes verantwortlich sind (Abb. 5). Die Bindungsaffinität der isolierten POU-spezifischen Domäne an DNA-Sequenzen mit der Sequenz NNCAT ist extrem niedrig, während POU-Homeodomänen im Gegensatz zu klassischen Homeodomänen, die spezifisch an die Sequenz TAAT binden, keine hochaffinen, sequenzspezifischen Bindungen von Proteinen mit POU-Domäne an eine DNA-Zielsequenz erlauben. Erst die Kombination der beiden Untereinheiten erlaubt durch gegenseitige Modulation der Sequenzspezifität eine Bindung an asymmetrische DNA-Motive (Wegner et al., 1993a). Unter dem Einfluß der gebundenen POU-Proteine kommt es zur

Beugung der DNA. Bekannte Transkriptionsfaktoren mit POU-Bindedomäne sind Pit1 (pituitary factor 1), welches aktivierend auf die Transkription hypophysärer Gene wirkt, Unc86, welches in der Neurogenese in *Caenorhabditis elegans* eine maßgebliche Rolle spielt.

Eine Subgruppe der POU-Proteine stellen die Octamer-Binde-Proteine dar. Sie werden ubiquitär, zelltypspezifisch, aber auch phasenspezifisch in der Entwicklung exprimiert. Die Erkennungssequenz der Octamer-Binde-Proteine lautet: 5'-ATGCAAAT-3'. Die POU-Proteine werden in 6 Klassen unterteilt, wobei für Entwicklung des Nervensystems vor allem die Klassen III und IV relevant sind (Tab. 2).

Klasse	POU-Protein	genomische Organisation	Transaktivierungsdomäne	embryonale Expression	adulte Expression
I	Pit-1	MC 16 7 Exone	aminoterminal (Ser/Thr-reich)	Neuralrohr, Hypophyse	Hypophyse
II	Oct-1	MC 1, HC 1 Exon/Intron	aminoterminal (Glu-reich)	ubiquitär	ubiquitär
	Oct-2	MC 7, HC 19 14 Exone	aminoterminal (Glu-reich) carboxyterminal (Ser/Thr-reich)	Neuralrohr, gesamtes Gehirn bis auf Telencephalon	Lymphatische Zellen, Nervensystem, Eingeweide, Testis, Nieren
	Skn-1a/i (Oct-11)	MC 9 Exon/Intron		entwickelnde Epidermis	Epidermis (suprabasale Zellen, Haarfollikel)
III	Brn-1	MC 1 intronlos		entwickelndes Nervensystem	ZNS, Niere
	Brn-2 (N-Oct3, N-Oct5)	MC intronlos	aminoterminal (Glu-reich)	entwickelndes Nervensystem	ZNS, Glioblastom, Neuroblastom
	Brn-4 (N-Oct4)	MC X intronlos	aminoterminal	Neuralrohr	ZNS
	Oct-6/ SCIP Tst1)	MC 4 intronlos	aminoterminal (Gly/Ala-reich)	Blastozysten, ES- und EC-Zellen, Gehirn	Neurone, myelinisierende Glia, Testis
IV	Brn-3.0 (Brn3a)	MC 14, HC 13 3 Exone		entwickelndes Nervensystem (Hirnstamm, Rückenmark, Retina)	Retina, sensorische Ganglien, Milz, Neuroepitheliome, Ewing- Sarkome
	Brn-3.1	MC 18 3 Exone		entwickelndes Nervensystem	
	Brn-3.2 (Brn3b)			entwickelndes Nervensystem	
V	Oct-3/4 (Oct-5)	MC 17, HC 6 5 Exone	aminoterminal (Pro-reich)	ES und EC-Zellen, embryonisch ektodermale, primordiale Keimzellen, Testis, Ovar	Oozyten
VI	Emb (Brn-5)	MC 15 6 Exone		entwickelndes Nervensystem	Gehirn, Niere, Skelettmuskel, Testis

Tab. 2. Übersicht über die Eigenschaften von POU-Domäne-Proteinen; Abkürzungen: MC, Maus-Chromosom; HC, humanes Chromosom; Ala, Alanin; Gly, Glu, Glutaminsäure; Glycin; Pro, Prolin; Ser, Serin; Thr, Threonin (Wegner, 2000).

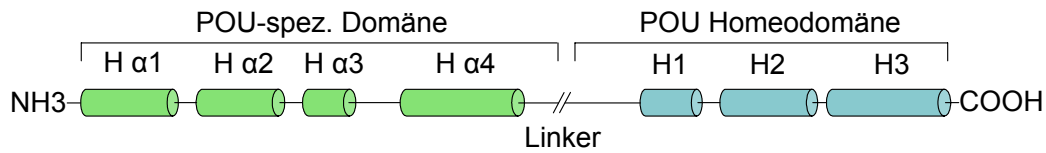


Abb. 5. Struktur und Funktion von POU-Domänen-Proteinen. Die funktionelle Domäne setzt sich aus zwei Untereinheiten zusammen, die jeweils an verschiedene DNA-Sequenzen binden. Die POU-spezifische Domäne im aminoterminalen Bereich besteht aus vier α -Helices, von denen Helix $\alpha 1$ und $\alpha 4$ eine Region mit basischen Aminosäuren enthalten. Die POU-Homeodomäne ist durch eine Linker-Region von 14 - 25 Aminosäuren Länge carboxyterminal mit der POU-spezifischen Domäne verbunden (Wegner et al., 1993a).

1.3.4. Oct-6/SCIP/Tst-1

A) ttg gaa ttc ccg gag cga ttg cat gca ggg gcc gcg tac cgc gaa gtg cag aag ctg ATG
 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
 B) GCA GCG GCG GCC GAG CGG CTG CAC GCG GGG GCC GCG TAC CGC GAA GTG CAG AAG CTG ATG
 C) Ala Ala Ala Ala Glu Arg Leu His Ala Gly Ala Ala Tyr Arg Glu Val Gln Lys Leu Met

Abb. 6. Vergleich der A) 5' untranslatierten Region des human Oct-6/SCIP-Gens und B) der codierenden Sequenz des murinen Oct-6/SCIP-Gens. C) Aminosäuresequenz des murinen Oct-6/SCIP-Proteins. Homologe Sequenzen sind durch einen vertikalen Balken gekennzeichnet. Abkürzungen: MC, Maus-Chromosom; HC, humanes Chromosom; Ala, Alanin; Gly, Glu, Glutamin; Glycin; Pro, Prolin; Ser, Serin; Thr, Threonin (Tobler et al., 1993).

Das POU-Domänen-Protein SCIP ist auch als Oct-6 in murinen embryonalen Stammzellen (Meijer et al., 1990) und Tst-1 in Rattentestes bekannt (He et al., 1991). Das supprimierte cAMP induzierbare POU (SCIP) wurde anfangs in myelinisierenden Glia-Zellen, also Astrozyten im Bereich des ZNS und Schwannzellen im Bereich des PNS nachgewiesen, nicht jedoch in nicht-myelinisierenden Gliazellen (Astroglia) (Monuki et al., 1989). Neben cAMP induziert Cycloheximid die Expression von Oct-6/SCIP in kultivierten Rattenschwanzzellen (Monuki et al., 1989). Das humane Oct-6/SCIP-Gen hat ein offenes Leseraster von 1194 Basenpaaren Länge. Das Protein besteht aus 398 Aminosäuren, während sich das murine Protein aus 449 Aminosäuren zusammensetzt. Auf Nukleotidebene beträgt die Homologie zwischen murinem und humanem Oct-6/SCIP 94.2%, auf Proteinebene 98.8%. Auch in den die kodierende Sequenz unmittelbar flankierenden Bereichen besteht eine hohe Sequenzhomologie. So unterscheiden sich das humane Oct-6/SCIP-Gen und die kodierende Sequenz des murinen Oct-6/SCIP-Gens innerhalb der ersten 30 Basenpaare der 5' untranslatierten Region kaum, während diese Homologie weiter stromaufwärts nimmt jedoch rasch abnimmt (Abb. 6). Der Wirkmechanismus von humanem Oct-6/SCIP-Protein erfolgt über einen Promotor mit Octamer-TATA-Sequenz (Tobler et al.,

1993). Mit den verwandten Klasse III POU-Domänen-Proteinen Brain-1 (Brn-1) und Brain-2 (Brn-2), die neurale Transkriptionsfaktoren sind, besteht eine Homologie der Aminosäuresequenzen von 93% bzw. 95% im Bereich der POU-Domäne. Für die Klasse II POU-Domänen-Proteine wie Oct-1 (70%) und Oct-2 (68%), das Klasse IV POU-Domänen-Protein Brain-3 (Brn-3) (46%) sowie das Klasse I POU-Domänen-Protein Pit-1 (62%) besteht eine deutlich niedrigere Homologie (Monuki et al., 1989).

Es konnte gezeigt werden, dass bei der progressiven multifokalen Leukencephalopathie (PML), die durch eine Infektion der myelinproduzierenden Gliazellen des ZNS mit dem humanen JC-Virus aus der Familie der Papovaviren verursacht wird, zum einen Interaktionen zwischen dem Transkriptionsfaktor Oct-6/SCIP und viralen Promotorsequenzen bestehen, zum anderen aber auch eine Stimulation von Oct-6/SCIP selbst über Bindung des viralen T-Antigens an ein 335 Basenpaar langes Segment im Oct-6/SCIP-Promotor erfolgen kann (Wegner et al., 1993b; Renner et al., 1996).

1.4. DAS ZINKFINGER-MOTIV

1.4.1. Allgemeine Aufbau der funktionellen Domäne

Zinkfinger-Proteine wurden zuerst in *Xenopus* als Transkriptionsfaktor IIIA (TFIIIA) isoliert. Sie sind in einer Vielzahl von Proteinen nachweisbar, die bei der eukaryontischen Genregulation eine Rolle spielen, wie Zelldifferenzierungs-assoziierten Proteinen, Proto-Onkogenen, generellen Transkriptionsfaktoren und zahlreichen spezifischen Regulatorproteinen. Das strukturelle Leitmotiv besteht am Beispiel des TFIIIA aus Tandem-Repeats des Musters Cys-X₂ oder 4-Cys-X₁₂-His-X₃₋₅-His, welches man auch als Cystein-Histidin-Zinkfinger bezeichnet (Abb. 7).

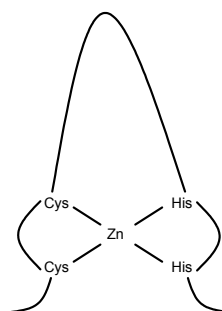


Abb. 7. Schematisierte Darstellung eines Zinkfinger-Proteins. Mittels der vier Cysteinreste wird die komplexe Struktur über ein zentrales Zink-Atom zusammengehalten. Abkürzungen: Zn, Zink; Cys, Cystein; His, Histidin. (Latchman, 1998).

Aus zweidimensionalen kernspintomographischen Strukturanalysen und Modellrechnungen ist bekannt, dass Zinkfinger-Motive eine α -Helix und ein β -Faltblatt enthalten. Durch zwei Cysteinreste nahe der Faltstelle des β -Faltblattes und zwei Histidinreste in der α -Helix wird

über ein zentrales Zink-Ion die komplexe Struktur zusammengehalten. Analysen der Kristallstruktur haben ergeben, dass Zinkfinger-Motive in der großen Rinne an den B-Strang der DNA binden und die Doppelhelix zum Teil umwickeln. Jeder Zinkfinger eines Transkriptionsfaktors bindet an eine 3 bp lange Sequenz der DNA. Zudem bestehen zahlreiche Wasserstoffbrücken-Bindungen zwischen den Transkriptionsfaktoren und den guaninreichen Abschnitten der Konsensus-Sequenzen auf der DNA. Zusätzliche Bindungen innerhalb des Protein-DNA-Komplexes sind zwischen Aminosäuren (im wesentlichen Arginin und Histidin) und Sauerstoffatomen in Phosphodiestern der DNA beschrieben (Pabo und Sauer, 1992).

Die Gruppe der Multi-Cystein-Zinkfinger umfaßt in Säugern die Steroid- und Schilddrüsenhormon-Rezeptoren. Sie enthalten eine hochkonservierte zentrale Domäne, die die DNA-Bindungs-fähigkeit des Rezeptors moduliert. Während die carboxyterminale Region dieser Domäne für die Hormonbindung verantwortlich ist, wird die aminoternale Region für eine maximale Transkription des Zielgens verantwortlich gemacht. Analog zu den Cystein-Histidin-Zinkfingern benötigen sie Zink oder ein verwandtes Schwermetall wie Cadmium als zentrales Atom, welches die DNA-Bindungs-fähigkeit sicherstellt. Im Gegensatz zu den Cystein-Histidin-Zinkfingern ist Histidin durch Cystein ersetzt. In veränderter Zusammensetzung sind Multi-Cystein-Zinkfinger auch in Adenoviren (4 Cysteinreste) im Transkriptionsfaktor E1A sowie in Hefe in den Transkriptionsfaktoren GAL3, PPRI und LAC9 (6 Cysteinreste) nachgewiesen worden (Latchman, 1998).

1.4.2. Die Familie der Krox-Gene

Die parallel verwendete Bezeichnung *egr* rührt von der Bezeichnung "early growth response" her. Die Familie der *egr*-Gene wurde identifiziert, da sie zu einer Gruppe von Genen zählt, deren Expression durch Wachstumsfaktoren erzielt werden kann. Analog zur Beobachtung, dass es in Zellen nach einer viralen Infektion zur Expression einer ersten Gruppe von Genen, den sogenannten "immediate early"-Genen, kommt, werden die *egr*-Gene auch als zelluläre "immediate early"-Gene bezeichnet. Es sind vier Mitglieder bekannt, die alle eine hoch konservierte DNA-Bindungsdomäne besitzen, die sich aus drei Zinkfinger-Motiven zusammensetzt: Krox20(*egr1*), Krox24(*egr2*), *egr3* und *egr4* (Abb. 8).

Jede Zinkfinger-Domäne erkennt eine 3 Nukleotide umfassende DNA-Sequenz, wobei eine antiparallele Konfiguration besteht, bei der der erste Zinkfinger an das am meisten stromabwärts gelegene Triplet bindet, während der dritte Zinkfinger an das am meisten stromaufwärts gelegene Triplet bindet. Durch Mutationsanalysen ließ sich zeigen, dass sich N-terminal von der DNA-Bindungsdomäne des Zinkfinger-Proteins eine Repressionsdomäne (R1) befindet, an die NAB (NGFI-A bindendes Protein) 1 und NAB2 mittels der NCD1-Domäne binden.

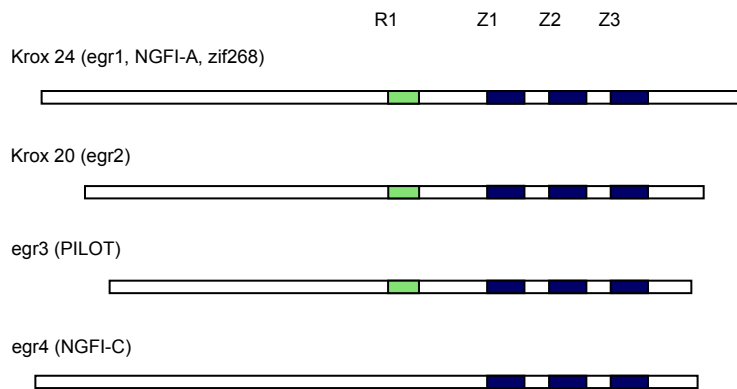


Abb. 8. Schematische Darstellung des strukturellen Aufbaus der Mitgliedern der egr- Familie. Die drei Zinkfinger-Domänen sind jeweils blau dargestellt, die NAB-bindende R1-Domäne ist grün dargestellt. egr4 enthält keine R1-Domäne. Abkürzungen: R1, Repressionsdomäne; Z, Zinkfinger. (O'Donovan et al., 1999).

NAB1 und NAB2 stellen damit einen wesentlichen Regulator in Krox20, Krox24 und egr3 dar, während egr4 keine R1-Domäne besitzt. Von NAB2 ist bekannt, dass es nach Wachstumsfaktorstimulation deutlich später als die zellulären "immediate early"-Gene exprimiert wird und damit als negativer Feedback-Mechanismus eine initial überschießende egr-Expression regulieren kann (Svaren et al., 1996; Swirnoff et al., 1998; O'Donovan et al., 1999). Entgegen der anfänglichen Beobachtung, dass die NAB-Proteine nur als Korepressor wirken, konnte nachgewiesen werden, dass sie auch als Koaktivator agieren können (Sevetson et al., 2000).

1.4.3. Krox20 (egr2)

Krox20 wurde - wie bereits beschrieben - initial als ein durch Wachstumsfaktoren induzierbares "immediate early"-Gen identifiziert (Chavrier et al., 1988) und ist beim Menschen auch als egr2 bekannt (Joseph et al., 1988). Der Name Krox leitet sich vom Gen Krüppel in *Drosophila* ab, welches ein Zinkfinger-Motiv enthält und mit Krox verwandt ist (**K**rüppel **box**). Das murine Krox20 besteht aus drei Exons und zwei Introns und kodiert zwei verschiedene Transkripte. Der Transkriptionsfaktor enthält drei Zinkfinger-Domänen und hat ein Molekulargewicht von 48 kDa. Das humane egr2 dagegen besteht aus zwei Exons, einem Intron und kodiert nur ein Transkript. Es liegt beim Menschen auf Chromosom 10q21-22. Die beiden Proteine sind im Bereich der hoch konservierten DNA-Bindungsdomäne vollständig homolog, während die Homologie der Aminosäuresequenz außerhalb dieser Domäne nur 85% beträgt. Im Vergleich zu Krüppel beträgt die Homologie der Zinkfingerregion nur 37%, im Vergleich zu Krox24 jedoch 92%. Hohe Ähnlichkeit weist auch die Aminosäuresequenz von Krox20 und Krox24 auf, die stromaufwärts der Zinkfingerregion liegt (Joseph et al., 1988; Herdegen und Leah, 1998).

In Mäusen mit Hautwunden wurde ein rascher Anstieg der Genexpression für Krox20 und Krox24 in epithelialen und mesenchymalen Zellen von embryonalen, neonatalen sowie adulten Tieren beobachtet. Wunden in homozygoten Krox20- als auch Krox24-"Knockout"-Mäusen zeigen jedoch keine veränderte Wundheilung, so dass von einem redundanten System ausgegangen werden muss, in dem der Ausfall eines Faktors innerhalb der Regulationskaskade kompensiert werden kann (Grose et al., 2002). Während im peripheren Nervensystem Krox20 in myelinisierenden Schwannzellen und Schwannzell-Vorläufern exprimiert wird, kann es in Oligodendroglia nicht nachgewiesen werden (Topilko et al., 1994). Zur biologischen Funktion von Krox20 im peripheren Nervensystem wird vermutet, dass Krox20 als ein übergeordneter Regulator von späten Myelinproteinen fungiert (Topilko und Meijer, 2001). Daneben kann Krox20 in hypertrophen Haarfollikeln (Gambardella et al., 2000), Chondrozyten und sich differenzierenden Osteoblasten (Levi et al., 1996) nachgewiesen werden. In adulten Mäusen wird Krox20 sowohl in myelinisierenden Schwannzellen, in Knochengewebe und in spezifischen kortikalen Neuronenpopulationen exprimiert (Herdegen et al., 1993).

Im Menschen führen Krox20-Mutationen zu Neuropathien wie der chronischen demyelinisierenden Neuropathie (CHN), dem Déjérine-Sottas-Syndrom (DSS) und der Charcot-Marie-Tooth-Neuropathie vom Typ 1 (CMT1) (Botti et al., 1998; Warner et al., 1998; Bellone et al., 1999; Latour et al., 1999; Timmermann et al., 1999).

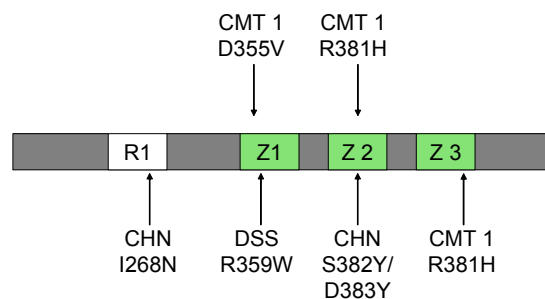


Abb. 9. Humane Mutationen in Krox20 mit der genauen Lokalisation der Mutation, den Modifikationen der Aminosäuren sowie den entsprechenden Phänotypen. Bis den rezessiven Vererbungsmodus der Mutation I268N in der R1-Domäne werden alle anderen Mutationen dominant vererbt. Abkürzungen: R1, Repressionsdomäne; Z, Zinkfinger; CHN, Chronisch hypomyelinisierende Neuropathie; DSS, Déjérine-Sottas-Syndrom; CMT1, Charcot-Marie-Tooth-Erkrankung vom Typ 1 (Topilko und Meijer, 2001).

Genauere Analysen des Vererbungsmodus der hereditären Neuropathien ergaben im folgenden, dass die Mutationen teilweise im Bereich der DNA-Bindungsdomäne liegen (Abb. 9) und die DNA-Bindungs-fähigkeit ebenso wie die transkriptionelle Aktivität eingeschränkt (Warner et al., 1999). Auch bei "Knockout"-Mäusen, die heterozygot für das Krox20-"Null"-Allel sind, wird eine sogenannte "loss of function"-Mutation diskutiert. In der Klinik zeigt sich bei Patienten mit den entsprechenden Mutationen ein dominanter Erbgang, bei dem auch

heterozygote Träger von mutierten Allelen erkranken. Somit wurde postuliert, dass durch eine Mutation in der DNA-Bindungsdomäne eine dominant-negative Mutation entsteht (Warner et al., 1999). Dies konnte durch eine Adenovirus-vermittelte Kotransfektion der Krox20-Mutante S382R/D383Y und des nativen Krox20-Gens in Mäuseschwanzzellen bestätigt werden, in deren Rahmen eine verminderte Expression der Myelogene P_0 , PMP22, MAG und Periaxin gefunden wurde (Nagarajan et al., 2001).

1.4.4. Krox24 (egr1, NGFI-A, zif268)

Krox24 wurde, wie auch Krox20, initial in einem Screening nach "immediate early"-Genen nach Gabe von Wachstumsfaktoren identifiziert (Lemaire et al., 1988) und ist auch als egr1 (Sukhatme et al., 1988), NGFI-A (Milbrandt, 1987), zif268 (Zinkfinger-bindendes Protein Klon 268) (Cole et al., 1989), tis8 (Lim et al., 1987) und Zenk (Mello et al., 1992) bekannt. Zwischen den verschiedenen Spezies weisen die einzelnen Gene innerhalb der Zinkfinger-Domänen eine sehr hohe Sequenzhomologie von bis zu 98% auf, die außerhalb dieser Regionen abnimmt. NGFI-A in Ratten ist aus 508 Aminosäuren aufgebaut mit einem Molekulargewicht von 57 kDa. Humanes egr1 ist aus 533 Aminosäuren aufgebaut und besitzt ein Molekulargewicht von 57 kDa. Es konnte auf dem Chromosom 5q23-31 lokalisiert werden (Milbrandt, 1987; Sukhatme et al., 1988; Herdegen und Leah, 1998). Eine Sonderstellung nimmt Zenk ein, das durch *in situ* Hybridisationsexperimente in Zebrafinken und Kanarienvögeln nachgewiesen werden konnte. Die Zenk-Expression in vorderen Abschnitten des Gehirns war dann am höchsten, wenn die Vögel Gesang der eigenen Spezies hörten, und nahm mit Gesang von weniger verwandten Arten ab (Mello et al., 1992). Neben einer raschen Expression von Krox24 in murinen Wundmodellen (Khachigian et al., 1996; Grose et al., 2002) konnte Krox 24 auch als Induktor zahlreicher Wachstumsfaktoren und Zytokine identifiziert werden, wie TNF α (Kramer et al., 1994), TGF β 1 (Liu et al., 1999) und FGF-2 (Biesiada et al., 1996). Zudem spielt Krox24 eine wesentliche Rolle in der Autoregulation von bFGF, indem Krox24 an den bFGF-Promotor bindet und die Transkription induziert (Wang et al., 1997). Sowohl Krox20 als auch Krox24 wurden als Regulatoren der Protease Nexin-1 (PN-1) identifiziert, deren Promotor eine Bindestelle für diese Transkriptionsfaktoren enthält. Es wird vermutet, dass Krox20 und Krox24 über die Regulation von PN-1 die extrazelluläre proteolytische Aktivität im embryonalen Herzen, dem Knorpelgewebe sowie Teilen des Nervensystems in der Ratte kontrollieren (Erno et al., 1996). Bei Mutationen im Krox24-Gen in Mäusen kommt es zu einer femininen Infertilität durch hormonelle Anomalien. Diese beruht auf einem Mangel an luteinisierendem Hormon β (LH- β). LH- β enthält eine egr-Bindungsstelle im Promotor (O'Donovan et al., 1999).

1.5. DIE BZIP-DOMÄNE

1.5.1. Allgemeine Aufbau der funktionellen Domäne

In Studien am Transkriptionsfaktor AP1 (Aktivator-Protein 1), der stromaufwärts des Interleukin-2-Gens an die DNA-Domäne TRE (TPA response element) bindet, zeigt sich, dass er stets aus zwei Untereinheiten besteht. AP1 setzt sich als Dimer typischerweise aus einem Vertreter der Fos-Familie sowie einem Vertreter der Jun-Familie zusammen. Auch eine Homodimerenbildung von zwei Jun-Proteinen ist möglich, während die Ausbildung eines Fos-Homodimer nicht möglich ist. Die Proteine Fos und Jun weisen in einem Bereich von etwa 80 Aminosäuren Länge eine Homologie auf. In diesem Bereich liegt zunächst eine Leucin- und Arginin-reiche basische Region sowie eine Leucin-reiche Region, in der alle sieben Basenpaare Leucin auftritt. Analog dazu besteht eine vergleichbare Homologie bei Faktoren der CREB-Familie, die an CRE (cAMP responsives Element) binden. Der strukturelle Aufbau der bZIP-Domäne besteht aus dem "Zipper" genannten Bereich, in dem sich die in einer amphipathischen α -Helix angeordneten Leucinreste der beiden Untereinheiten des Dimer umeinander winden und eine "coiled coil"-Konformation eingehen. Dieser "Zipper" stellt die eigentliche Dimerisierungsdomäne dar, während die benachbarten α -helical organisierten basischen Regionen die DNA-Bindungsdomäne repräsentieren. Sie umgreifen die DNA zangenartig auf gegenüberliegenden Seiten der großen Rinne und führen so zu einem Abknicken der DNA (Abb. 10). Die Transaktivierungsdomänen sind für den Beginn der Transkription verantwortlich (Abate und Curran, 1990; Baxevanis und Vinson, 1993; Knippers, 1997).

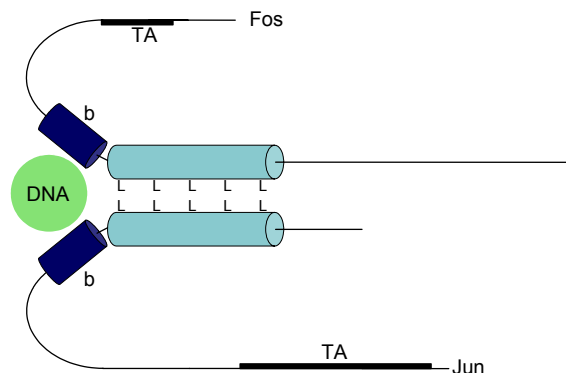


Abb. 10. Struktureller Aufbau des bZIP-Motives im Transkriptionsfaktor AP1 mit den parallel angeordneten Untereinheiten Jun (340 AS) und Fos (380 AS). Die blauen Helices bilden die Dimerisierungsdomäne, den Leucin-Zipper aus. Die DNA-Bindung erfolgt im Bereich der basischen Region. Die wichtigen Transaktivierungs-Domänen sind schwarz dargestellt. Das aminoternale Ende liegt jeweils distal der Transaktivierungs-Domäne, das carboxyterminale Ende distal des Leucin-Zipper-Motivs. Abkürzungen: L, Leucin; b, basisch; TA, Transaktivierungs-Domäne. (Knippers, 1997).

1.6. DIE BHLH-DOMÄNE

1.6.1. Allgemeine Aufbau der funktionellen Domäne

bHLH-Proteine teilt man in Proteine der Klasse A, die in Mammalia ubiquitär vorkommen und auch als E-Proteine bezeichnet werden (E2-2, HEB und die E2a-Genprodukte E12 und E47), und Klasse B, die gewebespezifisch auftreten, ein. Zudem lassen sich die bHLH-Proteine in die Gruppen A-F einteilen (Tab. 3), die sich hinsichtlich ihrer Bindungssequenz unterscheiden (Atchley und Fitch, 1997; Massari und Murre, 2000; Ledent und Vervoort, 2001).

Aktuelle Ergebnisse der phylogenetischen Analyse von humanen bHLH-Proteinen ergaben, dass 43 von 44 bekannten orthologen bHLH-Familien protostome und deuterostome Mitglieder haben und daher gemeinsamen Vorläufern aus präcambrischen Zeitaltern (vor etwa 600 Millionen Jahren), den sogenannten Urbilateria, entstammen müssen. Diese Lebewesen besaßen eine antero-posteriore sowie dorso-ventrale Polarität, rudimentäre Gliedmaßen, einen metameren Aufbau, ein Herz sowie ein komplexes Nervensystem mit Photorezeptoren. Neben zahlreichen Homeobox-Genen und Zinkfingerproteinen besaßen sie mindestens 43 verschiedene bHLH-Gene. Die Tatsache, dass bisher geklonte Gene von Cnidaria Mitglieder der ASC- und MyoD-Familien sind, läßt vermuten, dass diese Familien ihren Ursprung weit vor dem Auftreten der Urbilateria haben und somit phylogenetisch sehr frühe Strukturen darstellen müssen (Ledent et al., 2002).

Gruppe	Bindungssequenz	Familien
A	E-Box (CACCTG oder CAGCTG)	ASC, MyoD, E12/E47, Neurogenin, NeuroD, Hand
B	E-Box (CACGTG oder CATGTTG)	Mad, Max, Myc, USF, SRC, Mnt, SREBP, Trh
C	ACGTG oder GCGTG	bHLH-PAS (bHLH mit zusätzlicher PAS-Domain): Clock, Bmal, Sim, HIF, ARNT
D	keine	fehlende basische Domäne, daher keine DNA-Bindung: Emc
E	N-Box (CACGCG oder CACGAG)	HER-Familie (Hairy and enhancer of split) mit Orange-Domäne und WRPW-Peptid C-terminal
F	-	COE-Familie mit zusätzlicher Bindungsdomäne

Tab. 3. bHLH-Gruppen in Mammalia mit bekannter DNA-Bindesequenz sowie Beispielen für bisher identifizierte Familien verschiedener bHLH-Transkriptionsfaktoren.

Kernmotiv der etwa 60 Aminosäuren großen basischen helix-loop-helix (bHLH) Proteine ist eine positiv geladene DNA-Bindungsdomäne und zwei amphipathische Helices, die durch eine unstrukturierte Schleife („loop“) voneinander getrennt werden (Abb. 11). Während die basische Region DNA-Bindung durch direkte Interaktionen mit dem Phosphatgerüst und den Basen vermittelt, modulieren die Helices durch Bildung von Dimeren die Bindungsaktivität.

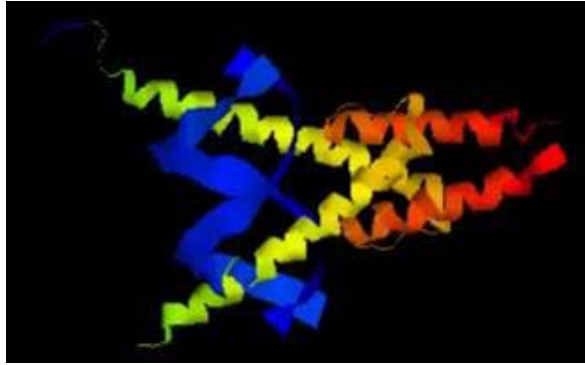


Abb. 11. MyoD Kristallstruktur. Dargestellt ist ein Protein-DNA-Komplex aus einem MyoD-Homodimer und einer E-Box-Sequenz. Die rot und gelb dargestellten α -Helices werden durch eine etwa 8 Aminosäuren lange Schleife verbunden. Die durch Homodimerisation ermöglichte Veränderung der sterischen Konformation erlaubt eine Anlagerung an die Bindungsdomäne der blau dargestellten E-Box-Sequenz der DNA. Mittels eines basischen Abschnittes auf den unteren α -Helices erfolgt die eigentliche Bindung an die DNA-Zielsequenz (Protein Data Bank (www.rcsb.org); PID: 3199100824999).

In der zirkulären Dichroismus-Spektroskopie zeigte sich, dass in Abwesenheit von DNA bHLH-Proteine stabile Dimere ausbilden, die sich in einem konzentrationsabhängigen Equilibrium mit dem Monomer befinden. Bei der Dimerisation kommt es zum Übergang von ungefalteten Monomeren zu α -helicalen Dimeren, in denen die beiden Helices durch eine Schleife aus etwa 8 Aminosäuren getrennt werden. Die basische Region nimmt bei DNA-Bindung ebenfalls eine α -helicale Struktur ein. Kristallstrukturanalysen des MyoD/E47-Komplexes ergaben, dass die basische Region dem N-terminalen Ende der ersten Helix entspricht und dass der dicht gepackte Kern des Komplexes aus der ersten und zweiten Helix besteht. Interessanterweise ist die Bindungsaktivität der bHLH-Domäne zu E-Box-Motiven nur wenig schwächer als die zu heterologen Sequenzen (Sieber und Allemann, 1998).

Durch Dimerenbildung zwischen gewebespezifischen Klasse B- und ubiquitären Klasse A-Proteinen der bHLH-Familie entstehen Heterodimere, die als aktive Transkriptionsfaktoren eine vermehrte Expression von gewebespezifischen Genen bewirken und so zu einer Zelldifferenzierung führen (Yokota, 2001).

Die Id -Proteine (Inhibitoren der Differenzierung) haben eine antagonistische Wirkung. Ihnen fehlt eine DNA-Bindungsdomäne, was bei einer Dimerenbildung zur vorübergehenden Inhibition der ubiquitären bHLH-Proteine führt (Norton, 2000; Jögi et al., 2002). Ein zellspezifischer Klasse B bHLH-Faktor konnte in Schwanzzellen bis zum heutigen Tag nicht nachgewiesen werden. Es gibt jedoch zahlreiche Hinweise, die die Existenz eines Klasse B bHLH-Proteins implizieren. So finden sich die Klasse A bHLH-Proteine REB und E2A in reifen Schwanzzellen, die als A/B Heterodimere die Transkription modulieren. Auch E-Box Erkennungssequenzen in den Promotoren zahlreicher Schwanzzell-Gene deuten auf die Existenz eines zellspezifischen bHLH-Faktors als Bindungspartner in glialen Zell-Linien hin (Stewart et al., 1997). Die Gegenwart von Id-Proteinen in sich entwickelnden und reifen

Schwanzzellen stellt einen weiteren Hinweis auf die Anwesenheit eines Klasse B bHLH-Faktors in Schwanzzellen dar (Stewart et al., 1997; Thatikunta et al., 1999).

1.6.2. Die Familie der achaete-scute Homologen in Mammalia (Mash)

Die Erkenntnis, dass Kernprozesse der zellulären Differenzierung im Verlauf der Evolution von *Drosophila* zu den Säugetieren hoch konserviert vererbt wurden, führte auf der Suche nach einem Regulator der neuronalen Differenzierung in Mammalia zum Nachweis der Mash-Gene. Diese wurden in cDNA von immortalisierten Zelllinien sympathoadrenerger Vorläuferzellen aus Mammalia, der MAH-Linie, mittels RT-PCR und degenerierten Primern für *achaete-scute* Gene amplifiziert. Es wurde zwei Homologe für *achaete-scute* Gene in Mammalia, Mash1 und Mash2 isoliert. Der strukturelle Aufbau der Gene der Mash-Familie besteht aus einer bHLH-Domäne, der ein nukleäres Lokalisationssignal vorgelagert ist (Abb. 12).

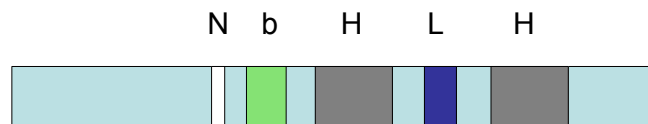


Abb. 12. Struktureller Aufbau der Mash-Gene. Abkürzungen: N, nukleäres Lokalisationssignal; b, basische Region; H, Helix; L, Loop.

```

1  MESS---G---KM-----ESG--A-----GQQ---PQP-PQP--- 20
   |||  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
1  MESHFNWYGVPRQLQKASDACPRESCESSALPEAREGANVHFP-PHPVPREH 49

21  FLPPAACFFATAAAAAAAAAAAAAQSAQQQQQQAPQQQAPQLSPVADGQ 70
   |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
50  FS---CG-APKPVAGAPALNA---SLMDGG---AL---PRL--V--- 79

71  P-SGG--GHKSA--AKQVKRQRSSPELMRCKRRLNFSGFGY-SLPQQQP 114
   |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
80  PTSSGVAG---ACTAR---R-RPPPELLRCSR---SGATEASSSS--- 118
                        NLS
115  AAVARRNERERNRVKLVNLGF-ATLREHVPNGAANKKMSKVETLRSAVEY 163
   ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
119  AAVARRNERERNRVKLVNLGFQA-LRQHVPHGGANKKLSKVETLRSAVEY 167
   basic          helix          helix
164  IRALQQLLDEHDAVSAAFQAGVLSP-TISPNYSDLN---SMAGSPVS-S 208
   ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
168  IRALQRLLAEHDAVRAALSGGLLTPATR-P--S-DVCTQPS-A-SPASAS 211

209  YS---S---DE-G-SYDPLSP-----E---EQELL-----DFTNWF--- 233
   |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
212  LSCTSTSPDRLGCE-PASPRSAYSSEDSSEGETYPMQMFDNWLGGY 260

```

Abb. 13. Proteinsequenz von Mash1 und Mash2. Vergleichend ist hier die Proteinsequenz für Mash1 (obere Reihe, 233 Aminosäuren) und Mash2 (untere Reihe, 260 Aminosäuren) in Ratten dargestellt. Auffallend ist die hohe Sequenzhomologie innerhalb dieses hochkonservierten DNA-Bindungsmotives, der bHLH-Domäne, und die vergleichsweise niedrige Homologie außerhalb dieser Region. Das bHLH-Kernmotiv setzt sich aus einer basischen Region sowie zweier α -Helices zusammen, die durch eine Schleife, den sogenannten "loop" verbunden sind. Abkürzungen: basic, basische Region; helix, α -Helix innerhalb der bHLH-Domäne; NLS, nukleäres Lokalisationssignal; Aminosäuren, siehe Abkürzungen: Aminosäuren.

Innerhalb der bHLH-Domäne beträgt die Sequenzhomologie mehr als 90% (Abb. 13), während außerhalb dieser Region nur noch geringe Homologien bestehen (Johnson et al., 1990). In Ermangelung eines nativen Bindungspartners für Mash1 und Mash2 konnte in Untersuchungen der DNA-Bindungsaffinität und transkriptionellen Regulation *in vitro* gezeigt werden, dass Mash-Proteine Hetero-Oligomere mit E12 bilden. Diese Oligomere binden dann an die E-Box-Sequenz der MCK, einer Zielsequenz von MyoD. In C3H/10T $\frac{1}{2}$ - Fibroblasten aktivieren Mash1 und Mash2 die Transkription der endogenen und exogenen MCK, ohne jedoch myogene Aktivität zu entwickeln (Johnson et al., 1992).

1.6.3. Mash1

Es konnte in zahlreichen *in vitro* und *in vivo* Experimenten gezeigt werden, dass Mash1 maßgeblich an der Determinierung und Differenzierung von Neuronen beteiligt ist (Anderson, 1993; Guillemot et al., 1993; Anderson und Jan, 1997; Kageyama et al., 1997; Ma et al., 1997; Anderson, 1999; Cau et al., 2002; Parras et al., 2002).

Außerhalb eines neuronalen Kontextes wird das humane achaete-scute Homologe (Hash1) selektiv in fetalen neuroendokrinen Zellen der Lunge sowie in Lungentumoren mit neuroendokrinen Eigenschaften exprimiert. In Übereinstimmung mit dieser Beobachtung ließen sich in homozygoten Mash1-defizienten Mäusestämmen keine neuroendokrinen Zellen nachweisen. Die Expression von neuroendokrinen Markern in Lungentumoren sank durch Gabe von Antisense-Oligonukleotiden signifikant (Borges et al., 1997).

1.6.4. Mash2

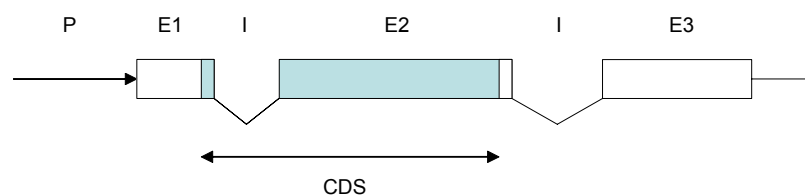


Abb. 14. Genomische Struktur des Mash2-Gens. Die Mash2-kodierende Sequenz setzt sich aus Abschnitten auf den Exonen 1 und 3 zusammen. Abkürzungen: P, Promotor; E, Exon; I, Intron; CDS, kodierende Sequenz (Westerman et al., 2001).

Das Mash2-Gen erstreckt sich über 3 Exone, von denen die Exone 1 und 2 die kodierende Sequenz enthalten (Abb. 14).

Für Mash2 gelang der *in vivo* Nachweis sowohl im peripheren als auch im zentralen Nervensystem bislang nicht. Mash2 spielt jedoch eine wesentliche Rolle in der extraembryonalen Entwicklung. Mash2-Transkripte finden sich in der weiblichen Keimbahn sowie im Embryo während der Präimplantationsphase, während später hohe Expressionsniveaus nur noch im ektoplazentaren Kegel, dem Chorion und Abkömmlingen

der Plazenta auftraten. Expressionsstudien zeigten, dass Mash2 während der gesamten Oogenese nachzuweisen ist, jedoch nicht für die Oogenese, die Blastozystenbildung oder die Determinierung der Trophektodermabkömmlinge notwendig ist. Im späten Zweizellstadium wird Mash2 nahezu ausschließlich embryonal exprimiert. Während der Implantation wird es in diploiden Trophoblasten, am zehnten Tag *post coitum* nur noch in der äußeren Spongiotrophoblastenschicht gebildet. Danach nimmt die Mash2-Expression ab, bis sie gegen Tag 18.5 *post coitum* nicht mehr nachweisbar ist (Rossant et al., 1998). Transkriptionelle Inaktivierung des paternalen murinen Wildtypallels von Mash2 bei maternalem Nullallel führte zum Tod am zehnten Tag *post coitum* durch Plazentaversagen. Spongiotrophoblasten und ihre Vorläuferzellen fehlten in der Plazenta vollständig, Riesenzellen waren vermehrt, während das Chorionektoderm vermindert war, so dass keine suffiziente chorio-allantoidale Zirkulation etabliert werden konnte (Guillemot et al., 1994; Tanaka et al., 1997). Im Verlauf konnte gezeigt werden, dass Mash2 durch genomisches Imprinting vererbt wird. Genomisches Imprinting oder Prägung beschreibt die differenzielle Expression von maternalen und paternalen Allelen. Murines Mash2 wurde in einem Cluster von Genen, die ebenfalls durch Imprinting vererbt werden (*Ins2*, *Igf2* und *H19*) auf der distalen Region des Chromosom 7 lokalisiert. *H19* und *Igf2* werden im Verlauf der placentaren Entwicklung gleichartig exprimiert, was durch gezielte Deletion zweier endoderm-spezifischen Enhancer 3' von *H19* durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen belegt werden konnte, während Mash2 nicht unter der Kontrolle dieser Enhancer steht (Leighton et al., 1995). Es stellte sich zudem heraus, dass alle heterozygoten Nachkommen aus Zwischenkreuzungen mit Chimaeren (Guillemot et al., 1994), denen das paternale Mash2 Wildtyp-Allel vererbt worden war, ebenfalls am zehnten Tag *post coitum* verstarben (Guillemot et al., 1995). Parentale Allele sind gegen Tag 5.5 *post coitum* im ekto-placentaren Kegel nachweisbar. Im weiteren Verlauf sind sie zunehmend weniger transkribiert, während die maternalen Allele zwischen Tag 6.5 und Tag 9 *post coitum* in einigen Zellen des ekto-placentaren Kegels aktiv sind. Nach dem zehnten Tag *post coitum* ist keine paternale Mash2-Expression mehr nachweisbar (Rossant et al., 1998).

Den funktionellen Gegenspieler von Mash2 bei der Differenzierung des Zytotrophoblasten in der murinen Plazenta stellt der verwandte bHLH Faktor Hand1 dar, der die terminale Differenzierung der Riesenzellen fördert (Guillemot et al., 1994; Cross et al., 1995). Nullmutanten für Hand1 zeigen eine reduzierte Zahl von Riesenzellen (Riley et al., 1998).

Das humane *achaete-scute Homologe 2* (*Hash2*) ist auf dem Chromosom 11p15.5 im Cluster mit *Ins*, *Igf2* und *H19* lokalisiert. Wie Mash2 wird es in der frühen Plazenta in extravillösen Trophoblasten exprimiert (Alders et al., 1997). Es lassen sich zwei Transkripte des „single copy“ Gens *Hash2* von 2.6 und 1.5 kb Größe nachweisen, die durch zwei überlappende Promotoren entstehen. Transkript 1 enthält anstelle der bHLH-Domäne eine

zweite potentielle Bindungsregion, das humane achaete-scute assoziierte Protein (HASAP), welches keine Homologie zu einem bekannten Protein besitzt. Transkript 2 enthält lediglich die Hash2 kodierende Sequenz mit der bHLH-Bindungsdomäne. Interessanterweise lässt sich Hash2 mRNA mittels RT-PCR spezifisch in geringer Intensität in allen getesteten Geweben (Herz, Leber, Pankreas, Nebennieren, Niere, Lunge, Muskelgewebe, mit extravillösen Trophoblasten angereichertes Plazentagewebe) nachweisen, wobei die Expression in Trophoblastengewebe signifikant höher als in den anderen getesteten Geweben ist. Um die Proteintranslokation der Proteine HASAP und Hash2 zu analysieren, wurden beide Proteine in einem transienten *in vitro* Transfektionsassay N-terminal mit einem EGFP-Protein markiert. Hash2 wird in den Nukleus transportiert und zeigt dort eine lokale Anreicherung, während HASAP in die Nukleoli transportiert wird. Als putative Erkennungssequenz für den Transport von Hash2 in den Nukleus („nuclear localization signal“, NLS) dient die Sequenz RRPASPELLRCSR, während HASAP ein putatives nukleoläres Lokalisationssignal (NoLS) enthält. Mittels allelspezifischer RT-PCR konnte für das Hash2-Gen nachgewiesen werden, dass im Gegensatz zum murinen Mash2 genomisches Imprinting nicht vorkommt (Westerman et al., 2001).

1.7. TRANSKRIPTIONSFAKTOREN IN DER SCHWANNZELLENTWICKLUNG

Während der Myelinisierung eines peripheren Nerven kommt es zur phasenabhängigen Expression der verschiedenen Transkriptionsfaktoren (Abb. 15). Das gliale POU-Domänen-Protein Oct-6/SCIP wird während der Entwicklung des peripheren Nerven stadienabhängig exprimiert. Insbesondere in promyelinisierenden Vorläuferzellen ist die Oct-6/SCIP-Expression besonders ausgeprägt. Mit Voranschreiten der Myelinisierung kommt es zur schrittweisen Abnahme. In reifen Schwannzellen ist Oct-6/SCIP, ebenso wie in nicht-myelinisierenden Schwannzellen, nicht mehr nachweisbar.

Das Zinkfingergen Krox20 wird erst relativ spät in der Schwannzell-Entwicklung exprimiert. Es ist zunächst nur auf niedrigem Niveau beginnend im Stadium der prämyelinisierenden Schwannzelle nachweisbar, dann steigt die Expression bis hin zur reifen myelinisierenden Schwannzelle an. Dazu wird jedoch axonaler Kontakt benötigt (Murphy et al., 1996; Zorick et al., 1996; Küry et al., 2001).

Krox24 wird im peripheren Nerv in embryonalen Vorläuferzellen, in unreifen Schwannzellen postnatal sowie in nicht-myelinisierenden Schwannzellen exprimiert. In Läsionsmodellen wird dann Krox24 im Rahmen einer vorübergehenden Dedifferenzierung der Schwannzellen wieder verstärkt exprimiert, um im weiteren Verlauf analog zum Expressionsverhalten in der normalen Entwicklung erneut abzunehmen (Topilko et al., 1997).

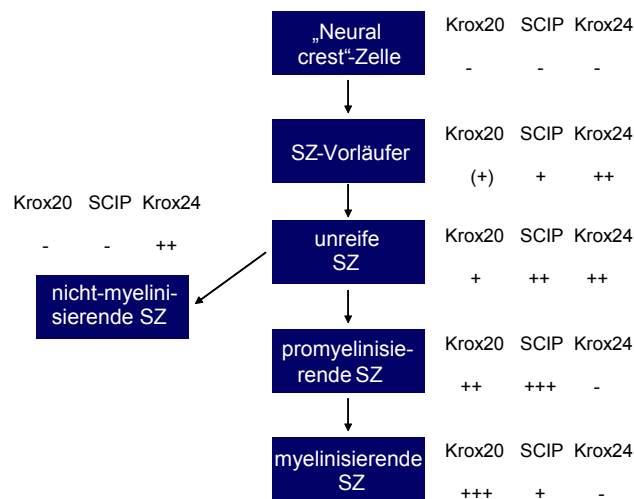


Abb. 15. Expressionsprofile der Transkriptionsfaktor-Gene Krox20, Krox24 und Oct-6/SCIP. Diese Gene werden bei der Entwicklung des peripheren Nerven differentiell exprimiert. Diese Abbildung stellt nur eine kleine Auswahl der bekannten Faktoren dar, die an diesem Prozess beteiligt sind. Abkürzungen: SZ, Schwannzelle (Küry et al., 2001).

Der bHLH-Transkriptionsfaktor Mash1 wird im peripheren Nerven zwar exprimiert, eine differentielle, postläsionale Regulation kann jedoch nicht beobachtet werden. Daten für die Expression im Rahmen der Schwannzell-Entwicklung existieren nicht.

Mash2 konnte erstmals im peripheren Nervensystem im Rahmen eines PNS-Läsionsmodells im N. ischiadicus von Ratten als postläsional reguliert nachgewiesen werden. Nach einer Läsion wird es - ähnlich wie Krox20 - zunächst vermindert exprimiert, um dann mit voranschreitender Myelinisierung einen Anstieg der Expression zu erfahren (Küry et al., 2001). Daten für eine Expression im Rahmen der Schwannzell-Entwicklung existieren noch nicht.

Neben den bereits beschriebenen glialen Transkriptionsfaktoren nimmt Paired Homeobox 3-Gen (Pax3) eine für den Übergang von der Neuralleisten-Zelle zum Schwannzell-Vorläufer wesentliche Rolle ein. Im weiteren Verlauf der Myelinisierung kann es in nicht-myelinisierenden Schwannzellen nachgewiesen werden. Die Pax3-defizienten Mausmutanten "splotch" und "splotch delayed" besitzen eine stark reduzierte Anzahl an Schwannzellen oder die Schwannzellen fehlen vollständig. Nach Nervenläsionen wird Pax3 mit einem Maximum am siebten Tag nach Beifügung der Läsion verstärkt exprimiert und nimmt dann im weiteren Verlauf ab (Kioussi et al., 1995). Der mit dem Klasse III POU-Domänen Transkriptionsfaktor Oct-6/SCIP verwandte Klasse II POU-Domänen Transkriptionsfaktor Oct-1 wird ebenfalls im sich entwickelnden Nerv exprimiert (Blanchard et al., 1996). Der Klasse III POU-Domänen Transkriptionsfaktor Brn-2 spielt eine wesentliche Rolle in der frühen Myelinisierung und erreicht - ähnlich wie Oct-6/SCIP - ein Expressionsmaximum in promyelinisierenden Schwannzellen, während er in

myelinisierenden Zellen kaum nachzuweisen ist (Jaegle et al., 2003). Das Expressionsverhalten während der De- und Regeneration verläuft parallel zur dem von Oct-6/SCIP (Sim et al., 2002).

Das HMG-Protein Sox10 tritt in Neuralleisten-Zellen, in differenzierenden und in reifen Schwannzellen auf. Es gilt als wesentlicher Faktor für die Ausbildung einer glialen Zellidentität in der Neuralleiste in der frühen Entwicklung und für die Beibehaltung dieses Differenzierungszustandes (Britsch et al., 2001). Das Regulationsverhalten während der Schwannzellentwicklung ist mit dem von Pax3 und Oct-6/SCIP vergleichbar. In Läsionsmodellen kommt es analog zu einer Reaktivierung der Sox10-Expression im distalen Nervenstumpf. Mutationen von Sox10 führen sowohl zu pathologischen Veränderungen im PNS als auch im ZNS mit einem leukodystrophen Phänotyp ähnlich der Pelizaeus-Merzbacher Erkrankung sowie einer CMT1-artigen peripheren Neuropathie (Inoue et al., 1999). Interessanterweise besteht auch eine postläsionale Regulation der Genexpression von einigen Vertretern aus der Gruppe der Hox-Gene, den Faktoren HoxB5, HoxD3 und HoxA6, im peripheren Nerv von Ratten. Auch wenn noch keine Genexpressionsprofile für die Entwicklung vorliegen, so fällt deren Expression postläsional initial ab und steigt gegen Ende der Degenerationsphase wieder kurz an, um dann erneut mit Voranschreiten der Regeneration wieder abzufallen (Küry et al., 2001). Auch die bZIP-Proteine c-jun, jun-B, jun-D und c-Fos werden in der Nervenentwicklung differentiell exprimiert. c-jun tritt nur in nicht-myelinisierenden Schwannzellen auf und wird nach einer Läsion bis zum Beginn der Remyelinisierung verstärkt exprimiert (Shy et al., 1996). Die Faktoren jun-B und jun-D werden hingegen durch eine Läsion nicht in ihrem Expressionsniveau beeinflusst (Stewart, 1995).

1.8. FRAGESTELLUNG

Ausgangspunkt für die vorliegende Arbeit war die Beobachtung, dass es in der Literatur starke Hinweise auf die Existenz eines bislang unbekanntem Klasse B bHLH-Transkriptionsfaktors in Schwanzzellen gibt. Zudem konnte die Bildung von Heterodimeren aus Klasse B Mash-Proteinen und Klasse A E12-Proteinen mit nachfolgender transkriptioneller Aktivierung *in vitro* nachgewiesen werden. Zusammen mit der Tatsache, dass im Rahmen eines PNS-Läsionsmodells Mash2 als ein postläsional reguliertes Gen im Ischiasnerven identifiziert werden konnte, impliziert dies, dass Mash2 möglicherweise eine spezifische Rolle in der transkriptionellen Regulationskaskade in Rattenschwanzzellen spielt.

- Welche Veränderungen können in der Genexpression von Rattenschwanzzellen, die Mash2 sowie eine funktionell so veränderte Variante von Mash2 überexprimieren, dass keine DNA-Bindungsfähigkeit zu erwarten ist, beobachtet werden?
- Welche potentielle Rolle spielt Mash2 in der Regulationskaskade der Myelinisierung von Schwanzzellen?
- Wie verhält sich die Genexpression von Krox20, Krox24, Oct6/SCIP und Mash1 im Vergleich zu Mash2 in kultivierten Rattenschwanzzellen unter verschiedenen Kulturbedingungen?
- Lassen sich aus dem Regulationsverhalten unter den einzelnen Bedingungen Rückschlüsse auf eventuelle gegenseitige Interaktionen ziehen?
- Bestehen Parallelen zwischen den Ergebnissen der Zellkultur und bisherigen Erkenntnissen, soweit diese für die jeweiligen Transkriptionsfaktoren bekannt sind?

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. MATERIAL

2.1.1. Puffer und Lösungen

Dulbecco Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS)	(Fa. PAA Laboratories)
L-Glutamin 200 mM	(Fa. Gibco BRL)
poly-D-Lysin 10 mg/ml	(Fa. Gibco BRL)
Trypsin (0,05% Trypsin + 0,02% EDTA in PBS)	(Fa. Roche)
Suspensionspuffer	50 mmol/l Tris-HCl pH 8.0 10 mmol/l EDTA 100 µg/ml RNase A
Lysispuffer	200 mmol/l NaOH 1% SDS
Neutralisationspuffer	3.0 mol/l Kaliumacetat pH 5.5
GTC-Puffer	4 mol/l Guanidiniumthiocyanat 25 mmol/l Natriumcitrat pH 7.0 0.5% (w/v) Laurosylsarcosyl 100 mmol/l 2-Mercaptoethanol (1 Monat haltbar bei Raumtemperatur)
Natriumacetat	2mol/l pH 4.0
H ₂ O _{DEPC}	ddH ₂ O mit 0,1% Diethylpyrocarbonat (Fa. Sigma) versetzen, nach 12 h wird die Lösung autoklaviert
Hybridisierungs-Waschpuffer	0.1% SDS 0.1% SSC
Church-Puffer	7% SDS 0.5 mol/l NaHPO ₄ /NaH ₂ PO ₄
SSC (20 x)	3.0 mol/l NaCl 0.3 mol/l Na-Citrat x 2 H ₂ O pH 7.0 mit HCl einstellen
Paraformaldehyd (PFA)	4% (Fa. Sigma) in PBS
Zellkultur-Lysis-Puffer(1x)	25 mmol/l Tris-Phosphat pH 7.8 2 mmol/l DTT 2 mmol/l 1,2-Diaminocyclohexan-N,N,N',N'-tetraacetat 10% Glycerin 1% Triton X-100
Luciferase Assay Reagenz	20 mmol/l Tricin (pH 7.8) 1.07 mmol/l (MgCO ₃) ₄ Mg(OH) ₂ ·5H ₂ O

	2.67 mmol/l MgSO ₄
	0.1 mmol/l EDTA
	33.3 mmol/l DTT
	270 µmol/l Koenzym A
	470 µmol/l Luciferin
	539 µmol/l ATP
dNTPs	10 mmol/l (zu gleichen Teilen dATP, dCTP, dTTP, dGTP) (Fa. Roche)
TAE-Puffer (50x Stocklösung)	121 g Tris Base (Endkonzentration 40 mM) 28.55 ml Eisessig 50 ml 0.5M EDTA pH 8.0 (Endkonzentration 1 mM) (mit ddH ₂ O auf 500 ml auffüllen)
DNA-Farbmarker:	0,1% Bromphenol-Blau 0,1% Xylencyanol FF 50% Glycerol (in 1x TAE)

2.1.2. Organische Lösungsmittel und Substanzen

Ethanol abs.	(Fa. Merck)
2-Propanol	(Fa. Merck)
wassergesättigtes Phenol (pH 4.5) (für RNA)	(Fa. Roth)
Phenol (pH 7-8) in TE (für DNA)	(Fa. Roth)
2-Mercaptoethanol	(Fa. Sigma)
Chloroform	(Fa. ICN)
Isoamylalkohol	(Fa. ICN)
Cl	Chloroform/Isoamylalkohol (24:1)
PIC	Phenol/Isoamylalkohol/Chloroform (25:1:24)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	(Fa. Sigma)
Mineralöl (für Molekularbiologie)	(Fa. Sigma)

2.1.3. Medien

Luria-Broth-Medium (LB):	1.0% (w/v) Bacto Trypton 0.5% (w/v) Hefeextrakt 0.5% (w/v) NaCl
LB Agar	1.5% (w/v) Bactoagar in LB-Medium

SOC-Medium	2% Trypton 0.5% Hefeextrakt 0.6% NaCl 2.5 mmol/l KCl 10 mmol/l MgCl ₂ 20 mmol/l Glucose
Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM)	(Fa. <i>Gibco BRL</i>)
Dulbecco Modified Medium, HEPES- gepuffert (HEPES-DMEM)	(Fa. <i>Gibco BRL</i>)
Fetales Kälber Serum (FKS)	(Fa. <i>PAA Laboratories</i>)
RSZ-Kulturmedium	DMEM (Fa. <i>Gibco BRL</i>) 10% (v/v) FKS 200 mol/l L-Glutamin 50 IU/ml Penicillin/Streptomycin 2 µmol/l Forskolin

2.1.4. Antibiotika

Ampicillin	50 mg/ml Stammlösung Endkonzentration LB _{Amp} -Platten bzw. Medium: 0.5 mg/ml (Fa. <i>Roche</i>)
Kanamycin	Aktivität: 782 µg/mg (nach Angaben des Herstellers) 50mg/ml Stammlösung Endkonzentration LB _{Kan} -Platten bzw. Medium: 0.5 mg/ml (Fa. <i>Sigma</i>)
Penicillin / Streptomycin	5000 IU/ml (Fa. <i>Gibco BRL</i>)
Hygromycin B	1.13 g/ml Stammlösung, 359 U/mg (Fa. <i>Calbiochem</i>) Endkonzentration Medium: 50 µg/ml

2.1.5. Enzyme

Restriktionsendonukleasen	(Fa. <i>Pharmacia Biotech</i> , Fa. <i>Roche</i> , Fa. <i>MBI Fermentas</i>)
<i>Polymerasen:</i>	
AmpliTaq-Polymerase (5 U/µl)	(Fa. <i>Applied Biosystems</i>)
AmpliTaqGold-Polymerase (5 U/µl)	(Fa. <i>Applied Biosystems</i>)
Superscript II rT (200 U/µl)	(M-MLV Reverse Transcriptase) (Fa. <i>Gibco BRL</i>)
Pfu-Polymerase (2.5 U/µl)	(Fa. <i>Stratagene</i>)

Klenow-Enzym (2 U/μl) (Fa. Roche)

sonstige Enzyme:

T4 DNA-Ligase (für Rapid DNA Ligation Kit)	(5 U/μl)	(Fa. Roche)
T4 DNA-Ligase (für pCR-blunt-Kit)	(4 U/μl)	(Fa. Invitrogen)
Alkalische Phosphatase (aus Shrimps)	(1 U/μl)	(Fa. Roche)
DNase I	(40 U/μl)	(Fa. Roche)
RNase A	(50 mg/ml)	(Fa. Sigma)
RNasin	(40 U/μl)	(Fa. Promega)

2.1.6. Transfektionsreagenzien

DOSPER	(Fa. Roche)
FUGENE6	(Fa. Roche)

2.1.7. DNA-Molekulargewichtsstandard

1 kb-Leiter (Fa. Gibco BRL): 12216/ 11198/ 10180/ 9162/ 8144/ 7126/ 6108/ 5090/
4072/ 3054/ 2036/ 1636/ 1018/ 516/ 507/ 396/ 344/ 298/
220/ 201/ 154/ 134/ 75 bp
verdünnt in DNA-Ladepuffer

100 bp-Leiter (Fa. Peqlab): 1000/ 900/ 800/ 700/ 600/ 500/ 400/ 300/ 200/ 100/ 80
bp

2.1.8. Synthetische Oligonukleotide

Alle Primer wurden von der Firma *MWG Biotech* bezogen.

<i>Bezeichnung:</i>	<i>Sequenz (cDNA):</i>
Sh 2.4	5'-AAC AGCTAC AGA TGT GTC AG-3'
Sh 2.5	5'-GGG ATG TAG AGG TGC AGG AC-3'
Sh 2.6	5'-CTA GAC AGC ATG GGT AAG GC-3'
Sh 2.7	5'-TGG AAT CGC ACT TTA ACT GG-3'
Sh 2.8	5'-AGC TTG CAT TCA GCG CCG-3'
Sh 2.9	5'-TGC AGC GGC TGC TAG CA-3'
Sh 2.10	5'-GTC TCT GTC CTG CAC CT-3'
Sh 2.2+0	5'-TCG AGC GGC CGC ATG GAA TCG CAC TTT AAC-3'
Sh 2.3+R	5'-ACA TCC AGA TCA TTG GCT AGA CAG CAT G-3'
Sh 2.4+N	5'-TCG AGC GGC CGC CAC CAT GTC TGG AGT CGC TGG A-3'
Sh 2.5+B	5'-ACA TCC AGA TCA TTG GCT AGG ATG TAG AGG TGC A-3'
T7-20mer	5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3'
T7-22mer	5'-GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C-3'
M13rev	5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3'
BGHrev	5'-TAG AAG GCA CAG TCG AGG-3'
Hygro-up	5'-GAC AGC GTC TCC GAC CTG AT-3'
Hygro-down	5'-CAC TAT CGG CGA GTA CTT-3'
splash2rev	5'-GCT CGG ATC CAC TAG TCC AGT G-3'
Sh 1.1	5'-GCT CAA CTT CAG TGG CTT CG-3'
Sh 1.2	5'-CAT AGA GTT CAA GTC GTT GG-3'
Sh 2.1	5'-AAT GAG CGT GAG CGC AAC CG-3'
Sh 2.2	5'-TGC TGT CCT CCG ACG AGT AG-3'
Tst 1	5'-AAG CAG TTC AAG CAA CGA CG-3'
Tst 2	5'-TCA TGC GCT TCT CCT TCT GC-3'
Krox 20.3	5'-CAC TCA CGC CAC TCT CTA CC-3'
Krox 20.4	5'-CTG CCG AAG GTG GAT CTT GG-3'
Krox 24.3	5'-GAC TGT AAC TCT CAC ATG TG-3'
Krox 24.4	5'-CGC CTA CTC AGT AGG TAA CC-3'
28 Sas1	5'-CAG GTC GTC TAC GAA TGG-3'
28 Ss1	5'-GTA CGA ATA CAG ACC GTG-3'
GAPDH se	5'-GGT ATG GAT GAG GAG CTG GA-3'
GAPDH as	5'-CTT CCA CAG CCC TCG ACT AA-3'

Primer für quantitative PCR:

Mash2-f	5'-AAC TTT CCA ACC TGG CCA AGG T-3'
Mash2-r	5'-AGC CAG GCA TCT TGC CC-3'
Krox24-f	5'-CCC TGT TGA GTC CTG CGA TC-3'
Krox24-r	5'-GGC GTG TAA GCT CAT CCG AG-3'
GAPDH-f	5'-GAA CGG GAA GCT CAC TGG C-3'
GAPDH-r	5'-GCA TGT CAG ATC CAC AAC GG-3'

2.1.9. *E. coli*- Bakterienstämme

DH5 α	<i>endA1 hsdR17 supE44 recA1 gyrA96 thi-1 relA1 βlac</i> U196 <i>lacZ</i> Δ M15 (zur Transformation und Vermehrung von Plasmid-DNA)
One Shot TOP10	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 deoR</i> <i>recA1 araD139</i> Δ (<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK rpsL endA1 nupG</i> (Fa. <i>Invitrogen</i>)

2.1.10. Säulen

Microspin S-200	(Fa. <i>Pharmacia</i>)
Centrisep Spin Säulen	(Fa. <i>Princeton Separations</i>)
Qiaquick-Säulen	(Fa. <i>Qiagen</i>)

2.1.11. Plastikwaren für Zellkultur und Molekularbiologie

Alle Plastikwaren für die Zellkultur wurden von den Firmen *Falcon* und *Greiner* bezogen.

2.1.12. Geräte

Alle RT-PCR, DNA-PCR, semiquantitativen PCR und unidirektionalen PCR zur Sequenzierung wurden mit TRIO-Block Thermocyclern (Fa. *Biometra*), alle quantitativen PCR mit einem GeneAmp 5700 Sequence Detection System (Fa. *Applied Biosystems*) durchgeführt.

2.1.13. Vektoren

pCR-Blunt	(Fa. <i>Invitrogen</i>)
pcDNA 3.1/Hygro(-)	(Fa. <i>Invitrogen</i>)
pGL3-Control	(Fa. <i>Promega</i>)
pMash2/CDS	Eigenkonstrukt (Abb. 17)
pMash2/ Δ	Eigenkonstrukt (Abb. 18)

pCAT- Δ 3-PMP

(Dr. Frank Bosse, Neurochem. Labor,
Universität Düsseldorf)

pSV40-lacZ

(Dr. Patrick Küry, Neurochem. Labor,
Universität Düsseldorf)

2.2. MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

2.2.1. Isolation von Nukleinsäuren

2.2.1.1. Minipräparation von Plasmid-DNA mittels alkalischer Lyse

2 ml einer Bakterienkultur, in die nach Transformation einzelne Bakterienkolonien inokuliert wurden und über Nacht inkubiert wurden, wurden 2 Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert und das resultierende Bakterienpellet in 200 µl gekühltem Suspensionspuffer aufgelöst. Nach Zugabe von 200 µl alkalischem Lysisbuffer, mehrfachem Invertieren des Reaktionsgefäßes und Inkubation für 5 Minuten wurden 300 µl eiskalter Neutralisationspuffer zugegeben und der Ansatz nochmals für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Dabei renaturierte die Plasmid-DNA vollständig, während die chromosomale Bakterien-DNA ungeordnet vernetzt und zusammen mit Zelltrümmern und Proteinen durch Zentrifugation über 10 Minuten bei 13.000 rpm entfernt wurde. Der plasmidhaltige wässrige Überstand wurde mit einem Volumenteil Phenol/Chloroform extrahiert und mit zwei Volumenteilen 96%igem Ethanol 30 Minuten bei -20°C gefällt. Nach Zentrifugation für 10 Minuten bei 13.000 rpm wurde das Nukleinsäurepellet mit 70%igem Ethanol gewaschen, an der Luft oder unter Vakuum getrocknet und in 20-50 µl TE-Puffer oder H₂O gelöst. Kontaminierende Ribonukleinsäuren wurden durch RNase A - Behandlung (50 µg/ml, 20 Minuten bei 37°C) und erneuter Phenol/Chloroformextraktion entfernt.

2.2.1.2. Maxipräparation von Plasmid-DNA aus E.coli

Die Maxipräparation mit dem „Qiagen Maxi Plasmid Präparationskit“ folgt demselben Prinzip wie die Minipräparation (alkalische Lyse). Es wurde den Handbüchern (Fa. *Qiagen*) entsprechend vorgegangen. Zur Präparation wurden 100 ml einer Übernachtskultur auf eine Qiatip 500-Säule gegeben. Wesentlicher Unterschied zur Minipräparation ist die Bindung kleiner DNA-Stücke an eine Silikagel-Matrix in der Säule. Auf diese Säule wurde das sorgfältig zentrifugierte und filtrierte Bakterienlysat, welches man nach Zugabe des Neutralisationspuffers erhält, gegeben. Genomische DNA verbleibt mit den Proteinen im Zentrifugat nach Zugabe des Neutralisationspuffers. RNA wird durch die Zugabe des RNase-enthaltenden Suspensionspuffers abgebaut. Die an Säulen gebundene Plasmid-DNA wird nach sorgfältigem Waschen mit Waschpuffer mit TE oder ddH₂O eluiert. Hierfür wurden Volumina von 100-400 µl verwendet.

2.2.1.3. RNA-Präparation nach Chomczynski und Sacchi (1987)

Nach Auflösung des Zellmaterials im Homogenisierungspuffer mit Guanidiniumthiocyanat bewirkt die folgende Behandlung mit Phenol/Chloroform eine Denaturierung der Proteine und eine Konzentration in der Interphase. Die DNA ist unter diesen Bedingungen so lipophil, dass

sie in der Phenolphase verbleibt. Die in der wäßrigen Phase angereicherte RNA muss nur noch durch zweimaliges Präzipitieren aufgereinigt werden.

Durchführung:

Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen. Nach Zugabe von 0.5 ml GTC-Puffer wurden die lysierten Zellen mit einem Zellschaber (Fa. *Falcon*) von der Kulturschale abgelöst. Das Zellysate wurde nun durch mehrmaliges Aufziehen durch eine mittlere Kanüle (0.6 mm Durchmesser), dann durch eine feinere Kanüle mit 0.4 mm Durchmesser homogenisiert.

Nach Zugabe von 500 µl wassergesättigtem Phenol, 100 µl Chloroform/Isoamylalkohol sowie 50 µl Natriumacetat 2 mol/l pH 4.0 wurde die Suspension für 30 Sekunden gemischt und 15 Minuten lang auf Eis inkubiert. Nach der Zentrifugation (10.000 rpm, 20 Minuten, 4°C) wurde die obere wäßrige Phase in ein neues Schraubdeckel-Reaktionsgefäß überführt und mit 500 µl 2-Propanol gemischt. Nach Präzipitation (1 Stunde bei -20°C) und Zentrifugation (10.000 rpm, 20 min, 4°C) wurde das erhaltene Pellet in 200 µl GTC-Puffer bei 65°C im Schüttelwasserbad gelöst und erneut mit 2-Propanol versetzt. Nach Präzipitation (1 Stunde bei 4°C) und Zentrifugation (10.000 rpm, 20 min, 4°C) wurde der Überstand abgenommen, das Pellet mit 200 µl 75% Ethanol gewaschen und in 50 µl H₂O_{DEPC} gelöst.

2.2.1.4. Qiagen RNA-Präparation

Die Präparation von RNA für die quantitativen RT-PCR-Experimente erfolgte mit dem „Qiagen RNeasy Kits“ (Fa. *Qiagen*) nach den Anleitungen des Herstellers.

2.2.1.5. Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren kann gelelektrophoretisch durch einen Vergleich mit Markerbanden bekannter Konzentration abgeschätzt oder photometrisch nach dem Lambert-Beerschen Gesetz bestimmt werden:

$$C = E \times \epsilon^{-1} \times d^{-1}$$

C	=	Konzentration der Lösung
E	=	Extinktion
ε	=	spezifischer Extinktionskoeffizient
d	=	Schichtdicke der Küvette

Bei der Schichtdicke von d = 1 cm und der Wellenlänge λ = 260 nm gelten folgende Näherungswerte (Tab. 4):

Nukleinsäure	1 OD entspricht
doppelsträngige DNA	50 µg/ml
RNA	40 µg/ml
Oligonukleotide	33 µg/ml

Tab. 4. Näherungswerte des Extinktionskoeffizienten für einzelne Nukleinsäuren bei einer Schichtdicke der Küvette von 1 cm und einer Wellenlänge von 260 nm.

Für die Berechnung der Nukleinsäuren-Konzentration gilt somit:

$$\text{Extinktion} \times \text{Näherungswert} \times \text{Verdünnung} = \text{Konzentration in } \mu\text{g/ml}$$

Die Qualität einer DNA-Präparation lässt sich durch das Verhältnis der Absorptionen bei 260 nm und 280 nm kontrollieren. Reine Nukleinsäure-Präparationen ergeben einen Wert von 1.8 bis 2.0, während Proteine (Absorption bei 280 nm) den Quotienten erniedrigen. Phenolverunreinigungen sind durch ein zweites Absorptionsmaximum bei 270 nm zu erkennen.

2.2.1.6. Phenol-Chloroform-Extraktion

Die Fällung der DNA erfolgte mittels 2-2.5 Volumen Ethanol und 1:10 Volumen Ammoniumacetat-Lösung pH 4.0 oder mittels 2-Propanol. Nach der Fällung und Zentrifugation, die bei Raumtemperatur durchgeführt wurden, um störende Salze im Präzipitat zu vermeiden, wurde zweimal mit 70% Ethanol gewaschen und an der Luft oder im Vakuum getrocknet. Das Nukleinsäurepellet wurde dann in ddH₂O oder TE aufgenommen (Sambrook et al., 1989).

2.2.2. Bakterienkulturen

2.2.2.1. Transformation

Zur Transformation wurden kompetente DH5 α -*E. coli*-Zellen sowie TOP 10-One Shot kompetente *E. coli*-Zellen verwendet. Beide Stämme wurden mit der Hitzeschock-Methode behandelt. Dabei wurden zunächst 50-100 µl Aliquots auf Eis aufgetaut und für 30 min auf Eis mit Plasmid-DNA inkubiert. Es wurden 2-15 µl Ligationsansatz sowie bei den TOP10-One Shot-Zellen zusätzlich 2 µl β -Mercaptoethanol (0.5 mmol/l) zugesetzt. Dann wurden die Zellen für exakt 45 sec in ein 42°C warmes Wasserbad gegeben. Danach wurden sie für 2 min auf Eis gelagert. Nach Zugabe 250-750 µl SOC-Medium (37°C), wurden sie im Wärmeschüttler (225 rpm, 37°C, 1 Stunde) inkubiert und jeweils 20-200 µl auf LB-Platten mit dem jeweiligen Antibiotikum ausplattiert und im Wärmeschrank (37°C) über Nacht gelagert.

Am nächsten Tag wurden einzelne Kolonien mit sterilen Zahnstochern entnommen und damit Kulturen angeimpft.

Dann wurden für die von Präparation von Plasmiden 5 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum versetzt, mit einer einzelnen Bakterienkolonie angeimpft und bei einer Umdrehungsgeschwindigkeit von 170 rpm bei 37°C über Nacht geschüttelt. Für eine Maxi-Präparation wurde zunächst eine Starterkultur hergestellt. Dafür wurden 5 ml antibiotikahaltiges LB-Medium mit einer Kolonie geimpft und für 4-5 Stunden bei 37°C und 225 rpm inkubiert. Dann wurden 2 ml dieser Starterkultur in 100-250 ml LB-Medium mit Antibiotika gegeben und über Nacht bei Umdrehungsgeschwindigkeit von 170 rpm bei 37°C geschüttelt.

2.2.2.2. Sonstige Techniken

Sonstige Techniken wie Zubereiten von Nährböden und -medien sowie Anlegen von Glycerinstocks wurden nach Sambrook et al. (1989) durchgeführt.

2.2.3. Elektrophoretische Auftrennung von DNA

2.2.3.1. Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten mit einer Größe von 100 bp bis 20 kb werden 0,3 - 2%ige horizontale Agarosegele in 1x TAE-Puffer unter Zusatz von Ethidiumbromid (0,1 - 0,2 µg/ml Endkonzentration) verwendet. Nach dem Lösen der Agarose durch Aufkochen wird sie handwarm in einen Gelträger mit einem entsprechenden Kamm gegossen. Das ausgehärtete Gel wird in die mit 1x TAE-Puffer mit Ethidiumbromid (0,1 - 0,2 µg/ml Endkonzentration) gefüllte Gelkammer gelegt und der Kamm entfernt. Die Proben werden mit 0,1 Volumen DNA-Blaumarker versetzt und in die Taschen pipettiert. Die Elektrophorese erfolgt bei 80 - 150 Volt (~ 5V/cm Elektrodenabstand). Die aufgetrennten DNA-Fragmente werden unter UV-Licht ($\lambda = 312 \text{ nm}$) detektiert und mittels CSC-Kamera (Fa. *Herolab*) dokumentiert.

2.2.4. Klonierung

2.2.4.1. Ligation, Dephosphorylieren

Die Ligation von DNA-Fragmenten erfolgte mittels des „Rapid DNA Ligation Kits“ (Fa. *Roche*) nach Anleitung des Herstellers.

Die Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten vor Ligation erfolgte mittels Alkalischer Phosphatase aus Krabben (SAP) (Fa. *Roche*) nach Sambrook et al. (1989).

2.2.4.2. Ligation von Fragmenten mit stumpfen DNA-Enden

Die Klonierung von Fragmenten mit stumpfen DNA-Enden, die mit der lesegenauen Pfu-Polymerase generiert wurden, erfolgte mit dem „Zero Blunt PCR Klonierungs Kit“ (Fa. *Invitrogen*).

Der hierfür verwendete Vektor pCR-blunt ist bereits linearisiert und dephosphoryliert. Er enthält das Gen für ein lacZ α -ccdB Fusionsprotein, welches bei Religation des Plasmids ohne Insert in Bakterienzellen exprimiert wird und so zu einer positiven Selektion von rekombinanten Plasmiden führt. Die Ligation der Fragmente in den Vektor mit stumpfen DNA-Enden erfolgte laut Handbuch. Zur Transformation wurden die speziell darauf abgestimmten kompetenten E.coli- Zellen (One Shot TOP 10, Fa. *Invitrogen*) verwendet. Nach einer Minipräparation wurden die Klone mittels Restriktionsanalyse und DNA-Sequenzierung analysiert.

2.2.4.3. Fragmentierung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die Fragmentierung von DNA wurde mit 1-5 Units Enzym/ μ g DNA für mindestens 1 Stunde unter den vom Hersteller angegebenen Temperatur- und Pufferbedingungen durchgeführt. Bei Restriktionen mit zwei Enzymen verschiedener Reaktionsbedingungen wurde zunächst das Enzym, welches niedrige Salzkonzentrationen benötigt, eingesetzt und anschließend die Pufferbedingungen für das zweite Enzym eingestellt. Wurde RNase A zum Reaktionsansatz gegeben, schloß sich eine Aufreinigung durch Phenolextraktion und anschließender Fällung der DNA an. Die erfolgreiche Fragmentierung der DNA wurde mittels Gelelektrophorese kontrolliert.

2.2.5. Reverse Transkription

2.2.5.1. Elimination von Plasmid-DNA mit DNase I

Nach der Isolierung von RNA wird diese mit DNase I behandelt. Dieser Schritt beseitigt eventuell vorhandene Kontaminationen mit DNA.

Es wurden 5-10 μ g RNA eingesetzt, die mit 10 mmol/l MgCl₂, 20 U RNasin sowie 10 U DNase I versetzt und auf 50 μ l mit H₂O_{DEPC} aufgefüllt wurden. Nach Inkubation bei RT für 1 Stunde wurde eine Phenol/Chloroform-Extraktion durchgeführt, wobei ein zweiter Extraktionsschritt mit reinem Chloroform zusätzlich erfolgte. Anschließend wurde die RNA in Ethanol gefällt und für 30 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde nun mit 70% EtOH gewaschen und getrocknet, dann in 5-10 μ l H₂O_{DEPC} aufgenommen. Abschließend wurde die RNA im Spektralphotometer quantifiziert.

2.2.5.2. Reverse Transkription mit Superscript II

Die Reverse Transkription von Gesamt-RNA wird in einem 20 µl Reaktionsansatz nach den unten aufgeführten Angaben durchgeführt (Tab. 5). Die eingesetzte Gesamt-RNA wird vor der RT-Reaktion mit DNase I (RNasefrei; Fa.*Promega*) behandelt.

Komponenten:	Endkonzentration:
5 x Reaktionspuffer	1 x
DTT (0.1 mol/l)	10 mmol/l
dNTP-Mix (10mmol/l)	1 mmol/l
Superscript II RT	2.5 U/µl
RNAsin	1 U/µl
oligo dT-Primer (50 µmol/l)	2.5 µmol/l

Tab. 5. Zusammensetzung des cDNA-Mastermixes für die reverse Transkription mit Superscript II-Enzym.

Der Mastermix wurde mit H₂O_{DEPC} auf je 18 µl pro Ansatz aufgefüllt. Es wurden nun 0.5 - 1.0 µg RNA (in 2 µl H₂O_{DEPC} aufgenommen) in ein Reaktionsgefäß auf Eis vorgelegt und mit Aliquots des cDNA-Mastermixes je 18 µl versetzt. Die reverse Transkription wurde mit folgendem Temperaturprofil durchgeführt (Tab. 6):

1.	20°C für 10 min
2.	42°C für 60 min
3.	99°C für 5 min
4.	4°C für unbestimmte Zeit

Tab. 6. Temperaturprofil der reversen Transkription.

2.2.6. Polymerase-Kettenreaktion

2.2.6.1. DNA-PCR

Prinzip:

Das Prinzip der Polymerase-Ketten-Reaktion beruht auf einer selektiven zyklischen Vermehrung von DNA-Abschnitten mittels einer thermostabilen Polymerase. Dafür müssen Primer synthetisiert werden, die sequenzspezifisch die Bereiche des zu amplifizierenden Abschnittes auf der DNA eingrenzen.

Durchführung Standard-PCR:

Zunächst wurde ein Mastermix hergestellt, der H₂O, Reaktionspuffer, MgCl₂, dNTPs, DMSO sowie Taq-Polymerase enthielt (Tab. 7).

Komponenten:	Endkonzentration:
ddH ₂ O	-
10 x PCR-Puffer	1 x
MgCl ₂ (25 mmol/l)	2 mM
dNTPMix (10 mmol/l)	1 mM
DMSO	5%
Ampli Taq	2 U/30 µl

Tab. 7. Zusammensetzung des Mastermix für eine Standard-PCR mit DNA.

Der Mastermix wurde gemischt und auf Eis gelagert. In die einzelnen Reaktionsgefäße wurden nun jeweils Primer (30 pM) und die DNA-Templates (10-30 ng/µl) vorgelegt und zuletzt der Mastermix zugefügt.

Nach Zugabe von je 1 Tropfen Mineralöl wurden die Ansätze kurz abzentrifugiert, in den auf 85°C vorgeheizten Thermocycler gegeben und die Kettenreaktion durchgeführt (Tab. 8).

1.	94°C für 1 min (initiale Denaturierung)
2.	94°C für 1 min, 52-60°C für 1 min., 72°C für 2 min , 12 bis 38 Zyklen (Reaktionsschritt)
3.	72°C für 5 min (terminaler Extensionsschritt)
4.	4°C für unbegrenzte Zeit

Tab. 8. Temperaturprofil für eine Standard-PCR mit DNA.

Nach erfolgter PCR wurden 3-15 µl aus dem Ansatz auf einem 1-3% Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Dokumentation erfolgte mittels CSC-Kamera (Fa. *Raytest*) oder über eine CCD-Kamera (Fa. *Herolab*) auf einem Thermodrucker (Fa. *Mitsubishi*).

2.2.6.2. Semiquantitative RT-PCR

Die semiquantitative PCR mit cDNA erfolgte, um die Expression ausgewählter Zielgene in Relation zu Referenzgenen, wie beispielsweise GAPDH oder 28sRNA, zu erfassen.

Bei allen Schritten wurde stets darauf geachtet, dass alle verwendeten Lösungen erst unmittelbar vor dem Experiment aufgetaut wurden und alle Reaktionsschritte bis zur PCR auf Eis durchgeführt wurden. Es wurde ausschließlich cDNA eingesetzt, für deren Synthese DNase-verdaute RNA verwendet wurde. Die reverse Transkription erfolgte nach obigem Protokoll. Zunächst wurde für jede cDNA ein cDNA-Mastermix aus jeweils 4.5 µl cDNA sowie 26 µl H₂O hergestellt. Dann wurde ein Mastermix erstellt, der ddH₂O, Reaktionspuffer, MgCl₂, dNTPs, DMSO sowie Taq-Polymerase enthielt. Die genaue Zusammensetzung entsprach der des Mastermixes im Abschnitt DNA-PCR.

In einem neuen Reaktionsgefäß wurde je 3 µl Primer I sowie 5 µl cDNA-Mastermix vorgelegt und in n+1 (n=Anzahl der Proben) Aliquots des Mastermixes unter Vermeidung von Schaumbildung beim Mischen aufgenommen. Nun wurden n Reaktionsgefäße auf Eis vorgekühlt und 3 µl Primer II in den Deckel pipettiert, um eine sofortige Durchmischung des Reaktionsansatzes zu vermeiden, da es in Anwesenheit beider Primer bereits zu Fehlpaarungen und unspezifischen PCR-Produkten kommen kann. Nach Zugabe des Primer/cDNA-Mastermixes in die Reaktionsgefäße wurde 1 Tropfen Mineralöl hinzugefügt und das Gefäß geschlossen auf Eis gelagert. Der Block des Thermocyclers wurde auf 85°C vorgeheizt und die Proben in einer Tischzentrifuge zentrifugiert und so vermischt. Dann wurden sie in den heißen Block des PCR-Gerätes gegeben und die Reaktion gestartet (Tab. 9).

1.	94°C für 3 min
2.	94°C für 30 sec, 55-60°C für 1 min, 72°C für 2 min, 12-38 Zyklen
3.	72°C für 5 min
4.	4°C für unbestimmte Zeit

Tab. 9. Temperaturprofil für eine semiquantitative RT-PCR.

In Tabelle 10 sind die verwendeten Zyklenzahlen und Primer aufgeführt:

Gen	Primerpaar	durchschnittliche Zyklenzahl
Krox20	Krox20.3/Krox20.4	30
Krox24	Krox24.3/Krox24.4	33
Oct-6/SCIP	Tst1/Tst2	30
Mash1	Sh1.1/Sh1.2	35
28S-RNA	28Sas1/28Ss1	17

Tab. 10. Übersicht über die im Rahmen der semiquantitativen RT-PCR verwendeten Primerpaare und die durchschnittlichen Zyklenzahlen.

Nach erfolgter PCR wurden jeweils 15 µl auf ein 1-3% Agarose-Gel aufgetragen und bei 60-80 V elektrophoretisch aufgetrennt. Die erhaltenen Bandenmuster wurden mit einer CSC-Kamera digital erfaßt und mit der Software "CSC" (Fa.Raytest) sowie "TINA" (Fa.Raytest) ausgewertet

2.2.6.3. Quantitative RT-PCR mit SYBR Green Assay

Die quantitative RT-PCR mittels SYBR Green Assay stellt eine Detektionsmethode für genomische DNA, Plasmid-DNA und cDNA dar. Durch Bindung des Farbstoffs SYBR Green

an doppelsträngige (ds) DNA erhöht sich die Fluoreszenz, womit ein direkter und quantitativer Nachweis des PCR-Produktes möglich ist.

Durch einen internen Standard („passive Referenz“), ebenfalls ein Fluoreszenzfarbstoff, besteht ein Bezugswert für den Signal des SYBR Green-dsDNA-Komplexes, um eventuelle Abweichungen in Volumen und Konzentration durch Normierung ausgleichen zu können.

Verwendet wurde der „SYBR Green PCR Master Mix“ (Fa. *Applied Biosystems*), der bereits PCR-Puffer, Nukleotide, AmpliTaqGold-Enzym sowie AmpErase Uracil-N-glycosylase (UNG) enthält. Durch Ersetzen von dTTP durch dUTP sollen mögliche Kontaminationen mit früher amplifizierten Sequenzen vermieden werden. Die AmpErase UNG hydrolysiert die Uracil-Glycosyl-Bindungen einzel- und doppelsträngige DNA, die dUTP enthält, vor Beginn der PCR-Reaktion, wodurch die Fragmente als Matritze unbrauchbar sind. Auf RNA oder dT-enthaltende DNA hat das Enzym keinen Effekt.

Die Auswahl der Primer erfolgte mittels der Software „Primer Express“ (Fa. *Applied Biosystems*). Die Amplifikatgröße wurde im Größenbereich von 50 bis 150 bp gewählt, die sich als besonders geeignet und effizient in Verwendung mit dem SYBR Green Assay erwiesen hat. Die Optimierung der Primerkonzentration erfolgte nach Vorgaben des Herstellers. Es fanden Primerpaare für die Gene Krox24, Mash2 und GAPDH Verwendung (Tab. 11).

Gen	Primerpaar
Krox24	Krox24-f/Krox24-r
Mash2	Mash2-f/Mash2-r
GAPDH	GAPDH-f/GAPDH-r

Tab. 11. Übersicht über die im Rahmen der quantitativen RT-PCR verwendeten Primerpaare. GAPDH wurde als Referenzgen verwendet.

Die verwendete cDNA wurde gemäß dem Protokoll "Reverse Transkription" nach vorherigem DNase I-Verdau erstellt. Als Referenzgen diente GAPDH. Die Reaktionsansätze wurden nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt (*Applied Biosystems*, 2001a). Die Amplifikation und Detektion erfolgte auf dem GeneAmp 5700 Sequence Detection System (Fa. *Applied Biosystems*). Die Auswertung der erhaltenen Rohdaten erfolgte mittels der Software „SDS“ (Fa. *Applied Biosystems*).

2.2.6.4. Auswertung mittels vergleichender C_T-Methode (*Applied Biosystems*, 2001b)

Die Bestimmung der so generierten PCR-Amplifikate erfolgte mittels der vergleichenden C_T-Methode. Diese ist ähnlich der Standardkurven-Methode, nur dass sie arithmetische Formeln zur relativen Quantifizierung verwendet.

Folgende Formel beschreibt die Vorgänge in der Phase der exponentiellen Amplifikation der PCR eines zu untersuchenden Gens:

$$X_n = X_0 \times (1 + E_x)^n$$

X_n	=	Nummer der Zielmoleküle im Zyklus n
X_0	=	Initiale Zahl der Zielmoleküle
E_x	=	Effizienz der Amplifikation des Zielmoleküls
n	=	Zyklenzahl

Betrachtet man die Zahl der Zielmoleküle, die einen festgelegten Schwellenwert erreicht, so erhält man folgende Gleichung:

$$X_T = X_0 \times (1 + E_x)^{C_{T,X}} = K_x$$

X_T	=	Nummer der Zielmoleküle am Schwellenwert
$C_{T,X}$	=	Zahl der Zyklen, um Schwellenwert zu erreichen
K_x	=	Konstante

Gleiches gilt nun für die Amplifikation des endogenen Referenzgens. Teilt man die Zahl der Zielmoleküle des zu untersuchenden Gens am Schwellenwert durch die des Referenzgens, so ergibt sich folgendes:

$$\frac{X_T}{R_T} = \frac{X_0 \times (1 + E_x)^{C_{T,X}}}{R_0 \times (1 + E_R)^{C_{T,R}}} = \frac{K_x}{K_R}$$

R_0	=	Initiale Zahl der Zielmoleküle
E_R	=	Effizienz der Amplifikation des Zielmoleküls
R_T	=	Nummer der Zielmoleküle am Schwellenwert
$C_{T,R}$	=	Zahl der Zyklen, um Schwellenwert zu erreichen
K_R	=	Konstante

Die exakten Werte für X_T und R_T sind von zahlreichen Faktoren abhängig, wie die Wahl des Reporterfarbstoffes, die (sequenzabhängigen) Fluoreszenzeigenschaften der Probe, die Reinheit der Probe sowie die Wahl des Schwellenwertes für die Fluoreszenz. Daher muss die Konstante K nicht zwangsläufig 1 entsprechen.

Setzt man folgende Effizienzen gleich,

$$E_x = E_R = E$$

so ergibt sich nach Umformung:

$$X_N = K \times (1 + E)^{-\Delta CT}$$

X_N	=	X_0 / R_0 , die normierte Zahl der Zielmoleküle
ΔCT	=	$C_{T,X} - C_{T,R}$, Differenz der Schwellenwert-Zyklen für Ziel- und Referenzsequenz

Zuletzt muss X_N für jede Probe q noch durch den X_N -Wert des Kalibrators kb geteilt werden:

$$\frac{X_{N, q}}{X_{N, kb}} = (1 + E)^{-\Delta\Delta C_T}$$

- $\Delta\Delta C_T$	=	$\Delta C_T, q - \Delta C_T, kb$
----------------------	---	----------------------------------

Für Amplifikate, die nach den Richtlinien der Fa. *Applied Biosystems* erstellt wurden (Grösse < 150 bp), ist die Effizienz sehr nahe bei 1. Daher entspricht die Menge der Zielmoleküle (normiert mit einer endogenen Referenz und relativ zu einem Kalibrator) näherungsweise:

$$X_{N, kal} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

Die Standardabweichung der Differenz wird aus den Standardabweichungen des Wertes des zu untersuchenden Gens und des Wertes der Referenzsequenz wie folgt berechnet:

$$S^2 = \sqrt{S_1^2 + S_2^2}$$

Die experimentell erhaltenen C_T -Werte und Standardabweichungen wurden nach diesen Formeln mit der Software „Excel“ (Fa. *Microsoft*) in die Endwerte umgerechnet.

2.2.7. Sequenzierung

2.2.7.1. Probenvorbereitung

Die zu sequenzierenden DNA-Proben wiesen einen hohen Reinheitsgrad auf. Besondere Berücksichtigung fand neben der Reinheit der DNA auch die Probenlänge und der Ursprung der Nukleinsäure (Plasmid-DNA oder PCR-Fragment).

PCR-Produkte wurden vor der Sequenzierung von den in der PCR-Reaktion nicht verbrauchten Primerresten und freien Nukleotiden befreit. Dazu wurden die PCR-Produkte über Zentrifugations-Säulen aufgereinigt. Dies erfolgte nach Angaben des Herstellers (Fa. *Qiagen*, PCR-Purification Kit). Die Plasmid-DNA war zu einem hohem Grad protein- und salzfrei, um über entsprechende Kontaminationen nicht die Güte der Sequenzreaktion zu beeinträchtigen.

2.2.7.2. Unidirektionale PCR-Amplifikation

Eingesetzt wurden in dieser Reaktion hochaufgereinigtes Plasmid oder sorgfältig eluierte

PCR-Amplifikate laut den Angaben des Herstellers (Fa. *Applied Biosystems*; Handbuch ABI 310), wobei für PCR-Fragmente (Tab. 12) und Plasmid-DNA (Tab. 13) unterschiedliche Mastermix-Ansätze verwendet wurden.

PCR-Fragmente	Menge
PCR-Fragment (100-300 ng)	x µl
BigDye Terminator Sequenzierungsmix	4 µl
Primer (10 pmol/µl)	1 µl
H ₂ O	ad 20 µl

Tab. 12. Zusammensetzung des Mastermixes für die unidirektionale PCR-Amplifikation im Rahmen der Sequenzierungsreaktion von eluierten PCR-Fragmenten.

Plasmide	Menge
Plasmid (0.5-1 µg)	x µl
BigDye Terminator Sequenzierungsmix	8 µl
Primer (10 pmol/µl)	1 µl
H ₂ O	ad 20 µl

Tab. 13. Zusammensetzung des Mastermixes für die unidirektionale PCR-Amplifikation im Rahmen der Sequenzierungsreaktion von aufgereinigten Plasmiden.

In Tabelle 14 ist das verwendete Temperaturprofil für die Sequenzreaktion aufgeführt.

1.	94°C für 1 min (initiale Denaturierung)
2.	94°C für 30 sec, 55°C für 15 sec, 60°C für 4 min , 25 Zyklen (Reaktionsschritt)
3.	4°C für unbegrenzte Zeit

Tab. 14. Temperaturprofil für die unidirektionale PCR-Reaktion.

Nach Beendigung der Reaktion wurde das gesamte Volumen über Centrisep-Säulen nach Vorschrift des Herstellers aufgereinigt, um nicht eingebaute fluoreszenzmarkierte Nukleotide abzutrennen.

2.2.7.3. Automatische Sequenzierung

Zur Auftrennung der nach der Didesoxymethode nach Sanger (Sanger et al., 1977) erhaltenen Polymerisationsprodukte wurden 4 µl Aliquots des Centrisep-Eluats mit 20 µl TSR-Puffer (Denaturierungspuffer) versetzt und für 2 Minuten bei 90°C denaturiert. Die so

vorbereiteten Proben wurden in den Probenhalter des ABI 310 Genetic Analyzer Sequenzer gestellt und mittels Kapillarelektrophorese vollautomatisch aufgetrennt. Die vom erhaltenden Elektropherogramm abgeleiteten Nukleinsäuresequenzen wurden mit Hilfe der Software "DNAsis" (Fa. Hitachi) sowie des Online-Programms für Sequenzanalyse "BLASTn" (Rechenzentrum EMBL) näher charakterisiert.

2.2.8. Southern-Blot-Analyse

2.2.8.1. Radioaktive Markierung von DNA-Sonden

Prinzip:

Bei dieser Methode wurde ein radioaktiv markierter DNA-Zweitstrang mit Hilfe der Klenow-Polymerase synthetisiert. Als Syntheseansatzpunkt benötigt das Enzym freie 3'-OH-Enden, die von Oligonukleotid-Primern (Hexanukleotide) geliefert wurden. Die Hexanukleotide, bei denen es sich um eine Mischung verschiedener Oligonukleotide mit zufälliger Basenabfolge handelt, hybridisieren an die vorgegebene, denaturierte Matrizen-DNA und bilden somit multiple Startpunkte für die Zweitstrangsynthese. Bei der Synthese werden radioaktive Nukleotide ($\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP) eingebaut, so dass ein radioaktiv markierter Zweitstrang entsteht.

Durchführung:

Die Markierungsreaktion wurde mit 20 ng DNA und 20-50 μCi $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP unter Einhaltung der Vorschrift des Ready to go - Kit durchgeführt. Nicht eingebaute Nukleotide wurden über Microspin columns (MicroSpin S-200) abgetrennt und denaturiert. Die spezifische Aktivität der markierten DNA wurde in einem Szintillationszähler (Tri-Carb 2100 TR, Fa. Canberra Packard) nach Cherenkov ermittelt.

2.2.8.2. Southern-Blot

Die zu analysierenden DNA-Proben wurden auf ein 1-2%iges Agarose-Gel übertragen und über Nacht nach dem Kapillarblotverfahren auf eine mit 0.4 N NaOH vorbehandelte Hybond N+ Membran übertragen. Nun wurde die Membran für 15 min in 5x SSC gewaschen. Die Fixierung durch Crosslinking der DNA mit der Membran erfolgte im Stratalinker (Fa. Stratagene) mit 1200 μJ . Nun wurden die Filter bei -20°C gelagert. Vor Zugabe der radioaktiv markierten Probe wurde die Membran für 30 min bei 65°C in Church-Puffer vorhybridisiert. Der Filter wurde nun in eine Glasröhre überführt, mit 20 ml Churchpuffer und 25 μl der radioaktiv markierten und denaturierten Probe versetzt. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 65°C in einem Überkopfschüttler. Dann wurde die Hybond-Membran mit 10 ml Church-Puffer für 5 min bei RT gewaschen und die Aktivität gemessen. Bei hoher Aktivität wurde dann ein zweiter Waschschrift mit Blot-Waschpuffer angefügt, bei dem der Filter regelmäßig gemessen wurde. Der gewaschene Filter wurde feucht in Plastikfolie verpackt

und auf dem BAS-Reader (Fa. *Fuji*) mit der Software "TINA" (Fa. *Raytest*) ausgewertet.

2.3. ZELLKULTUR-METHODEN

2.3.1. Zellkultur-Techniken

2.3.1.1. Auftauen von Rattenschwanzzellen

Rattenschwanzzellen wurden aus den Ischiasnerven von postnatalen Ratten (männliche Wistar-Ratten, 200-250g, Tierversuchsanlage der Universität Düsseldorf) nach den gängigen Protokollen gewonnen und in flüssigem Stickstoff gelagert (Brockes et al., 1979; Lemke und Chao, 1988). Das Auftauen von Zellen erfolgte durch vorsichtiges Erwärmen der in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen und sofortigem Überführen in 50 ml vorgewärmtes Kulturmedium, sobald die Zellen aufgetaut waren. Dabei war wichtig, die Zellen unmittelbar nach dem Auftauen in das Medium zu geben, um Schäden durch das in der zum Einfrieren benutzten Lösung verwendete zytotoxische DMSO zu vermeiden. Nach Zentrifugation und Vereinzelung des Zellpellets wurde die Suspension in eine mit vorgewärmtem Medium versetzte Gewebekulturschale vom Typ T75 gegeben.

2.3.1.2. Passagieren von Rattenschwanzzellen

Rattenschwanzzellen sind stark adhärente Primärkulturen. Daher erfolgte die Zellpassage mit Trypsinlösung. Zuvor wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen, dann mit einer entsprechenden Menge (für T75-Zellkulturflaschen: 4 ml) auf 37°C vorgewärmter Trypsinlösung versetzt. Dann wurden die Zellen unter regelmäßigem Schütteln bei 37°C inkubiert. Ablösen und Suspensieren der Zellen durch mehrfaches Klopfen der Kulturschale auf die Arbeitsplatte erfolgte, wenn die Zellen rund und kugelförmig aussahen. Die Trypsinisierung wurde nun durch Zugabe von 10-15 ml Kulturmedium gestoppt. Nach Zentrifugation (3000 rpm im Swing-Out-Rotor für 10 min ohne Bremse bei Raumtemperatur) wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren mit einer 1000 µl-Pipette in 500-1000 µl Kulturmedium resuspendiert. Die Einzelzellsuspension wurde nun entweder gezählt oder direkt auf PDL-beschichtete Kulturgefäße mit vorgewärmtem Medium gegeben.

2.3.1.3. Beschichten mit PDL

Gefäße für Kultivierung von Rattenschwanzzellen wurden vor Benutzung mit PDL beschichtet, um den adhärent wachsenden Primärkulturen die Anhaftung an den Gefäßboden zu ermöglichen. Dazu wurde die PLD-Stocklösung 1:1000 PBS verdünnt und steril filtriert. Dann wurde diese Lösung 15 min lang in den Kulturgefäßen belassen, anschließend abgesaugt und dreimal mit PBS gewaschen, um Kontamination des Mediums

mit PDL zu vermeiden. Nun wurden die Gefäße mit entsprechenden Volumina Kulturmedium gefüllt und 10 min vor Zugabe der Zellen im Brutschrank bei 37°C, 98% Luftfeuchtigkeit und 10% CO₂ gelagert.

2.3.1.4. Selektionierung zur Erstellung stabiler Zelllinien

Nach Transfektion der RSZ mit den Plasmiden pMash2/CDS und pMash2/ Δ wurden die Zellen zunächst in RSZ-Kulturmedium gehalten und nach zwei Tagen je 50000, 100000 und 2000000 transfizierte Zellen umgesetzt auf 10 cm Zellkulturschalen. Nach weiteren zwei Tagen erfolgte der Zusatz von 50 μ g Hygromycin/ml RSZ-Kulturmedium als Selektionsmittel. Da die pMash2-Vektoren ein Hygromycin-Resistenzgen enthalten, konnten mit dem stark zytotoxischen Hygromycin gezielt Zellen entfernt werden, die kein Plasmid enthielten. Im weiteren erfolgte nach zwei Wochen unter Selektionsdruck die Vereinzelung von Klonkolonien mittels Ringklonierung.

2.3.1.5. Ringklonieren

Ringklonieren dient der selektiven Ablösung einzelner Klonkolonien von einem Zellkulturgefäß. Nach Absaugen des Mediums, mehrfachem Waschen mit PBS und Absaugen des Puffers bis auf einen kleinen Rest wurden Klonierungsringe mit autoklavierter Zentrifugenschmiere versehen und auf Zellkolonien einzelner Klone gesetzt. Dann wurden die Zellen mit 30 μ l 37°C warmer Trypsin-Lösung für wenige Minuten inkubiert und in eine Pipette aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen in eine PDL-beschichtete und mit vorgewärmtem RSZ-Kulturmedium versehene 24- oder 48-Lochplatte gegeben und im Brutschrank kultiviert unter Selektionsdruck durch Hygromycin-Zusatz (50 μ g/ml Kulturmedium).

2.3.2. Transfektion

2.3.2.1. Optimierung der Transfektionseffizienz mittels Luziferase-Assay

Zur Optimierung der Transfektionseffizienz wurde das pGL3-control Plasmid kotransfiziert. Dabei wurde die von diesem Vektor exprimierte Luziferase als interner Standard verwendet und als Chemilumineszenz von einem Luminometer erfaßt.

Die transfizierten Zellen wurden zunächst mit dem 1x Zell-Lyse-Puffer aufgeschlossen und der dabei gewonnene Zellextrakt zur Luziferase-Aktivitätsmessung sowie zur Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford eingesetzt.

Um eine unspezifische Bindung des Luziferase-Proteins an die Oberfläche der Polystyrol-Röhrchen zu verhindern, wurden je 10 μ l BSA (2 μ g/ μ l) vorgelegt. Dann wurden jeweils 5 μ l und 10 μ l Zellextrakt hinzugegeben, mit 100 μ l Luziferase-Substrat versetzt, gemischt und

unmittelbar im Luminometer (AutoLumat LB 953, Berthold) vermessen. Die Stärke der Lumineszenz in RLU (relative light units) wurde für beide Ansätze gemittelt und diente, bezogen auf die Gesamtproteinmenge, als Parameter für die Effizienz der Transfektion.

2.3.2.2. Bradford-Assay

Prinzip:

Die Bestimmung des Gesamtproteingehaltes nach Bradford beruht auf der Bindung des Farbstoffes Coomassie Blue an Aminogruppen von Proteinen, die eine Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm nach 595 nm zur Folge hat und photometrisch bestimmt werden kann.

Durchführung:

Zunächst wurde eine Verdünnungsreihe zum Festlegen des Standardwertes erstellt. Dafür wurde mittels einer BSA-Stocklösung (400 µg/ml) eine Verdünnungsreihe mit folgenden Konzentrationen erstellt: 0, 20, 30, 40, 50, 60, 80 und 100 µg BSA/ml.

Dann wurden die Proben (Lysat nach Zugabe des Zellkultur-Lysis-Puffers) 1:5 und 1:20 in H₂O verdünnt. Nun wurden jeweils zwei Aliquots a 50 µl der Standard-Reihe sowie der verdünnten Proben auf eine 96-Loch-Platte aufgetragen, mit Bradford-Reagenz (Fa. Bio-Rad) versetzt und je 200 µl in jedes Loch gegeben. Nach 5 min Inkubation bei RT wurden die Proben im Photometer (Fa. *SLT-Rainbow*) vermessen und die Daten mit der Software "Excel" (Fa. *Microsoft*) ausgewertet. Dabei wurden die gemessenen Werte für die Absorption bei einer bestimmten Wellenlänge einer jeden Probe mit der Standard-Reihe verglichen und so quantifiziert.

2.3.2.3. Transfektion eukaryontischer Zellen

Die Transfektion von Rattenschwanzzellen zur Herstellung stabiler Zelllinien erfolgte mit DOSPER (Fa. *Roche*) sowie mit FUGENE6 (Fa. *Roche*) für transient transfizierte Kulturen. DOSPER besteht aus 1,3-Di-Oleoyloxy-2-(6-Carboxy-spermyl)-propylamid und ist damit ein polykationisches liposomales Transfektionsagens. Es interagiert mit DNA spontan zu Liposomen/Polynukleotid-Komplexen, die einen zuverlässigen Transfer von Nukleinsäuren in eukaryontische Zellen gewährleisten. FUGENE6 setzt sich aus einem nicht-liposomalen Lipidgemisch zusammen, welches sich durch hohe Transfektionseffizienz und minimale Zytotoxizität auszeichnet. Die verwendeten Primärkulturen von Schwanzzellen wurden in speziellem rSC-Kulturmedium bei 37°C, 98% Luftfeuchtigkeit und 10% CO₂ gehalten. Die Transfektionen erfolgten an RSZ, die sich in der 5.-10. Passage befanden. Die verwendete Plasmid-DNA war mit dem "Qiagen Maxi Plasmid Präparations Kit" hoch aufgereinigt. Die Analyse der Transfektionseffizienz erfolgte mittels eines Luziferase-Assays und eines β-

Galaktosidase-Assays. Das Expressionsverhalten der transfizierten Zellen wurde mittels semiquantitativer RT-PCR mit der aus den Zellen isolierten RNA beurteilt.

2.3.2.4. DOSPER

Am Vortag der Transfektion wurden Rattenschwanzzellen in niedriger Passage auf Kulturschalen ausplattiert, wobei die Zellzahlen in Abhängigkeit von der Größe des Kulturgefäßes variierten (Tab. 15).

Kulturgefäß	Zellzahl / ml
3 cm Petrischale	100.000
10 cm Petrischale	700.000
T75 – Flasche	1.000.000

Tab. 15. Übersicht über die verwendeten Zellzahlen in Abhängigkeit von der Größe des Kulturgefäßes.

Am Tag der Transfektion wurde zunächst ein Mediumwechsel durchgeführt und die Zellen im Brutschrank gelagert, wobei der Gefäßgröße entsprechende Volumina des Mediums verwendet wurden (Tab. 16).

Kulturgefäß	Volumen Medium
3 cm Petrischale	1.5 ml
10 cm Petrischale	10 ml
T75 – Flasche	12 ml

Tab. 16. Übersicht über die verwendeten Volumina von Medium in Abhängigkeit von der Größe des Kulturgefäßes.

Pro Ansatz wurde DNA im Bereich von 0.5 bis 6.5 µg verwendet sowie Dosper in den Dosierungen 3, 6 und 10 µg für 450.000 Zellen. Die DNA wurde in serumfreiem DMEM+HEPES mit einem Endvolumen von 50 µl aufgenommen. DOSPER wurde steril und unter Vermeidung von Luftblasenbildung entnommen und in ebenfalls 50 µl Endvolumen serumfreiem DMEM+HEPES verdünnt. Beide Ansätze wurden vorsichtig vermengt und für 15 min bei RT inkubiert. Dann erfolgte die Zugabe des DNA/DOSPER-Gemisches tropfenweise auf die RSZ-Kulturen unter Schwenken der Zellkulturgefäße. Nach einer Inkubation von 6 Stunden Dauer im Brutschrank wurden 2 ml RSZ-Kulturmedium hinzugegeben. Nach 24 Stunden erfolgte ein weiterer Mediumwechsel mit RSZ-Kulturmedium. Nach 48 Stunden wurden die Zellen entweder lysiert und die Transfektionseffizienz mittels Bradford- und Luciferase-Assay gemessen oder die Zellen zur Selektionierung vereinzelt.

2.3.2.5. FUGENE6

Die Transfektion mit FUGENE6 erfolgte nach den Anleitungen des Herstellers. Wesentliche Abweichungen vom DOSPER-Protokoll bestanden in einem zusätzlichen Inkubationsschritt von 5 min nach Zugabe des Transfektionsagens in HEPES-DMEM, dem Ausführen der Transfektion in RSZ-Kulturmedium (mit FKS) sowie dem Weglassen des Mediumwechsels nach 24 h. Nach 48 Stunden erfolgte die weitere Analyse.

3. ERGEBNISSE

3.1. ERSTELLUNG DER EXPRESSIONSVEKTOREN pMASH2/CDS UND pMASH2/ Δ

Ziel des ersten Abschnittes war die Erstellung von eukaryontischen Expressionsvektoren, in die Fragmente des Mash2-Gens von Ratten integriert wurden. Zwei Konstrukte wurden hergestellt, um die Funktion von Mash2-Proteinen in Zellkulturen von Rattenschwanzzellen auf Ebene der RNA-Expression zu untersuchen. Der Vektor pMash2/CDS soll eine Überexpression des funktionstüchtigen Mash2-Proteins bewirken. Der Vektor pMash2/ Δ soll die Expression eines funktionsuntüchtigen rekombinanten Proteins bewirken. Dieses trunkierte Protein enthält nur die basische Sequenz für das nukleäre Lokalisationssignal des rekombinanten Proteins (NLS) sowie die bHLH-Domäne (Abb. 16). Ziel ist eine Bindung an die Zielsequenz, ohne dass eine regulatorische Aktivität ausgeübt wird.

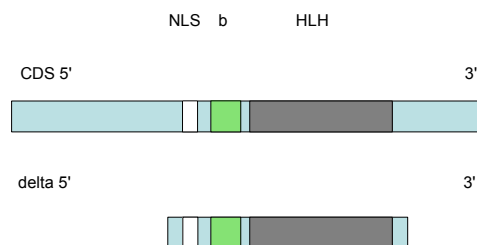
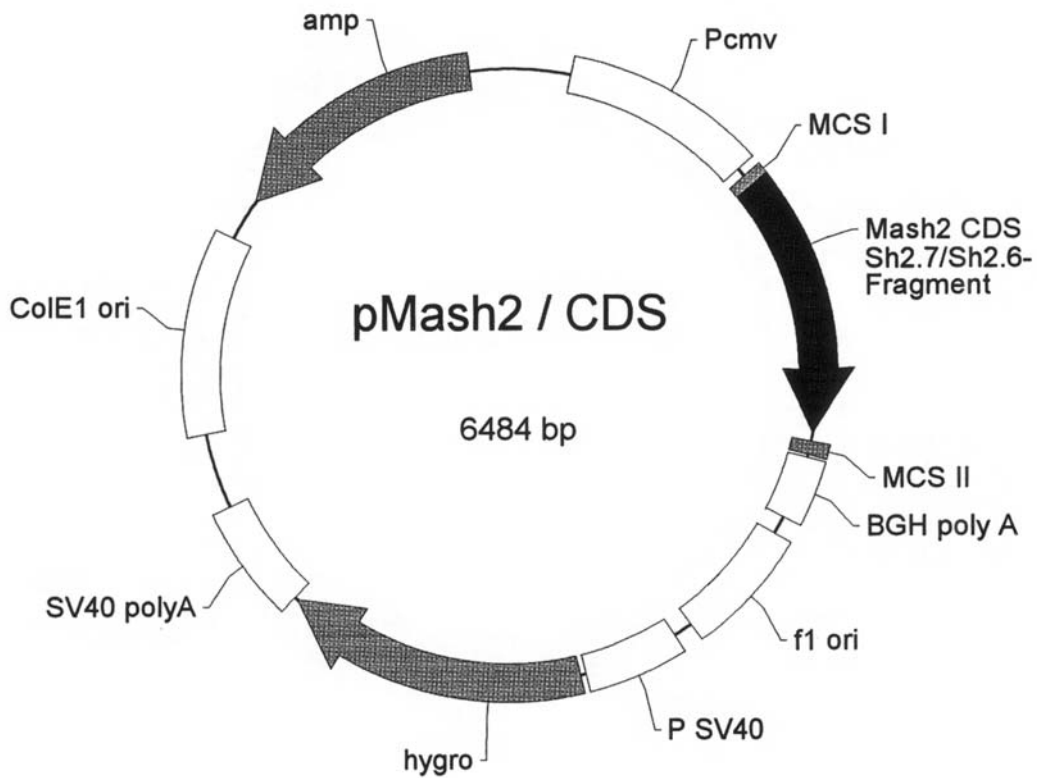


Abb. 16. Struktureller Aufbau der Mash-Konstrukte. Das CDS-Konstrukt enthält die komplette kodierende Sequenz, das delta-Konstrukt eine 5' und 3' verkürzte Variante der kodierenden Sequenz, die jedoch alle für die DNA-Bindung wichtigen funktionellen Domänen enthält. Abkürzungen: NLS, nukleäres Lokalisationssignal; b, basische Region; HLH, Helix-loop-helix.

3.1.1. Klonierung von Mash2/CDS in pcDNA 3.1/Hygro(-)-Vektor

Zunächst erfolgte die Gewinnung eines die gesamte kodierende Sequenz enthaltenden Mash2-Fragmentes aus Gesamt-RNA von Rattenischiasnerven mittels RT-PCR mit den Primern Sh2.7/Sh2.6. Das hierbei gewonnene ca. 900 bp große Fragment wurde in einen pCR-blunt-Vektor ligiert und in E.coli-Zellen transformiert. Nach DNA-Minipräparation und EcoRI-Verdau konnte in einem Klon ein Fragment von etwa 900 bp Länge nachgewiesen werden. Die Sequenzierung zeigte, dass dieser Klon einen DNA-Abschnitt enthielt, der homolog zur kodierenden Sequenz (CDS) war und zusätzlich einen Teil der 3' untranslatierten Region enthielt. Zur Erstellung des pMash2/CDS-Vektors erfolgte eine Modifikation des Mash2-CDS-Fragmentes, in dem durch erneute PCR mit dem Primerpaar Sh2.2+0/Sh2.2+R am 5'-Ende eine NotI-Restriktionsenzymstichstelle sowie am 3'-Ende eine BstXI-Restriktionsenzymstichstelle eingefügt wurde. Auch dieses modifizierte CDS-Fragment wurde in einen pCR-blunt-Vektor ligiert.

A)



B)

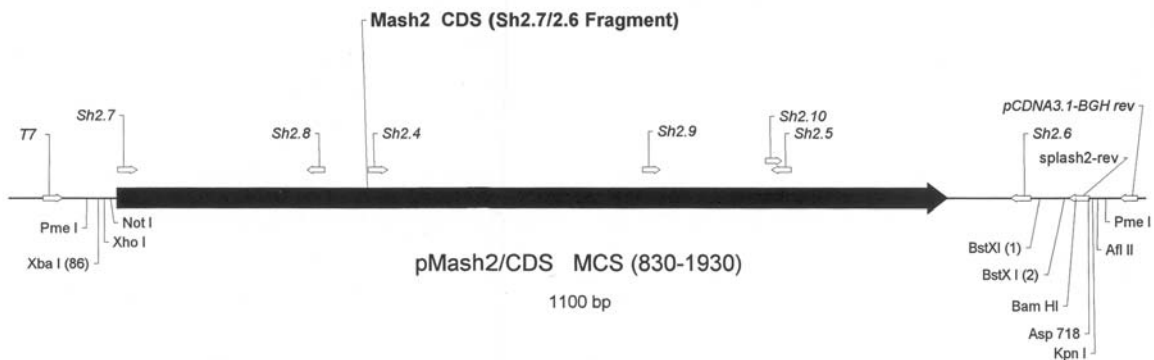


Abb. 17. Vektorkarte pMash2/CDS. **A)** Schematischer Aufbau des rekombinanten Vektors pMash2/CDS. **B)** Dargestellt ist die multiple Klonierungsstelle von pMash2/CDS mit den am häufigsten verwendeten Primern und Restriktionsenzymstimmstellen. Abkürzungen: Pcmv, CMV-Promoter; MCS I, erster Teil der multiplen Klonierungsstelle; Mash2 CDS (Sh2.7/Sh2.6-Fragment), kodierende Sequenz von *Mash2* im PCR-Fragment, das mit den Primern Sh2.7/Sh2.6 amplifiziert wurde; MCS II, zweiter Teil der multiplen Klonierungsstelle; BGH pA, BGH Polyadenylierungssignal; f1 origin, Replikationsursprung des filamentösen Phagen f1; P SV 40, SV40-Promoter und Replikationsursprung; hygro, Hygromycin-Resistenzgen; SV40 polyA, frühes Polyadenylierungssignal; ColE1 ori, Replikationsursprung des Plasmids in *E.coli* in Abwesenheit der Helferphagen; amp: Ampicillin-Resistenzgen.

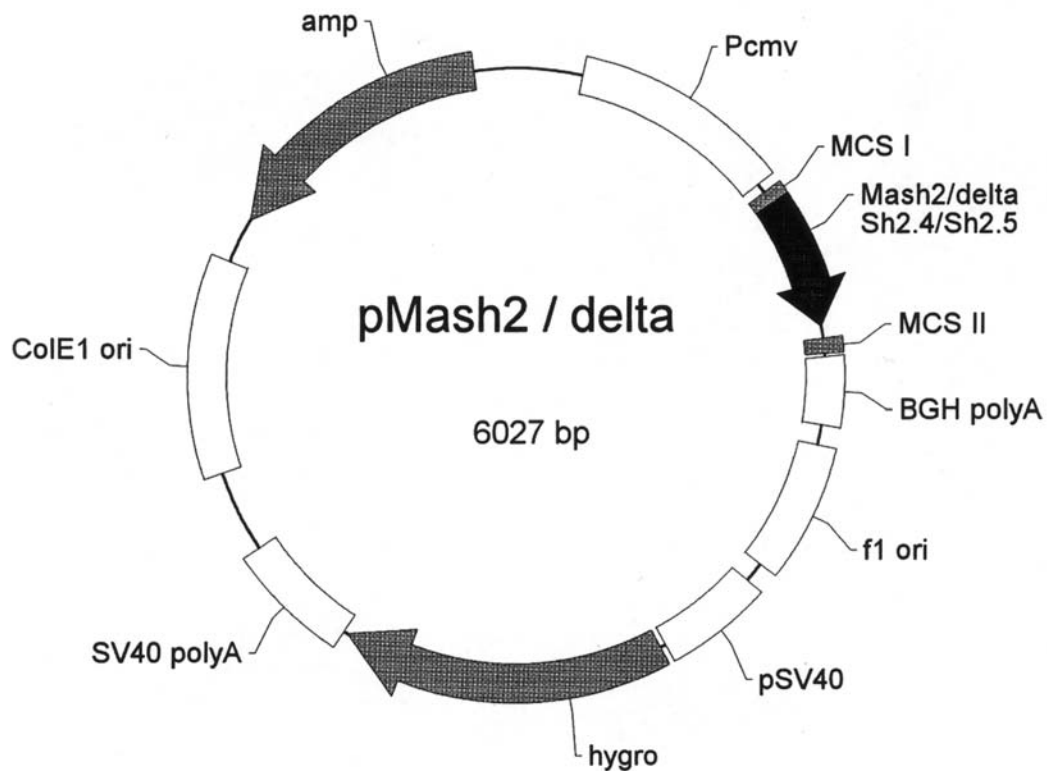
Dieser PCR-Klonierungsvektor wurde in E.coli.-Bakterien transformiert und die erhaltene Plasmid-DNA nach DNA-Minipräparation und Aufreinigung sequenziert. Die erhaltene Sequenz eines ausgewählten Klons entsprach der Mash2-CDS, die zusätzlich zur Wildtyp-Variante eine NotI-Schnittstelle unmittelbar stromaufwärts vor dem Startkodon sowie BstXI-Schnittstelle stromabwärts des Stopkodons enthielt. Mittels Restriktionsenzym-Verdau mit NotI und BstXI und Aufreinigung über Qiaquick-Säulen wurde das modifizierte CDS-Fragment isoliert.

Der Vektor pcDNA3.1/H(-) wurde mit den Enzymen NotI/BstXI geschnitten, und das erhaltene ca. 6kb große Fragment aufgereinigt. Das erhaltene Vektorfragment wurde mit dem modifizierten CDS-Fragment ligiert und in DH5 α -Zellen transformiert. DNA-Minipräparation und NotI/BamHI-Verdau ergaben für einen ausgewählten Klon eine ca. 6kb sowie eine ca. 900 bp große Bande. In der Sequenzierung zeigte die korrekte Sequenz für die kodierende Sequenz mit den flankierenden artifiziellen NotI und BstXI-Schnittstellen (Abb. 17).

3.1.2. Klonierung von Mash2/ Δ in pcDNA 3.1/Hygro(-)-Vektor

Ein trunkiertes Fragment (Δ) wurde mittels des Primerpaares Sh2.4+N/Sh2.5+B mittels der Polymerase-Kettenreaktion erzeugt. Dazu wurde das aufgereinigte NotI- und BstXI-geschnittene CDS-Fragment als Matrize verwendet. Durch den Primer Sh2.4+N wurde stromaufwärts eine NotI-Schnittstelle sowie unmittelbar vor den Transkriptionsstart ein künstliches Startkodon mit *Kozak*-Sequenz eingefügt, die zu einer verbesserten Transkription in eukaryontischen Zellen führen soll (Kozak, 1991a; 1991b). Durch den Primer Sh2.5+B wurde in einer PCR-Reaktion an das 3'-Ende des Fragmentes eine BstXI-Schnittstelle angefügt. Nach Ligation in den pCR-blunt-Vektor erfolgte die Transformation des erhaltenen Plasmides in DH5 α -Zellen mit anschließender DNA-Minipräparation. In einem Restriktionsenzymverdau mit EcoRI konnte ein ca. 400 bp großes Fragment aus dem Plasmid isoliert werden. Nach einem weiteren Restriktionsenzymverdau mit NotI und BstXI erfolgte die Ligation in das NotI- und BstXI-geschnittene Vektorfragment. Das aufgereinigte Plasmid wurde in DH5 α -Zellen transformiert. Nach DNA-Minipräparation der erhaltenen Klone und Restriktionsverdau mit den Enzymen BamHI und XhoI wurde ein Klon ausgewählt, der in der Agarosegelaufftrennung eine Vektorbande von 6kb und eine weitere Bande von ca. 400 bp Größe zeigte. Die Sequenzierung ergab eine Mash2-homologe Sequenz, die die artifiziell eingefügten Schnittstellen für NotI und BstXI sowie einer *Kozak*-Sequenz enthielt (Abb. 18).

A)



B)

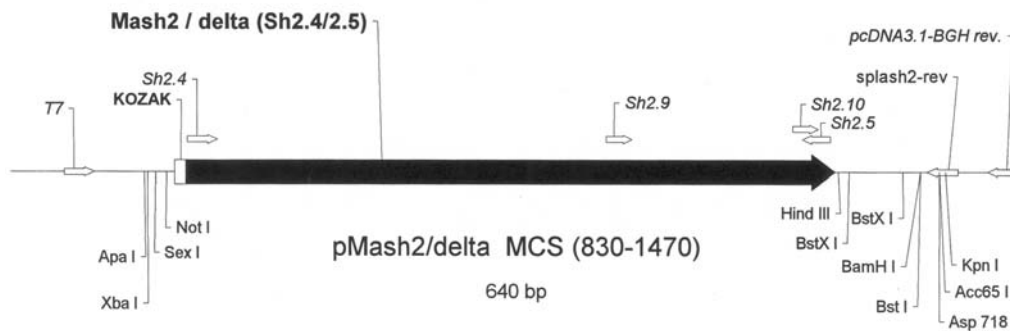


Abb. 18. Vektorkarte pMash2/ Δ . **A)** Dargestellt ist der schematische Aufbau des rekombinanten Vektors pMash2/ Δ . **B)** Dargestellt ist die multiple Klonierungsstelle von pMash2/ Δ mit den am häufigsten verwendeten Primern und Restriktionsenzymchnittstellen. Abkürzungen: Pcmv, CMV-Promoter; MCS I, erster Teil der multiplen Klonierungsstelle; Mash2 Δ (Sh2.4/Sh2.5-Fragment), verkürzte kodierende Sequenz von *Mash2* im PCR-Fragment, das mit den Primern Sh2.4/Sh2.5 amplifiziert wurde; MCS II, zweiter Teil der multiplen Klonierungsstelle; BGH pA, BGH Polyadenylierungssignal; f1 ori, Replikationsursprung des filamentösen Phagen f1; P SV 40, SV40-Promoter und Replikationsursprung; hygro, Hygromycin-Resistenzgen; SV40 polyA, frühes Polyadenylierungssignal; ColE1 ori, Replikationsursprung des Plasmids in *E.coli* in Abwesenheit der Helferphagen; amp, Ampicillin-Resistenzgen.

3.2. EXPRESSIONSPROFILE UNTRANSFIZIERTER RATTENSCHWANNZELLEN

3.2.1. Einleitung:

Vor der Transfektion von Rattenschwanzzellen wurde zunächst die Expression und Regulation verschiedener Transkriptionsfaktoren in Abhängigkeit von verschiedenen Kulturbedingungen untersucht. Als Wachstumsbedingungen wurden die Parameter konfluent/subkonfluent, 0.5% Fetales Kälberserum (FKS)/10% Fetales Kälberserum und 2 μ M Forskolin/ Forskolin-frei kombiniert, so dass insgesamt 8 Zellkulturbedingungen ausgetestet wurden (Tab. 17).

	konfluent	subkonfluent
+ 2 μ M Forskolin	0.5% Serum	0.5% Serum
"	10 % Serum	10% Serum
ohne Forskolin	0.5% Serum	0.5% Serum
"	10% Serum	10% Serum

Tab. 17. Kulturbedingungen für untransfizierte Rattenschwanzzellen. Insgesamt ergeben sich acht verschiedene Kulturbedingungen, unterteilt nach konfluenten/subkonfluenten, Forskolin-stimulierten/nicht Forskolin-stimulierten und 0.5% Serum/10% Serum.

Dann wurde das Expressionsverhalten und die Regulation der Transkriptionsfaktoren Krox20, Krox24, Oct-6/SCIP, Mash1 und Mash2 untersucht. Für jeden Faktor wurden Experimente mit 2 verschiedenen RNA-Serien durchgeführt und für jede Serie jeweils mindestens 2 unabhängige cDNA-Synthesen verwendet. In der statistischen Auswertung wurde als Referenz die Wachstumsbedingung konfluent, 10% fetales Kälberserum und 2 μ M Forskolin definiert.

3.2.2. Kultivierung und RNA-Gewinnung

Zunächst wurden 2 Chargen Rattenschwanzzell-Primärkulturen aufgetaut, die sich in der 3. Passage befanden, und bis zur 6. Passage vermehrt. Dann wurden die Zellen auf 15 cm-Zellkulturplatten umgesetzt und für 2 Tage in RSZ-Kulturmedium gehalten. Die konfluenten Versuchsansätze wurden für weitere 2 Tage in RSZ-Kulturmedium gehalten und dann für eine Dauer von 3 Tagen in den Endbedingungen gehalten. Diese Zeit wurde benötigt, um den Effekt von Forskolin als Aktivator der cAMP-Kaskade zu eliminieren (Zorick et al., 1996). Die subkonfluenten Versuchsansätze wurden direkt auf die Endbedingungen eingestellt und für weitere 3 Tage in diesem Milieu belassen. Dann erfolgte das Ernten der Zellen und Aufnahmen in SolD mit RNA-Präparation nach Chomzynski und Sacchi (1987). Anschließend wurde photometrisch die Konzentration der RNA-Proben bestimmt (Tab. 18).

RNA	Serie	Wachstumsbedingung	Konz. ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
1	1. Serie	subkonfl. 0.5% Serum + Fk	0.163
2		subkonfl. 0.5% Serum - Fk	0.168
3		subkonfl. 10% Serum + Fk	0.967
4		subkonfl. 10% Serum - Fk	1.55
5		konfl. 0.5% Serum + Fk	0.38
6		konfl. 0.5% Serum - Fk	0.32
7		konfl. 10% Serum + Fk	0.835
8		konfl. 10% Serum - Fk	0.131
9	2. Serie	subkonfl. 0.5% Serum + Fk	0.2
10		subkonfl. 0.5% Serum - Fk	0.42
11		subkonfl. 10% Serum + Fk	0.45
12		subkonfl. 10% Serum - Fk	1.39
13		konfl. 0.5% Serum + Fk	0.47
14		konfl. 0.5% Serum - Fk	0.34
15		konfl. 10% Serum + Fk	0.96
16		konfl. 10% Serum - Fk	0.87

Tab. 18. Ergebnisse der RNA-Präparation aus Rattenschwanzzellen, die in zwei Serien unter verschiedenen Wachstumsbedingungen kultiviert wurden und deren RNA mittels einer Präparation nach Chomzynski und Sacchi isoliert wurde.

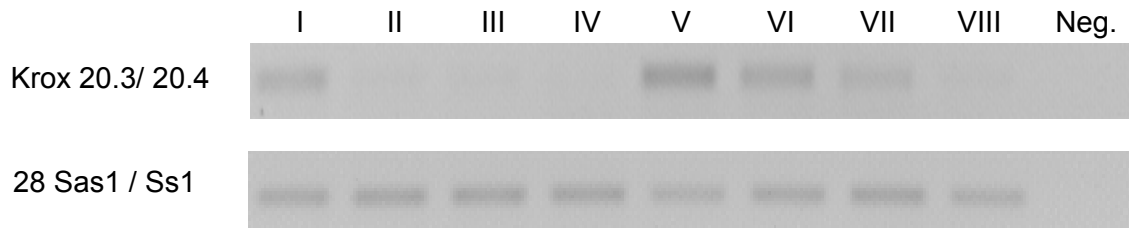
3.2.3. Semiquantitative RT-PCR

Nach der reversen Transkription der präparierten RNA wurden semiquantitative PCR-Analysen mit Primern für die Transkriptionsfaktoren Krox20, Krox24, Oct-6/SCIP, Mash1 und Mash2 durchgeführt. Als Referenz wurden Primer für 28S-RNA eingesetzt. Im folgenden ist jeweils ein repräsentatives Experiment als Agarose-Gel sowie die Ergebnisse der photodensitometrischen Quantifikation der Bandenintensität dargestellt. Dabei wurde die Bandenintensität des Zielgens in Relation zur Bandenintensität des Referenzgens als Diagramm dargestellt.

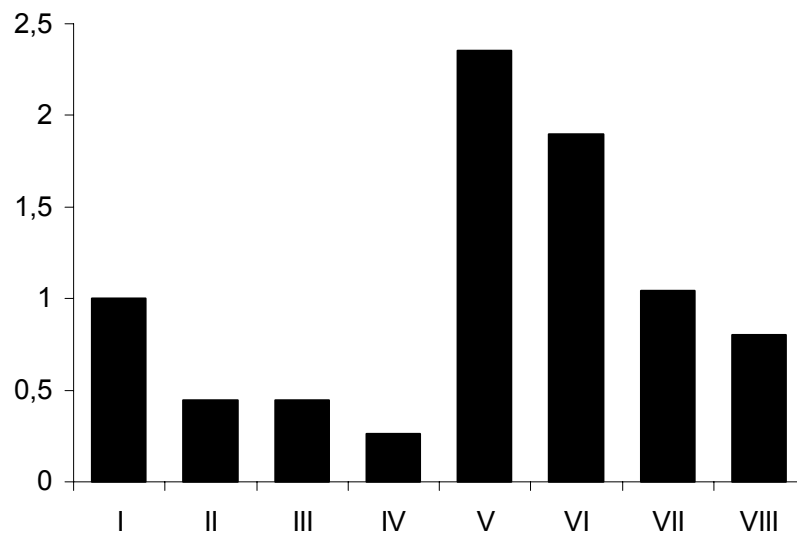
3.2.3.1. Krox20

In Abb. 19 ist ein repräsentatives Ergebnis der semiquantitativen RT-PCR-Analyse von Krox20 aus 11 Experimenten dargestellt. Erkennbar ist eine Stimulation der Krox20-Expression durch Forskolin. Niedrige Spiegel von fetalem Kälberserum führen ebenso wie konfluente Zelldichten zu einer Zunahme der Krox20-Expression.

A)



B)



C)

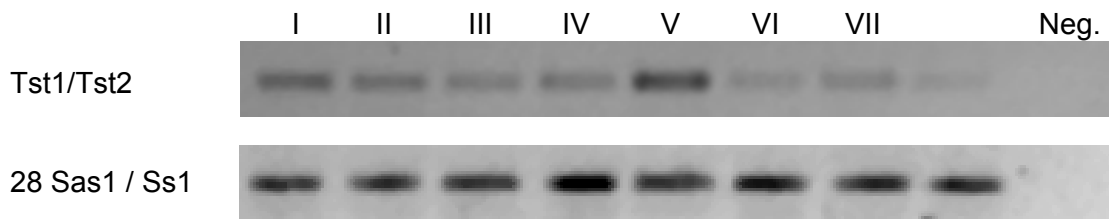
Bedingung	Dichte	FKS-Konzentration	Forskolin
I	subkonfluent	0.5 %	2 μ M
II	"	"	-
III	"	10%	2 μ M
IV	"	"	-
V	konfluent	0.5 %	2 μ M
VI	"	"	-
VII	"	10 %	2 μ M
VIII	"	"	-

Abb. 19. RT-PCR Analyse zur Expression von Krox20 in kultivierten Schwanzzellen. **A)** Amplifikation von Krox20 und 28S rRNA aus cDNAs verschiedener Kulturbedingungen von Rattenschwanzzellen (I-VII) mittels semiquantitativer RT-PCR mit den Primerpaaren Krox20.3/Krox20.4 bei 30 Zyklen sowie 28 Sas1/28Ss1 bei 17 Zyklen. Kulturbedingung I-VIII: siehe C). **B)** Stärke der Genexpression von Krox 20 in relativen Einheiten bei der semiquantitativen RT-PCR in Abhängigkeit von verschiedenen Kulturbedingungen (I-VIII) in untransfizierten Rattenschwanzzellen. **C)** Verschiedene Kulturbedingungen der Rattenschwanzzellen (I-VIII). Abkürzungen: Neg., Negativkontrolle.

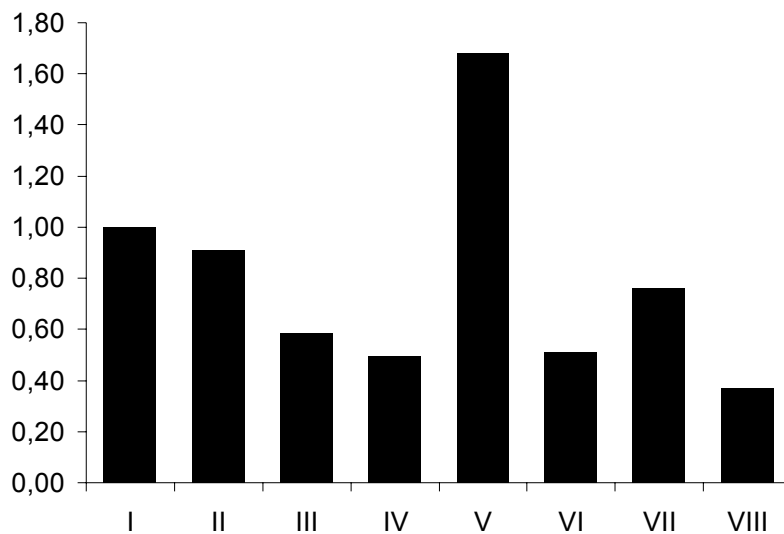
3.2.3.2. Oct-6/SCIP

In Abb. 20 ist ein repräsentatives Ergebnis der semiquantitativen RT-PCR-Analyse der Oct-6/SCIP-Expression aus 9 Experimenten dargestellt. Die Oct-6/SCIP weist ein Expressionsverhalten auf, das parallel zu dem von Krox20 verläuft. Auch hier ist eine Stimulation der Oct-6/SCIP-Expression durch Forskolin, durch niedrige Spiegel an fetalem Kälberserum und hohe Zelldichten erkennbar.

A)



B)



C)

Bedingung	Dichte	FKS-Konzentration	Forskolin
I	subkonfluent	0.5 %	2µM
II	"	"	-
III	"	10%	2µM
IV	"	"	-
V	konfluent	0.5 %	2µM
VI	"	"	-
VII	"	10 %	2µM
VIII	"	"	-

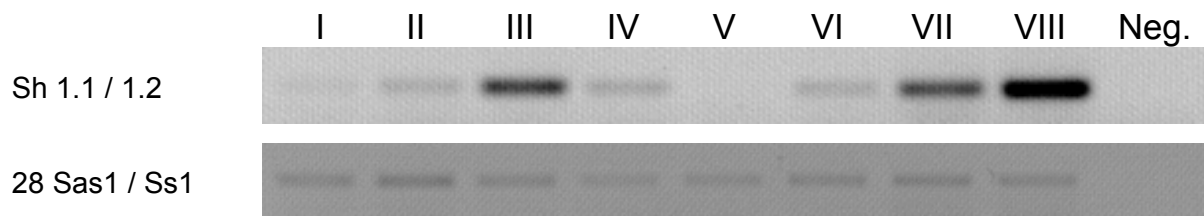
Abb. 20. RT-PCR Analyse zur Expression von Oct-6/SCIP in kultivierten Schwanzzellen. **A)** Amplifikation von Oct-6/SCIP und 28S rRNA aus cDNAs verschiedener Kulturbedingungen von Rattenschwanzzellen (I-VIII) mittels semiquantitativer RT-PCR mit den Primerpaaren Tst1/Tst2 bei 30 Zyklen sowie 28 Sas1/28Ss1 bei 17 Zyklen. Kulturbedingung I-VIII: siehe C). **B)** Stärke der

Genexpression von Oct-6/SCIP in relativen Einheiten bei der semiquantitativen RT-PCR in Abhängigkeit von verschiedenen Kulturbedingungen (I-VIII) in untransfizierten Rattenschwanzzellen. **C)** Verschiedene Kulturbedingungen der Rattenschwanzzellen (I-VIII). Abkürzungen: Neg., Negativkontrolle.

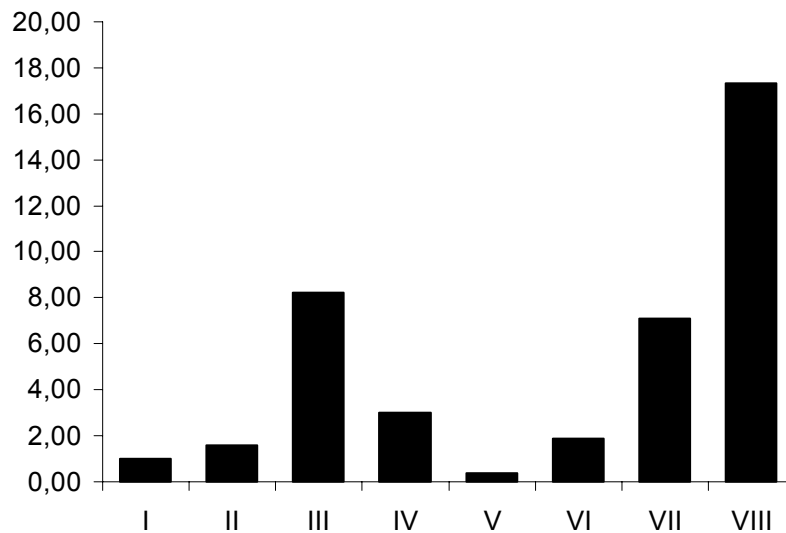
3.2.3.3. Mash1

In Abb. 21 ist ein repräsentatives Ergebnis der semiquantitativen RT-PCR-Analyse der Mash1-Expression aus 4 Experimenten dargestellt. Bei konfluenten Wachstumsbedingungen konnte die Mash1-Expression durch Forskolin leicht reduziert werden, während unter subkonfluenten Bedingungen keine eindeutige Regulation von Mash1 erkennbar ist. Konfluente Wachstumsbedingungen und hohe Serumspiegel führen zu einer Steigerung der Mash1-Expression.

A)



B)



C)

Bedingung	Dichte	FKS-Konzentration	Forskolin
I	subkonfluent	0.5 %	2µM
II	"	"	-
III	"	10%	2µM
IV	"	"	-
V	konfluent	0.5 %	2µM
VI	"	"	-
VII	"	10 %	2µM
VIII	"	"	-

Abb. 21. RT-PCR Analyse zur Expression von Mash1 in kultivierten Schwanzzellen **A)** Amplifikation von Mash1 und 28S rRNA aus cDNAs verschiedener Kulturbedingungen von Rattenschwanzzellen (I-VIII) mittels semiquantitativer RT-PCR mit den Primerpaaren Sh1.1/Sh1.2 bei 35 Zyklen sowie 28 Sas1/28Ss1 bei 17 Zyklen. Kulturbedingung I-VIII: siehe C). **B)** Stärke der Genexpression von Mash1 in relativen Einheiten bei der semiquantitativen RT-PCR in Abhängigkeit von verschiedenen Kulturbedingungen (I-VIII) in untransfizierten Rattenschwanzzellen. **C)** Verschiedene Kulturbedingungen der Rattenschwanzzellen (I-VIII). Abkürzungen: Neg., Negativkontrolle.

3.2.3.4. Krox24

Für Krox24 waren trotz mehrfach wiederholter Experimente mittels semiquantitativer RT-PCR keine konsistenten Ergebnisse reproduzierbar.

3.2.3.5. Mash2

Mit der gewählten Nachweismethode waren auch für Mash2 mit cDNA aus Rattenschwanzzell-Kulturen trotz erheblicher Zyklenzahlen von bis zu 38 Zyklen und Variation der eingesetzten cDNA-Menge im Versuchsansatz keine reproduzierbaren Ergebnisse erhältlich.

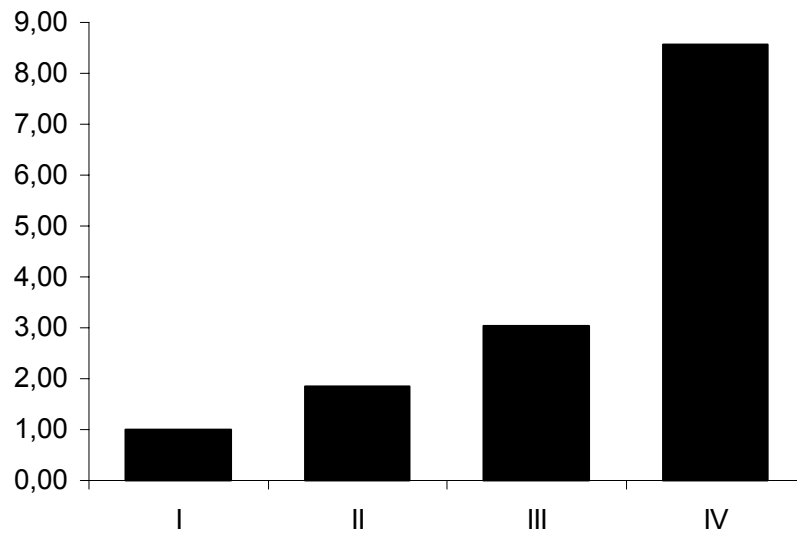
3.2.4. Quantitative RT-PCR

Um die Krox24- und Mash2-Expression analysieren zu können, wurde auf die Methode der quantitativen PCR zurückgegriffen. Die Nachweisreaktionen für diese Transkriptionsfaktoren wurden mit speziell entworfenen Primern und dem SYBR-Green-Verfahren durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels der vergleichenden C_T -Methode. Als Standard wurden Primer für GAPDH verwendet. Für die weiteren Experimente wurde cDNA eingesetzt, die analog der ersten beiden Chargen gewonnen wurde und freundlicherweise von Herrn Dr. Patrick Küry zur Verfügung gestellt wurde. Einziger Unterschied war die zeitlich getrennte Durchführung der Experimente mit subkonfluenten und konfluenten Ansätzen. Im einzelnen ist jeweils ein repräsentatives Experiment aus mehreren als Diagramm abgebildet.

3.2.4.1. Mash2

In Abb. 22 zeigt sich für subkonfluente Zellen ein Anstieg der Mash2-Expression bei Entzug von Forskolin. Mit steigenden Spiegeln von fetalem Kälberserum steigt auch die Mash2-Expression. Unter konfluenten Wachstumsbedingungen wird Mash2 vergleichbar reguliert (Abb. 23).

A)

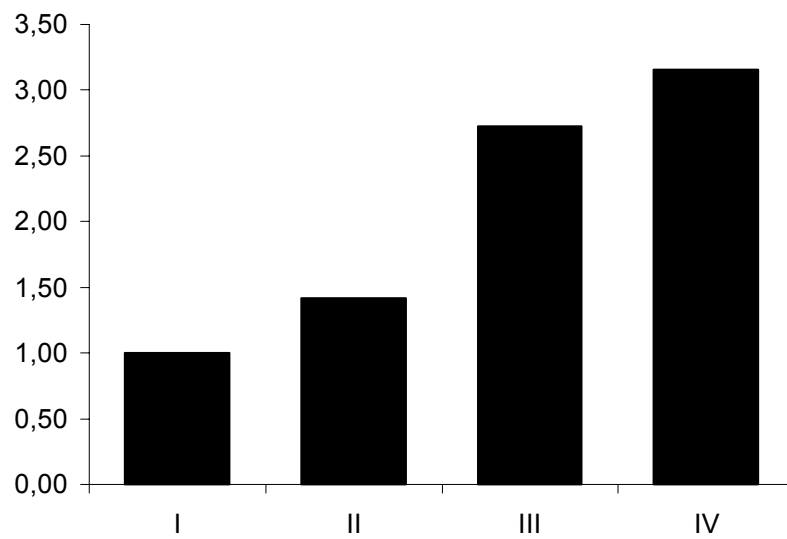


B)

Bedingung	Dichte	FKS-Konzentration	Forskolin
I	subkonfluent	10 %	2 μ M
II	"	"	-
III	"	0.5%	2 μ M
IV	"	"	-

Abb. 22. Quantitative RT-PCR Analyse von Mash2 in kultivierten subkonfluenten Schwanzzellen. **A)** Stärke der Genexpression von Mash2 in relativen Einheiten bei der quantitativen RT-PCR in Abhängigkeit von verschiedenen subkonfluenten Kulturbedingungen (I-IV) in untransfizierten Rattenschwanzzellen. **B)** Verschiedene Kulturbedingungen im subkonfluenten Bereich.

A)



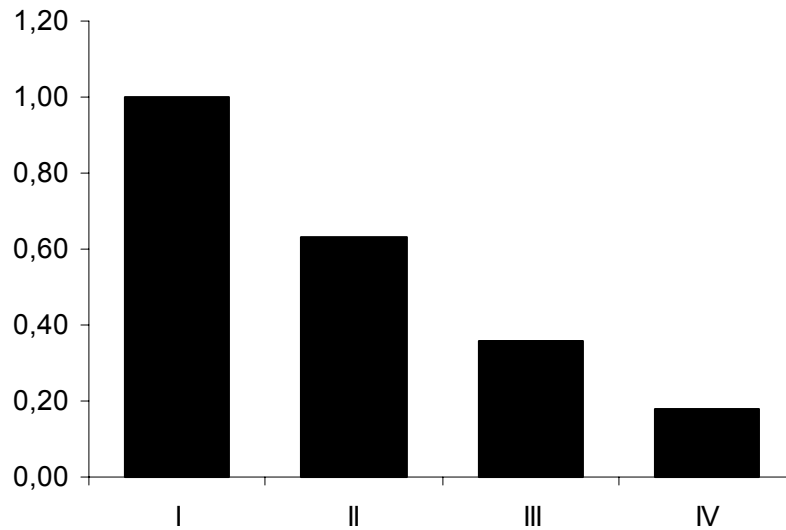
B)

Bedingung	Dichte	FKS-Konzentration	Forskolin
I	konfluent	10 %	2µM
II	"	"	-
III	"	0.5%	2µM
IV	"	"	-

Abb. 23. Quantitative RT-PCR Analyse von Mash2 in kultivierten konfluenten Schwanzzellen. **A)** Stärke der Genexpression von Mash2 in relativen Einheiten bei der quantitativen RT-PCR in Abhängigkeit von verschiedenen konfluenten Kulturbedingungen (I-IV) in untransfizierten Rattenschwanzzellen. **B)** Verschiedene Kulturbedingungen im konfluenten Bereich.

3.2.4.2. Krox24

A)



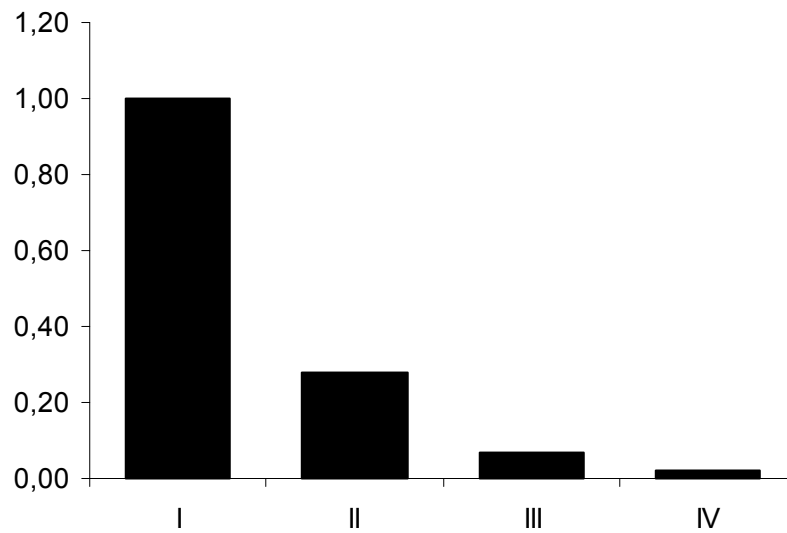
B)

Bedingung	Dichte	FKS-Konzentration	Forskolin
I	subkonfluent	10 %	2 μ M
II	"	"	-
III	"	0.5%	2 μ M
IV	"	"	-

Abb. 24. Quantitative RT-PCR Analyse von Krox24 in kultivierten subkonfluenten Schwanzzellen. **A)** Stärke der Genexpression von Krox24 in relativen Einheiten bei der quantitativen RT-PCR in Abhängigkeit von verschiedenen subkonfluenten Kulturbedingungen (I-IV) in untransfizierten Rattenschwanzzellen. **B)** Verschiedene Kulturbedingungen im subkonfluenten Bereich.

Für Krox24 kann unter subkonfluenten Kulturbedingungen eine verminderte Expression mit ansteigenden Serumspiegeln und unter Forskolingabe beschrieben werden (Abb. 24). Das Expressionsverhalten ist invers zu dem von Mash2. Unter konfluenten Kulturbedingungen ist eine vergleichbare Regulation sichtbar, die jedoch ein stärkeres Ausmaß erreicht (Abb. 25).

A)



B)

Bedingung	Dichte	FKS-Konzentration	Forskolin
I	konfluent	10 %	2 μ M
II	"	"	-
III	"	0.5%	2 μ M
IV	"	"	-

Abb. 25. Quantitative RT-PCR Analyse von Krox24 in kultivierten konfluenten Schwanzzellen. **A)** Stärke der Genexpression von Krox24 in relativen Einheiten bei der quantitativen RT-PCR in Abhängigkeit von verschiedenen konfluenten Kulturbedingungen (I-IV) in untransfizierten Rattenschwanzzellen. **B)** Verschiedene Kulturbedingungen im konfluenten Bereich.

3.3. ERSTELLUNG STABILER ZELLINIEN

Um den Effekt einer Überexpression von funktionsfähigem Mash2-Protein und einer trunkierten Version des Mash2-Proteins auf Ebene der RNA-Expression zu untersuchen, wurden nach Optimierung der Transfektionsbedingungen primäre Rattenschwanzzellen mit pMash2/CDS und pMash2/ Δ transfiziert und in Selektionsmedium kultiviert. Die Zellen wurden geerntet und die RNA isoliert. Die weitere Analyse des Expressionsverhaltens erfolgte mittels RT-PCR und Southern-Blot.

3.3.1. Optimierung der Transfektionsbedingungen in Rattenschwanzzell-Kulturen

Um eine möglichst hohe Effizienz bei der Transfektion von Rattenschwanzzell-Kulturen zu erzielen, erfolgte zunächst eine Optimierung der Transfektionsbedingungen mit variablen Mengen an DNA und Transfektionsagens. Dann wurden die Zellen lysiert und die Transfektionseffizienz ermittelt.

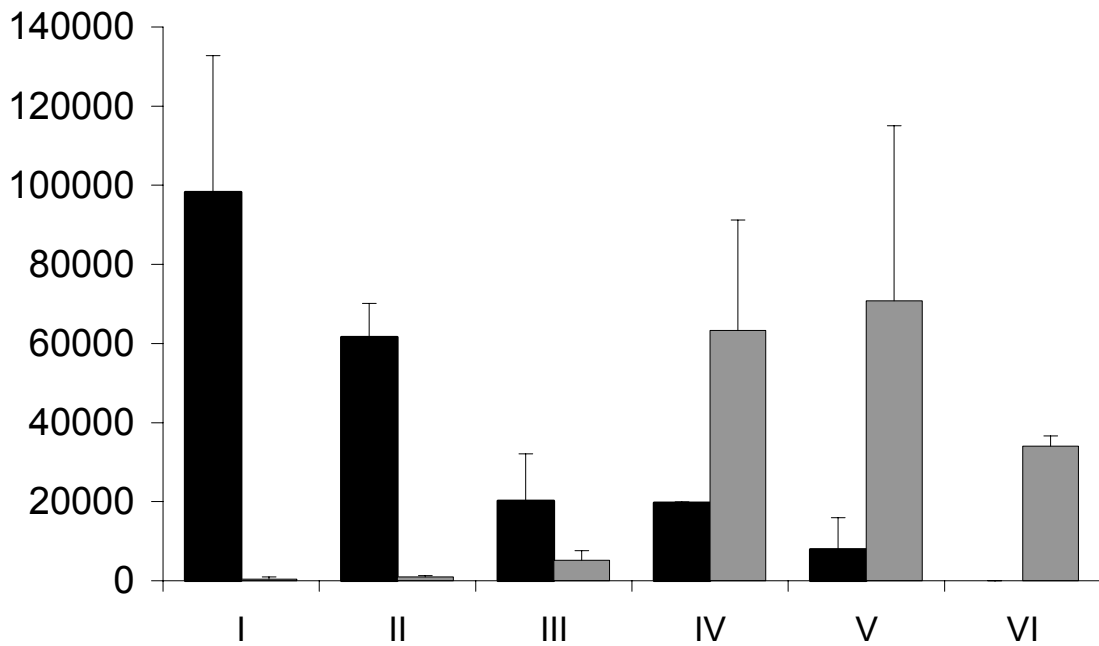
3.3.1.1. Transfektion der Rattenschwanzzellen

Zur Optimierung der Transfektionsbedingungen wurden je 450000 primäre Rattenschwanzzellen in der 3. Passage auf 3.5 cm-Zellkulturschalen in RSZ-Kulturmedium ausplattiert. Am nächsten Tag erfolgte die Kotransfektion. Hierzu wurden aufsteigende Mengen DOSPER eingesetzt. DOSPER ist ein polykationisches liposomales Transfektionsagens. Als Reporterplasmid wurde pGL3-Control verwendet, welches ein Luziferasegen enthält, sowie pCAT- Δ 3-PMP und pMash2- Δ als Koplasmide in aufsteigender Konzentration. Nach 48 Stunden wurden die Zellen lysiert und analysiert.

3.3.1.2. Luziferase-Assay und Bradford-Test

Die Analyse der transfizierten Zellen erfolgte mittels Bestimmung der Luziferase-Aktivität, die durch das pGL3-Control-Plasmid synthetisiert und in Relation zum Gesamtproteingehalt nach Bradford gesetzt wurde. In mehreren unabhängigen Experimenten zeigte sich, dass bei Verwendung von 3 μ g DOSPER eine DNA-Menge von 0.5-2 μ g zur höchsten Transfektionseffizienz führt, während eine DNA-Menge von 3-4 μ g bei einer DOSPER-Menge von 6 μ g besonders günstig ist (Abb. 26 und Abb. 27). Für die Erstellung von stabilen Zelllinien wurde aufgrund der vorliegenden Ergebnisse das Verhältnis 3 μ g DOSPER zu 1 μ g Plasmid-DNA gewählt.

A)

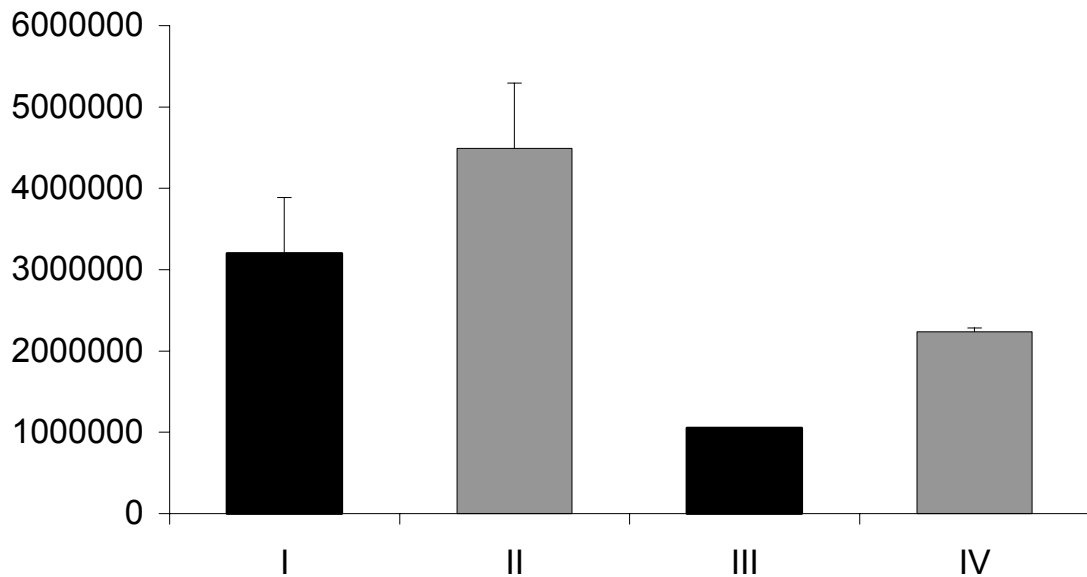


B)

Ansatz	pGL3 control (µg)	pCAT-Δ3-PMP (µg)	Gesamtmenge DNA (µg)
I	0.5 µg	0	0.5
II	"	1	1.5
III	"	2	2.5
IV	"	3	3.5
V	"	4	4.5
VI	"	6	6.5

Abb. 26. Analyse der Transfektionseffizienz von DOSPER in Rattenschwanzzellen I. **A)** Messung der Chemolumineszenz in relativen Lichteinheiten in Abhängigkeit von der Gesamtproteinmenge (RLU/OD) nach transients Transfektion von Rattenschwanzzellen mit aufsteigenden DNA-Mengen (I-VI) und DOSPER-Konzentrationen. Schwarze Balken entsprechen 3 µg eingesetztem DOSPER, graue 6 µg DOSPER. Es wurden pGL3 control sowie pCAT-Δ3-PMP kotransfiziert. **B)** Darstellung der eingesetzten Plasmid-DNA-Mengen und DOSPER-Mengen der jeweiligen Ansätze.

A)



B)

Ansatz	pGL3 control (µg)	pMash2/Δ bzw. pCAT-Δ3-PMP (µg)	Gesamtmenge DNA (µg)	DOSPER-Menge (µg)
I	0.5 µg	0	1.0	3
II	"	1	1.0	3
III	"	2	3.5	6
IV	"	6	3.5	6

Abb. 27. Analyse der Transfektionseffizienz von DOSPER in Rattenschwanzzellen II. **A)** Messung der Chemolumineszenz in relativen Lichteinheiten in Abhängigkeit von der Gesamtproteinmenge (RLU/OD) nach transienter Transfektion von Rattenschwanzzellen mit unterschiedlichen DNA-/DOSPER-Mengen (I-IV) und Plasmiden. Schwarze Balken entsprechen einer Kotransfektion von pGL3 control mit pMash2/Δ, graue einer von pGL3 control mit pCAT-Δ3-PMP. **B)** Dargestellt sind die unterschiedlichen Plasmid-DNA- und DOSPER-Mengen der jeweiligen Ansätze.

3.3.2. Erstellung stabiler Zelllinien

3.3.2.1. Transfektion und Selektion der transfizierten Zellen

Die Transfektion von Rattenschwanzzellen für die Erstellung von stabilen Zelllinien erfolgte nach den optimierten Bedingungen. Zeitlich versetzt erfolgte ein zweiter Ansatz, bei dem Rattenschwanzzellen nur mit pMash2/CDS transfiziert wurden. Zur Selektion der Zellen, die die Plasmide pMash2/CDS und pMash2/Δ aufgenommen hatten, wurde Hygromycin verwendet. Nach zwei Wochen erfolgte durch Ringklonierung die Vereinzelung der Klonkolonien. Diese proliferierten unter Selektionsdruck durch Hygromycin für jeweils ein bis zwei Monate. Dann waren entsprechend große Zellzahlen vorhanden, um eine weitere Analyse der Zellen vornehmen zu können und um für Folgeexperimente ein Aliquot der Zellen kryokonservieren zu können. Im Rahmen der weiteren Analyse wurden Zellen nach der RNA-Präparation auf eine Integration des zunächst nur episomal in der Zelle

vorhandenen Plasmides ins Genom untersucht. Es wurde zudem darauf geachtet, dass die Klonkolonien die 11. Passage nicht überstiegen, um durch die bei höheren Passagezahlen zu beobachtende Entdifferenzierungsprozesse der Zellen die Analyse der Expression und Regulation von Transkriptionsfaktoren nicht zu verfälschen.

Zur RNA-Präparation lag genügend Zellmaterial von 10 Klonkolonien vor (Tab. 19).

CDS-Klone Nr. (transf. mit pMash2/CDS)	Δ -Klone Nr. (transf. mit pMash2/ Δ)
2	1
4	3
7	4
9	
11	
12	
13	

Tab. 19. Dargestellt sind die zur RNA-Extraktion verfügbaren Klonkolonien nach Hygromycin-Selektion.

3.3.3. Analyse der transfizierten Zellen

Die Analyse der transfizierten Zellen erfolgte nach RNA-Präparation durch RT-PCR und Southern-Blot. Ziel war, eine Integration der zunächst nur episomal vorliegenden Gene von Mash2 (volle kodierende Sequenz und verkürzte Variante) und Hygromycin in das Genom der transfizierten und selektierten Zellen nachzuweisen.

3.3.3.1. Zellyse und RNA-Präparation

Nach Zellyse erfolgte die RNA-Präparation nach Chomczynski und Sacchi (1987). Nach DNaseI-Verdau und Aufreinigung wurde die Konzentration der RNA im Spektralphotometer bestimmt (Tab. 20). Bei den RNA-Proben 9, 13 und 17 waren in der spektralphotometrischen Auftrennung in den Extinktionskurven über die Wellenlänge von 220 bis 320 nm Verunreinigungen zu erkennen, so dass auf die weitere Verwendung dieser Proben verzichtet wurde.

RNA	Klon	Konz. ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
1	CDS 2	0.04
2	CDS 2	0.03
3	CDS 4	0
4	CDS 4	0.03
5	CDS 5	0.03
6	CDS 5	0.09
7	CDS 7	0.05
8	CDS 7	0.06
9	CDS 9	0.32
10	CDS 9	0.09
11	CDS 11	0.05
12	CDS 11	0.03

13	CDS 12	0.33
14	CDS 12	0.6
15	CDS 13	0.04
16	CDS 13	0.03
17	dn 1	0.34
18	dn 1	0.07
19	dn 3	0.38
20	dn 3	0.08
21	dn 3	0.06
22	dn 3	0.06
23	dn 4	0.04
24	dn 4	0.04

Tab. 20. RNA-Präparation der Hygromycin-selektionierten Klonkolonien

3.3.3.2. Molekulargenetische Charakterisierung:

Zunächst erfolgte die cDNA-Synthese. Die Effizienz der reversen Transkription wurde durch eine PCR mit 28S-RNA Primern kontrolliert. Um mögliche Kontaminationen der RNA durch potentiell vorhandene Plasmid-DNA oder genomische DNA auszuschließen, wurde eine PCR mit RNA-Proben aus der vorangegangenen Präparation durchgeführt (Abb. 28). Dafür ergaben sich in diesem Experiment keine Hinweise.

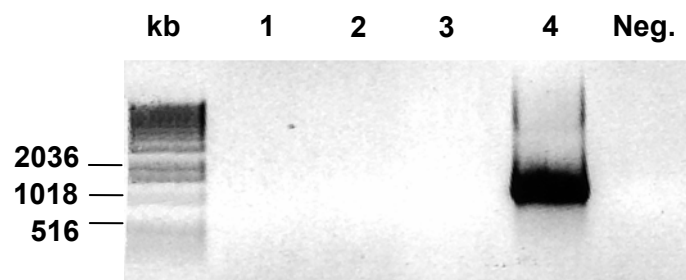


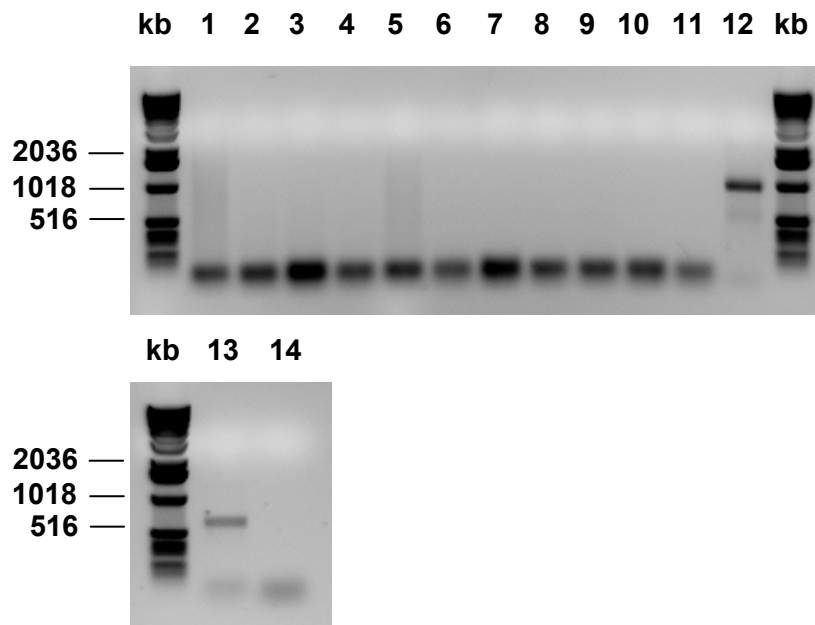
Abb. 28. PCR-Analyse von Klon-RNA. Nachweis des vollständigen DNaseI-Verdau der RNA mittels PCR mit dem Primerpaar Sh2.7/Sh2.6 bei 33 Zyklen. Ansatz Nr.1 wurde mit 0,062 µg RNA von Klon CDS2, Ansatz Nr.2 mit 0.062 µg RNA von Klon CDS11 sowie Ansatz Nr.3 mit 0.062 µg RNA von Klon Δ2 durchgeführt. Als Positivkontrolle wurden 0.85 µg pMash2/CDS eingesetzt (Ansatz Nr.4). Abkürzungen: kb, 1 kb-Leiter; Neg., Negativkontrolle.

In einer RT-PCR mit dem Primerpaar T7/BGHrev wurde kontrolliert, ob in der cDNA die das Mash2-Fragment beidseits flankierenden Vektorsequenzen enthalten waren. BGHrev ist der von der Herstellerfirma (Fa. Invitrogen) empfohlene Primer für die Sequenzierung von stromabwärts gelegenen Abschnitten, die in die MCS kloniert wurden. In allen Experimenten mit diesem Primerpaar ergaben sich nicht-reproduzierbare und unspezifische multiple Banden in der Agarosegel-Elektrophorese.

Dann wurden zunächst PCR-Produkte mittels des Primerpaares Sh2.7/BGH rev aus Klon-cDNA amplifiziert. Diese PCR-Produkte wurden als Vorlage in einer verschachtelten PCR mit dem Primerpaar T7/Sh2.6 eingesetzt. Es konnten keine spezifischen Banden in der

Agarosegel-Elektrophorese für PCR-Produkte aus Klon-cDNA nachgewiesen werden. Da die Spezifität dieser Primer unter den gegebenen Reaktionsbedingungen aus Vorexperimenten bekannt war und der Einsatz von Plasmid-DNA einen positiven Nachweis von Banden in der erwarteten Größe in der RT-PCR ergab, fanden sich keine Hinweise auf eine Expression der Vektorsequenz mit Anteilen der Mash2-Sequenz auf Ebene der RNA in den gewonnenen Klonen (Abb. 29).

A)



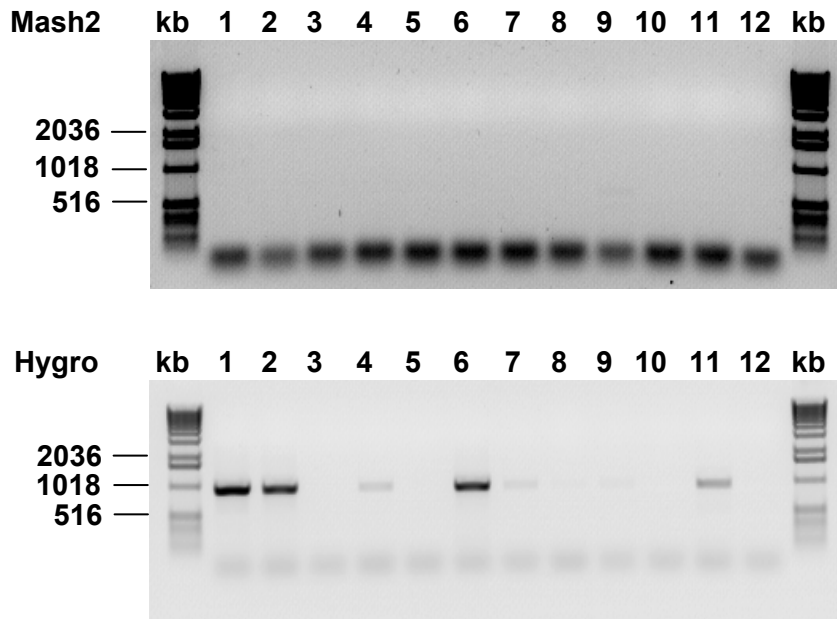
B)

1	PCR-Prod. aus cDNA CDS 2	8	PCR-Prod. aus cDNA CDS 13
2	PCR-Prod. aus cDNA CDS 4	9	PCR-Prod. aus cDNA Δ 1
3	PCR-Prod. aus cDNA CDS 5	10	PCR-Prod. aus cDNA Δ 3
4	PCR-Prod. aus cDNA CDS 7	11	PCR-Prod. aus cDNA Δ 4
5	PCR-Prod. aus cDNA CDS 9	12	pMash2/CDS
6	PCR-Prod. aus cDNA CDS 11	13	pMash2/ Δ
7	PCR-Prod. aus cDNA CDS 12	14	Negativkontrolle

Abb. 29. RT-PCR-Analyse von Klon-cDNA. **A)** Nachweis der fehlenden Amplifikation der Vektorsequenz von pMash2 aus PCR-Produkten (mit dem Primerpaar T7/ BGH rev aus Klon-cDNA generiert). Die PCR wurde mit dem Primerpaar T7/ Sh2.6 bei 30 Zyklen durchgeführt. **B)** Aufgeführt sind die verwendeten cDNAs. Abkürzungen: kb, 1 kb-Leiter.

Im folgenden wurde mit neu etablierten Primerpaaren für die Vektorsequenz mit Mash2-Sequenz sowie das Hygromycin-Resistenzgen gearbeitet. Ein Experiment mit Klon-cDNA und den beiden Primerpaaren ergab, dass zwar das Hygromycin-Resistenzgen in der RNA nachweisbar war, die Mash2-Sequenz der pMash2-Plasmide mit beidseits flankierender Vektorsequenz nicht amplifiziert werden konnte (Abb. 30).

A)



B)

1	cDNA CDS 2	7	cDNA CDS 12
2	cDNA CDS 4	8	cDNA CDS 13
3	cDNA CDS 5	9	cDNA Δ 1
4	cDNA CDS 7	10	cDNA Δ 3
5	cDNA CDS 9	11	cDNA Δ 4
6	cDNA CDS 11	12	Negativkontrolle

Abb. 30. RT-PCR Analyse von Klon-cDNA. **A)** Mash2: Amplifikation der Vektorsequenz von pMash2 aus Klon-cDNA mittels Primerpaar T7/splash2-rev bei 35 Zyklen; Hygro: Amplifikation des Hygromycin-Resistenzgens aus Klon-cDNA mittels Primerpaar Hygro up/Hygro down bei 35 Zyklen. **B)** Dargestellt sind die verwendeten cDNAs. Abkürzungen: kb, 1 kb-Leiter.

Das Gel wurde auf eine Hybond-Membran über Nacht geblottet. Nach UV-Crosslinking mit 1200 μ J und Prähybridisierung wurde eine Mash2-Sonde mit 32 Phosphor radioaktiv markiert und mit dieser der Filter hybridisiert. Bei der Auswertung des Filters mittels eines BAS-Readers zeigte sich eine aktive Doppelbande der Probe des Klons Δ 1 als auch eine Doppelbande beim Klon CDS 2 (Abb. 31).

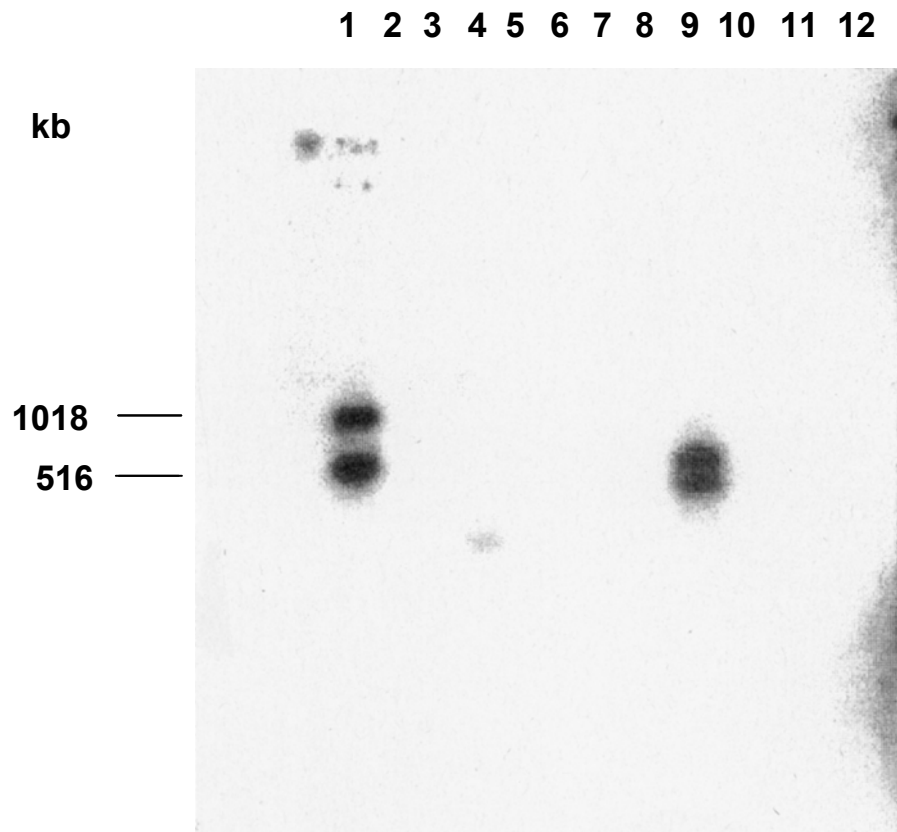
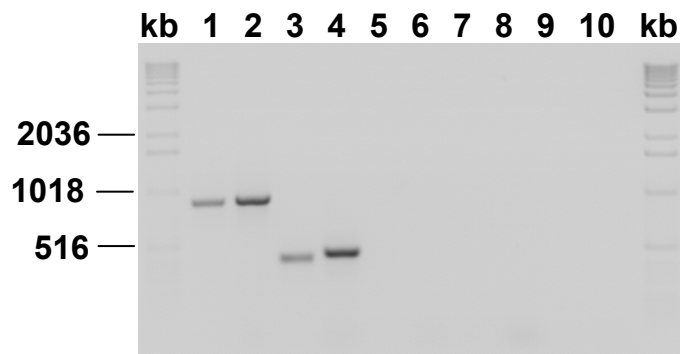


Abb. 31. Southern-Blot von RT-PCR aus Abb. 1 mit Mash2-Sonde. Nachweis von Mash2-Fragmenten in von RT-PCR mit $\alpha^{32}\text{P}$ markierter Mash2-Sonde: positive Doppelbande bei Klon CDS2 sowie Klon $\Delta 1$. Abkürzungen: kb, 1 kb-Leiter.

Um zu belegen, dass eine kurzfristige Überexpression von Mash2 mRNA in der Zelle nach transienter Transfektion möglich ist, wurden Rattenschwanzzellen mit pMash2/CDS und pMash2/ Δ mit FUGENE6 transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen geerntet, die RNA präpariert und nach DNaseI-Verdau eine RT-PCR mit den Primerpaaren Sh2.7/Sh2.6, Sh2.4/Sh2.5 sowie Sh2.2+0/Sh2.3+R und Sh2.4+N/Sh2.5+B durchgeführt. Die Zyklenzahl wurde bewusst niedrig gewählt, um falsch positive Ergebnisse durch endogene Mash2-mRNA zu vermeiden. Es zeigte sich, dass sowohl mRNA der kodierenden Sequenz als auch die der verkürzten Mash2-Sequenz nachweisbar war (Abb. 32).

A)



B)

1	cDNA aus pMash2/CDS transient transfizierten . RSZ	Sh2.7/Sh2.6
2	"	Sh2.2+0/Sh2.3+R
3	cDNA aus pMash2/ Δ transient transfizierten . RSZ	Sh2.4/Sh2.5
4	"	Sh2.4+N/Sh2.5+B
5	cDNA aus RSZ untransfiziert	Sh2.7/Sh2.6
6	"	Sh2.2+0/Sh2.3+R
7	"	Sh2.4/Sh2.5
8	"	Sh2.4+N/Sh2.5+B
9	Negativkontrolle	Sh2.7/Sh2.6
10	"	Sh2.4/Sh2.5

Abb. 32. RT-PCR Analyse von transient transfizierten Rattenschwanzzellen. **A)** In diesem RT-PCR-Experiment erfolgte der Nachweis von rekombinantem Mash2 in der cDNA von transient transfizierten Rattenschwanzzellen mit den Primerpaaren Sh2.7/Sh2.6 (24 Zyklen), Sh2.2+0/Sh2.3+R (28 Zyklen), Sh2.4/Sh2.5 und Sh2.2+0/Sh2.3+R. **B)** Dargestellt sind die verwendeten cDNAs und Primer. Abkürzungen: kb, 1 kb-Leiter.

Es konnte somit lediglich für einen Klon eine mRNA-Expression von Vektorabschnitten nachgewiesen werden, der Teile der trunkierten Mash2-Sequenz enthielt. Bei einem CDS-Klon und einem Δ -Klon zeigten sich positive Banden im Southern-Blot. Eine Transkription des Hygromycin-Resistenzgens konnte hingegen mittels RT-PCR auf mRNA-Ebene gezeigt werden.

4. DISKUSSION

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, die folgenden Fragestellungen zu beantworten:

1. Welche Veränderungen können in der Genexpression von Rattenschwanzzellen, die die kodierende Sequenz sowie eine trunkierte Variante von Mash2 überexprimieren, beobachtet werden?
2. Welche potentielle Rolle spielt Mash2 in der Regulationskaskade der Myelinisierung von Schwanzzellen?
3. Wie verhält sich die Genexpression von Krox20, Krox24, Oct6/SCIP und Mash1 im Vergleich zu Mash2 in kultivierten Rattenschwanzzellen unter verschiedenen Kulturbedingungen?
4. Lassen sich aus dem Regulationsverhalten unter den einzelnen Bedingungen Rückschlüsse auf eventuelle gegenseitige Interaktionen ziehen?
5. Bestehen Parallelen zwischen den Ergebnissen der Zellkultur und bisherigen Erkenntnissen, soweit diese für die jeweiligen Transkriptionsfaktoren bekannt sind?

Der Transkriptionsfaktor Mash2 ist bislang nur in peripheren Nerven in einem Läsionsparadigma nachgewiesen worden (Küry et al., 2001). Im Rahmen dieser Arbeit konnte für Mash2 erstmals eine differenzierte Expression unter verschiedenen Kulturbedingungen beschrieben werden. Die Generierung einer Zelllinie, die die kodierende Sequenz von Mash2 und eine bis auf die DNA-Bindungsdomäne und ein nukleäres Lokalisationssignal verkürzte Variante von Mash2 stabil überexprimiert, war trotz mehrerer Versuche nicht erfolgreich.

Die Analyse der differenziellen Expression und Regulation der Transkriptionsfaktoren Krox20, Krox24, Oct-6/SCIP und Mash1 im Vergleich zum Regulationsverhalten von Mash2 in Rattenschwanzzellen unter verschiedenen Kulturbedingungen erfolgte unter der Annahme, dass verschiedene Wachstumsbedingungen unterschiedlichen Differenzierungsgraden der Zellen entsprechen. Über das Expressionsmuster *in vitro* sollten so Rückschlüsse auf das mögliche Expressionsverhalten und die Bedeutung für die Schwanzzelle *in vivo* gezogen werden.

4.1. EXPRESSIONSPROFILE UNTRANSFIZIERTER RATTENSCHWANZZELLEN UNTER VERSCHIEDENEN KULTURBEDINGUNGEN:

Die Transkriptionsfaktoren Krox20, Krox24, Oct-6/SCIP, Mash1 und Mash2 werden unter verschiedenen Kulturbedingungen in Rattenschwanzzellen differenziell exprimiert. Die

Kultivierung von aufgereinigten postnatalen Rattenschwanzzellen in mit Wachstumsfaktoren oder Serum angereichertem Medium stellt eine Möglichkeit dar, *in vitro* die durch die Gegenwart von Axonen induzierten Differenzierungs- und Proliferationsprozesse partiell zu simulieren (Jessen und Mirsky, 1991). Eine andere Möglichkeit besteht in der Kokultivierung von Neuronen aus Hinterwurzelganglien und Schwanzzellen (Bunge et al., 1986), wobei sich beide Modelle hinsichtlich ihrer Aussagekraft weitgehend ergänzen. In der vorliegenden Arbeit wurde das erste Modell gewählt, da es vergleichsweise einfacher zu handhaben ist, weniger störanfällig ist und bereits im Labor etabliert war.

Der Einfluß verschiedener Kulturbedingungen auf primäre Rattenschwanzzell-Kulturen ist gut bekannt und kann anhand zellmorphologischer Veränderungen und der Proliferationsrate gut beurteilt werden. Insbesondere die Zugabe des die Adenylatzyklase aktivierenden Forskolin (Seamon und Daly, 1986) soll über einen cAMP-Anstieg axonalen Kontakt imitieren und - zumindest teilweise - eine Differenzierung der Schwanzzellen *in vitro* simulieren (Monuki et al., 1989). Forskolin führt zu einer verstärkten Expression der mRNA verschiedener Myelogene, wie PMP22, Proteolipid-Protein (PLP), P₀, P₂, Myelinbasisches Protein (MBP) und Connexin32 (Lemke und Chao, 1988; Monuki et al., 1989; Bosse et al., 1994; Suter et al., 1994; Scherer et al., 1995a; Jiang et al., 2000). Auch die von promyelinisierenden und myelinisierenden Schwanzzellen gebildeten Transkriptionsfaktoren Oct-6/SCIP und Krox20 werden von cAMP induziert (Zorick et al., 1996; Arroyo et al., 1998). Von nicht-myelinisierten oder denervierten Schwanzzellen exprimierte Gene, wie der niedrigaffine NGF-Rezeptor (p75NGFR), BDNF, GAP-43 oder Pax3 werden durch Forskolin gehemmt (Lemke und Chao, 1988; Curtis et al., 1992; Meyer et al., 1992; Scherer et al., 1994b; Kiousi et al., 1995). Zudem konnten kürzlich weitere, durch cAMP modulierte Gene identifiziert werden, die an verschiedenen Signaltransduktionskaskaden beteiligt sind. Diese durch cAMP induzierten Gene umfassen unter anderem *edg-3/LP_{B3}* (aktivierte Phospholipase C → erhöhtes intrazelluläres Calcium → aktivierte MAP/ERK-Kinasekaskade → erhöhtes cAMP), die zytosolische Proteinphosphatase MKP-3 (über ERK-Proteinkinasen) und Ecto-ATPasen. Die durch cAMP in ihrer Expression unterdrückten Gene umfassen den Kaliumkanal K13, CD11c (Integrin α X) und das Unc-33-Homologe Ulip1 (Birmingham et al., 2001).

Neben cAMP steht das membranpermeable Dibutryl-cAMP zur Verfügung (Birmingham et al., 2001). Beide Substanzen verstärken die Wirkung von Mitogenen.

Optimale Wachstumsbedingungen herrschen bei hohen Serum- und Forskolinspiegeln sowie subkonfluenten Zelldichten, worunter die rasch proliferierenden Zellen eine flache und nonpolare Morphologie annehmen. Unter ungünstigeren Kulturbedingungen, wie niedrigen Serum- oder Forskolinspiegeln, verändert sich auch das Erscheinungsbild der Zelle. Die Zellteilung unterbleibt und die Zelle nimmt eine elongierte bi- oder tripolare Form an.

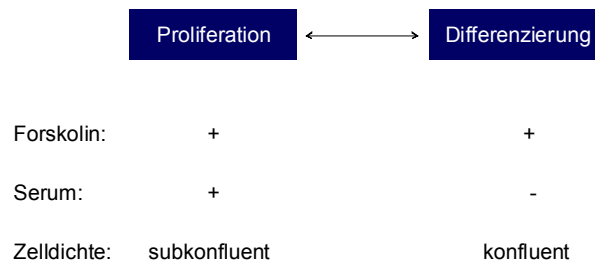


Abb. 33. Proliferation und Differenzierung stellen zwei dichotomische Zustände dar, die durch unterschiedliche Serumspiegel und Zelldichten beeinflusst werden können.

Es konnte gezeigt werden, dass eine konfluente Zelldichte, die Zugabe von Forskolin sowie Serumentzug eine Differenzierung der Schwannzellen in einen myelinisierenden Zelltyp begünstigen, während die Proliferation reduziert ist (Jessen et al., 1991; Morgan et al., 1991; 1994; Cheng und Mudge, 1996). Wird dem Forskolin-enthaltenden Medium wieder Serum hinzugefügt, setzt die Zellteilung ein und die Expression des Myelins P_0 auf Protein- und mRNA-Ebene nimmt deutlich ab (Morgan et al., 1991; 1994). Dies kann als Hinweis auf eine reduzierte Myelinisierung gesehen werden. Bevor Schwannzellen myelinisieren, unterbleibt zudem die Zellteilung (Stewart et al., 1993). Somit stellen Myelinisierung und Zellteilung mit gesteigerter DNA-Synthese zwei dichotomische Zustände dar, die in einer Zelle nicht zeitgleich gemeinsam auftreten (Abb. 33). Dieser Effekt wurde auch in Oligodendrozyten beobachtet (Temple und Raff, 1986; Barres und Raff, 1994). Die Anwesenheit von Forskolin ist in beiden Zuständen wichtig. Hohe Forskolinspiegel erzwingen daher möglicherweise eine Entwicklung der unreifen nicht-proliferierenden Schwannzelle in Richtungen einer myelinisierenden oder einer nicht-myelinisierenden Zelle (Mirsky und Jessen, 2001). Nach Nervenläsionen fällt der cAMP-Spiegel während des Myelinabbaus vorübergehend ab, um im Rahmen der Remyelinisierung gemeinsam mit der induzierten P_0 -Expression wieder anzusteigen (Poduslo et al., 1995).

Aufgrund der Tatsache, dass unterschiedliche Nachweistechiken und cDNA-Präparationen für die semiquantitativen und die quantitativen RT-PCR-Experimente verwendet wurden, ist die Aussagekraft eines direkten Vergleiches zwischen den Profilen, die mittels der semiquantitativen RT-PCR und denen, die mittels quantitativer RT-PCR erstellt wurden, eingeschränkt. Grundsätzlich muss jedoch eine Vergleichbarkeit der Expressionsmuster der jeweiligen Transkriptionsfaktoren unabhängig von diesen experimentellen Unterschieden, postuliert werden.

4.1.1. Krox20

4.1.1.1. Beschreibung des Expressionsprofils:

Die Expression von Krox20 ist unter konfluenten Bedingungen höher als unter subkonfluenten Bedingungen. Es ist ein hemmender Effekt hoher Serumspiegel und niedriger Forskolinspiegel auf die Stärke der Krox20-Expression zu beobachten. Die Expression von Krox20 ist somit umso höher, je stärker das Zellkultur-Milieu Differenzierungsprozesse begünstigt.

4.1.1.2. Vergleich mit anderen Expressionsprofilen:

Im Vergleich mit den Profilen der anderen Faktoren zeigt Krox20 ein Expressionsverhalten, welches in weiten Teilen parallel zu dem von Oct-6/SCIP und Mash2 verläuft, die ebenso unter nonproliferativen Wachstumsbedingungen in der Zellkultur vermehrt nachzuweisen sind.

4.1.1.3. Vergleich der Expressionsdaten mit bekannten Daten:

Die hier gezeigte Forskolinabhängigkeit der Krox20-Expression entspricht früheren Beobachtungen (Zorick et al., 1996). Durch Gabe von TGF β 1 kann dieser Effekt auf die Krox20 mRNA-Expression antagonisiert werden (Awatramani et al., 2002). Nach den Kriterien von Jessen und Mirsky ist Krox20 unter Bedingungen, die eine Zelldifferenzierung begünstigen, besonders stark exprimiert (Jessen et al., 1991). Interessanterweise konnte in einigen Experimenten, in denen Schwanzzellen nach Expansion 3-5 Tage in Vollmedium ohne Forskolinzugabe kultiviert worden waren, im Northern Blot Krox20 nur nach Zugabe von Forskolin nachgewiesen werden (Zorick et al., 1996; Awatramani et al., 2002). Die Datenlage für Studien mit semiquantitativer RT-PCR ist uneinheitlich. In einer Studie wurde Krox20 erst 12 Stunden nach Zugabe von Forskolin in Rattenschwanzzellen exprimiert (Parkinson et al., 2003). Dieser Beobachtung stehen die vorliegenden Ergebnisse, Voruntersuchungen in unserem Labor (Dr. Christian Korfhage) sowie andere Studien entgegen, die eine Krox20-Expression in Rattenschwanzzellen auch unter niedrigen Forskolinkonzentrationen zeigen. So wird Krox20-mRNA in Rattenschwanzzellen auch unter Forskolinentzug gebildet, wenn auch in geringerem Ausmaß als unter cAMP-Aktivierung (Guennon et al., 2001). Mögliche Erklärungen für diese Diskrepanz sind Unterschiede in der tatsächlichen Serumkonzentration, der Dauer der Kultivierung unter den einzelnen Kulturbedingungen nach initialer Expansion, unterschiedliche Schwanzzellpräparationen sowie die unterschiedliche Sensitivität der jeweils eingesetzten Nachweismethoden.

Weitere Daten für die Krox20-Expression sind aus der Analyse transgener Mäuse bekannt. Mausmutanten, die ein Wildtyp-Allel und ein "Null"-Allel für Krox20 tragen, haben einen normalen Phänotyp. Mausmutanten, deren Krox20-Allele beide durch das lacZ-Gen aus

E.coli ersetzt wurden, weisen in der Embryonalphase eine schwere Fehlbildung des Hinterhirns auf, wobei die Defekte dem Rhombomer-spezifischen Expressionsmuster aus frühen Entwicklungsphasen entsprechen und zu einer Fusion der Rhombomeren r3 und r5 führen (Schneider-Maunoury et al., 1993; O'Donovan et al., 1999). Interessanterweise konnte kürzlich Krox20 als Regulator des Connexingens Connexin31 identifiziert werden, welches in der Entwicklung des zentralen Nervensystems in den Rhombomeren r3 und r5 im Hinterhirn von Mäusen exprimiert wird, so dass dieser Krox20-Defekt zumindest teilweise über eine veränderte Connexin31-Expression vermittelt werden könnte (Dahl et al., 1997; Jungbluth et al., 2002).

Zusätzlich treten bei diesen transgenen Tieren schwere Defekte in der Myelinisierung von peripheren Nerven auf. Bei den überlebenden Tieren mit homozygoten Deletionen des Krox20-Gens konnte 10-15 Tage nach der Geburt ein Zittern nachgewiesen werden. Ein histologischer Vergleich der Ischiasnerven von Tieren mit einer homozygoten Deletion und Tieren mit Wildtyp-Allelen ergab, dass die Schwannzellen ihre typische flache Form und ihre gleichmäßige Verteilung längs der Nervenfasern zugunsten einer sphärischen Form mit unregelmäßiger Verteilung der Kerne und Zunahme der Dichte des Zellkerns verloren hatten. Wesentliche Bestandteile des kompakten Myelins, wie Lipide, Myelin-basisches-Protein (MBP), peripheres Myelin-Protein (PMP), Protein 0 (P_0) und das Myelin-assoziierte Fettsäure-Transportprotein P_2 , waren reduziert, während die Spiegel von S-100 und Myelin-assoziiertem Glykoprotein (MAG) nahezu unverändert blieben. Elektronenmikroskopische Analysen von Ischiasnerven der transgenen Mäuse belegen, dass die Axone kaum myelinisiert sind, da sich die Schwannzellen nur anderthalb mal um sie gewickelt haben und die Differenzierung daher in einem sehr frühen Stadium vor der Ausbildung von kompaktem Myelin zum Stillstand kommt. Im ZNS kommt es zu keiner Beeinträchtigung der Myelinisierung, da Krox20 dort nicht exprimiert wird (Topilko et al., 1994; Topilko und Meijer, 2001). Tiere, die für das "Null-Allel" (Krox20 wurde durch das lacZ-Gen aus *E.coli* ersetzt) heterozygot sind, zeigen nach Zugabe von X-Gal eine Anfärbung von unreifen Schwannzellen (Topilko et al., 1994; Murphy et al., 1996; Zorick et al., 1996). Ab dem Tag E10.5 wird Krox20 zunächst nur in einem kleinen Gliazell-Verband nahe dem Neuralrohr, den sogenannten "boundary cap"-Zellen, gebildet, die sich an den Ein- und Austrittsstellen der spinalen und kranialen Nervenwurzeln befinden (Wilkinson et al., 1989; Schneider-Maunoury et al., 1993; Niederlander und Lumsden, 1996; Golding und Cohen, 1997). Zudem kann ab dem Tag E11.5 eine Expression von Connexin31 in diesen sogenannten „boundary cap“-Zellen nachgewiesen werden, die auf sensomotorische und sensorische Neurone beschränkt bleibt. Da Krox20 zuvor als Regulator von Connexin31 beschrieben wurde, erscheint auch hier eine Krox20-vermittelte Induktion der Ausbildung von „boundary cap“-Zellen möglich (Jungbluth et al., 2002). Ab dem Tag E15.5 kann Krox20 in unreifen

Schwanzzellen in den meisten peripheren Nerven nachgewiesen werden (Murphy et al., 1996). Mit voranschreitender Myelinisierung wird lacZ dann in allen myelinisierenden Schwanzzellen gebildet. Die Krox20-Expression erreicht nach der Geburt ein Maximum und hält dann im Verlauf für das restliche Leben an (Zorick et al., 1996; Topilko et al., 1997).

Ähnlich wie Oct-6/SCIP benötigt Krox20 axonalen Kontakt für die Expression, wie in *in vitro* - Studien anhand von Kokulturen aus Spinalganglienneuronen („dorsal root“-Ganglienzellen, DRG) und Schwanzzellen gezeigt werden konnte (Scherer et al., 1994b; Murphy et al., 1996).

Im Vergleich der Daten von Krox20 mit denen von Krox24 zeigt sich ein inverses Regulationsverhalten bei heterozygoten Krox24-"Knockout"-Mäusen (ein Wildtyp-Allel wurde durch das lacZ-Gen aus *E.coli* ersetzt), in denen lacZ nur in einer kleinen Population nicht-myelinisierender Schwanzzellen exprimiert wird. In den vorliegenden Zellkulturexperimenten zeigt sich ebenfalls ein inverses Regulationsverhalten. Unter Zellkulturbedingungen, die günstig für eine Zelldifferenzierung sind, ist analog den Beobachtungen in der Literatur eine verstärkte Expression von Krox20 zu beobachten. Unter Bedingungen, die eher proliferationsfördernd sind, wird Krox24 vermehrt exprimiert. Aufgrund dieses inversen Regulationsverhaltens wurde eine antagonistische Rolle von Krox20 und Krox24 postuliert (Topilko und Meijer, 2001). Beim Vergleich der Literaturdaten mit denen im Rahmen dieser Studie erhobenen Zellkulturdaten muss einschränkend in Betracht gezogen werden, dass die Zustände „Differenzierung“ und „Proliferation“ nicht gleichzusetzen sind mit den Zuständen „myelinisierende“ und „nicht-myelinisierende“ Schwanzzellen. Die Anwesenheit von Forskolin ist einerseits zur Schaffung eines proliferationsfördernden Milieus notwendig (Morgan et al., 1991; 1994), andererseits wirken laut den frühen Studien zur Rolle von cAMP in Schwanzzellen jedoch hohe Forskolinspiegel hemmend auf die in nicht-myelinisierenden Schwanzzellen exprimierten Gene p75NGFR, BDNF, GAP-43 und Pax3 (Lemke und Chao, 1988; Curtis et al., 1992; Meyer et al., 1992; Scherer et al., 1994b; Kioussi et al., 1995), so dass der Zustand „Proliferation“ nicht unmittelbar mit dem Zustand „nicht-myelinisierend“ gleichzusetzen ist. Interessanterweise konnte jedoch kürzlich gezeigt werden, dass nach Transfektion von kultivierten Rattenschwanzzellen mit einem Adenovirus, welcher in den Zielzellen das EGFP-Gen überexprimiert, in der cDNA-Microarray-Auswertung relativ niedrige Expressionsniveaus für Krox20 und die Myelogene MAG, MBP und Periaxin bestanden. L1 und NCAM, die als Marker für nicht-myelinisierende Schwanzzellen gelten, waren hingegen am höchsten exprimiert, während das Expressionsniveau von P₀ zwischen diesen beiden Gruppen lag. Die Befunde bezüglich Krox20 decken sich mit der im Rahmen dieser Studie gemachten Beobachtung, dass Krox20 unter proliferationsfördernden Bedingungen eher niedrig exprimiert wird. Damit gleicht das Aktivierungsmuster dieser unter proliferationsfördernden Bedingungen (Vollmedium mit 10% FKS und 2µM Forskolin)

kultivierten und mit EGFP transfizierten Rattenschwanzzellen teilweise dem von prä- oder nicht-myelinisierenden Schwanzzellen (Nagarajan et al., 2001). Einschränkend muss jedoch betont werden, dass beeinflussende Effekte durch den Vektor selbst oder das EGFP-Gen nicht sicher ausgeschlossen werden können. Angewendet auf die Zellkulturdaten kann daher eine inverse Regulation zwischen Krox20, welches unter differenzierungsfördernden oder myelinisierenden Zuständen, und Krox24, welches unter proliferationsfördernden oder eher nicht-myelinisierenden Zuständen stark exprimiert wird, beobachtet werden. Aufgrund dieses inversen Regulationsverhaltens der beiden Zinkfingerfaktoren wurde die bereits erwähnte antagonistische Regulation der beiden Faktoren durch sich selbst postuliert (Topilko und Meijer, 2001). In Widerspruch dazu stehen neuere Ergebnisse einer Studie, in der eine Adenovirus-vermittelte Überexpression von Krox20 über 24h in Schwanzzellen durchgeführt wurde. Es zeigte sich in der Analyse mittels cDNA-Microarrays eine vermehrte Expression vor allem der Myelogene MAG, P₀, Periaxin, PMP22 and Cx32, während die Expression von L1 und NCAM unverändert geblieben war. Interessanterweise war in der Gruppe der induzierten Transkriptionsfaktoren neben Brn-2 und c-Fos auch Krox24 vertreten. Eine nachfolgende RT-PCR-Analyse ergab, dass myelinbasiertes Protein (MBP) 48h nach Transfektion von Rattenschwanzzellen ebenfalls vermehrt exprimiert wurde (Nagarajan et al., 2001). MBP gilt als später Marker der Myelinisierung und folgt der Expression der übrigen Myelogene in Schwanzzellen (Notterpeck et al., 1999). Die Hypothese, dass Krox20 und Krox24 antagonistisch wirken, kann durch diese Ergebnisse daher nicht unterstützt werden.

Nach Überexpression von Krox20 in Schwanzzellen kommt es darüber hinaus zu einer Induktion des Regulatorproteins NAB2 und einem Regulationsverhalten, das dem nach Nervenläsionen entspricht (Nagarajan et al., 2001). Interessanterweise finden sich zahlreiche Egr-Bindungsstellen im Promotor von NAB1 und NAB2. Zudem liegt bei der einzigen bekannten, rezessiv vererbten Krox20-Mutation mit Polyneuropathie (CHN) eine Mutation in der R1-Domäne von Krox20 vor und verhindert eine Bindung des Krox20-Proteins an NAB-Proteine. Sie stellt damit im Gegensatz zur dominant-negativen Regulation bei den dominant vererbten Neuropathien eine "loss of function"-Mutation dar (Warner et al., 1999). Diese negative Regulation der NAB-Expression durch Krox20 besteht auch im ZNS (Mechta-Grigoriou et al., 2000).

4.1.1.4. Vergleich mit Läsionsexperimenten:

In Läsionsexperimenten mit Ischiasnerven von Ratten ist nach Beifügung einer Quetschverletzung eine Reduktion der Krox20-Expression zu beobachten, die mit voranschreitender Myelinisierung wieder zunimmt (Zorick et al., 1996). Die Myelogene P₀, MAG, Periaxin und MBP folgen dem Anstieg der Krox20-Expression dabei zeitlich verzögert (Nagarajan et al., 2001). Dieses Verhalten lässt sich in den Zellkulturexperimenten

nachvollziehen, in denen Krox20 umso stärker exprimiert wird, je förderlicher das Milieu für eine Zelldifferenzierung ist (niedrige Serumspiegel, konfluente Kulturbedingungen und Forskolinzugabe).

Interessanterweise weicht das Expressionsverhalten von Krox20 im Falle einer Transektion des Nerven vom oben geschilderten Muster ab, da auch 28 Tage postläsional kein Anstieg der Krox20-Expression beobachtet werden kann. Während dies mit einer ausbleibenden Remyelinisierung nach Durchtrennung der Basalmembran und der Bindegewebigen Hüllen, die als Leitschiene im Rahmen der Regeneration dienen, erklärt werden kann, ändert auch eine anschließende Ligatur der Nervenenden nach einer kompletten Transektion diesen Verlauf nicht (Murphy et al., 1996; Zorick et al., 1996; Küry et al., 2001; Küry et al., 2002).

4.1.2. Krox24

4.1.2.1. Beschreibung des Expressionsprofils:

Das Expressionsverhalten von Krox24 weist sowohl unter subkonfluenten als auch unter konfluenten Bedingungen ein gleichartiges Muster auf. Hohe Serumkonzentrationen und Forskolinspiegel führen zu einer verstärkten Expression von Krox24. Günstige Bedingungen für Zellproliferation sind also offenbar mit einer starken Krox24-Expression assoziiert.

4.1.2.2. Vergleich mit anderen Expressionsprofilen:

Krox24 und Mash1 werden ähnlich reguliert. Insbesondere unter proliferativen Bedingungen sind diese Gene induziert. Dagegen wird die Expression von Mash2 und Krox24 invers reguliert.

4.1.2.3. Vergleich der Expressionsdaten mit bekannten Daten:

Zur Rolle von Krox24 im zentralen Nervensystem existieren Beobachtungen in der in der glialen O-2A Vorläufer-Zelllinie CG-4, die als Modell für die Oligodendrozyten-Differenzierung gilt. In dieser Zelllinie nimmt die Krox24 mRNA- und Proteinsynthese mit voranschreitender Differenzierung ab. Dieses Expressionsverhalten wurde auch in Primärkulturen von Oligodendrozyten beobachtet. Eine genauere zeitliche Analyse ergab, dass Krox24 zur Aufrechterhaltung eines undifferenzierten Zellstatus sowie in der frühen Differenzierungsphase eine wesentliche Rolle spielt (Sock et al., 1997).

Zur Rolle von Krox24 im peripheren Nervensystem kann auf zahlreiche *in vivo*- und *in vitro*-Experimente zurückgegriffen werden. "Knockout"-Mäuse, deren Krox24-Gen durch ein eingefügtes lacZ-Gen aus *E. coli* funktionell ausgeschaltet wurde, zeigen Wachstumsdefekte und eine weibliche Infertilität durch hormonelle Anomalien. Diese beruhen auf einem Mangel an der β -Untereinheit des luteinisierenden Hormons (LH- β), welches eine egr-Bindestelle im Promotor enthält (Lee et al., 1996; Topilko et al., 1998; O'Donovan et al., 1999). Im PNS

lassen sich Schwanzzell-Vorläuferzellen von Mäusen, die heterozygot für das "Null"-Allel sind, nach Zugabe von X-Gal anfärben. Am Tag E10.5 kommt es in Hirnnerven und Spinalnerven zur Expression von Krox24. Im weiteren Verlauf kann ab dem Tag E15.5 eine Reduktion der Expression von Krox24 beobachtet werden, die in einer kleinen Subpopulation von Schwanzzellen persistiert. Diese wurden als nicht-myelinisierende Schwanzzellen charakterisiert. Als mögliche Erklärung für dieses Expressionsverhalten wird eine direkte Abhängigkeit zwischen der Krox24-Expression und der Einnahme eines nicht-myelinisierenden Zellstatus diskutiert (Topilko et al., 1997; Topilko und Meijer, 2001).

Interessanterweise gleicht das Expressionsprofil von Krox24 dem von Pax3 stark, weshalb alternativ vermutet werden kann, dass Pax3 in der embryonalen und frühen postnatalen Phase möglicherweise den Übergang von unreifen Schwanzzellvorläufern zu nicht-myelinisierenden Schwanzzellen fördert (Kioussi et al., 1995; Topilko und Meijer, 2001). Krox24 könnte in diesem Zusammenspiel eine proliferationsfördernde und myelinisierungshemmende Wirkung haben, die die Wirkung von Pax3 synergistisch unterstützt.

Aufgrund der Beobachtung, dass Krox20 und Krox24 antagonistisch exprimiert werden, kann darüber hinaus eine gegenseitige Inhibition von Krox20 mit einem Expressionsmaximum in der Differenzierungsphase (im Rahmen der Myelinisierung bei abnehmender Zellproliferation) und Krox24 mit einem Aktivitätsmaximum in früheren Stufen der Entwicklungskaskade (mit hohen Proliferationsraten) und dauerhaft in nicht-myelinisierenden Schwanzzellen postuliert werden (Topilko et al., 1997; Topilko und Meijer, 2001).

Diese Hypothese steht jedoch in Widerspruch zu Erkenntnissen aus neueren Studien. So konnte in cDNA-Array-Experimenten gezeigt werden, dass nach Überexpression von Krox20 neben Myelinenen, wie etwa P₀ und PMP22, auch die Krox24-Expression stimuliert wird (Nagarajan et al., 2001). Zudem konnte gezeigt werden, dass Krox24 auch außerhalb der Population von nicht-myelinisierenden Schwanzzellen exprimiert wird. So konnte in Ischiasnerven von Ratten mittels immunhistochemischer Färbungen eine Kolokalisation von Mash2-Protein und Krox24-Protein gefunden werden, wobei in Einzelfärbungen gegen die beiden Proteine der Anteil der Mash2-positiven Zellen überwog (Küry et al., 2002). Dies ist mit der Beobachtung, dass Krox24 durch Mash2 gehemmt wird, gut vereinbar. Da Mash2 als spezifischer Marker für die Myelinisierung angesehen werden kann, deutet dies auf eine Expression von Krox24 auch ausserhalb von nicht-myelinisierenden Schwanzzellen hin (Küry et al., 2002). Diese Ergebnisse werden unterstützt durch die Beobachtung, dass in einer immunhistochemischen Färbung gegen den niedrigaffinen Rezeptor des Nervenwachstumsfaktors NGF (LNGFR) (Jessen und Mirsky, 1999), der als Marker für nicht-myelinisierende Schwanzzellen gilt, keine Kolokalisation mit Krox24 nachgewiesen werden konnte (Küry et al., 2002). In Anbetracht dieser Ergebnisse muss das von Topilko et al.

(1997) geäußerte Konzept in Frage gestellt werden und davon ausgegangen werden, dass:

1. eine antagonistische Wirkung von Krox20 und Krox24 vor dem Hintergrund der neueren Daten mit einer Induktion von Krox24 durch Krox20 unwahrscheinlich ist.
2. eine Spezifität von Krox24 für nicht-myelinisierende Schwannzellen nicht besteht und Krox24 auch in einigen myelinisierenden Schwannzellen vorgefunden werden kann.

Damit bleibt die tatsächliche Rolle von Krox24 im Rahmen der Schwannzellentwicklung unklar. Denkbar ist jedoch eine rein proliferationsfördernde Wirkung von Krox24. In späteren Entwicklungsstadien könnte - trotz hoher Krox20-Spiegel - eine induzierende Wirkung durch andere inhibitorische Einflüsse, wie etwa Mash2 und mögliche zusätzliche Faktoren, überlagert werden. Die Persistenz der Krox24-Expression in nicht-myelinisierenden Schwannzellen ließe sich mit diesem Ansatz nicht erläutern, wobei auch hier mögliche Interaktionen mit weiteren Faktoren, wie z.B. Pax3, die Krox24-Expression beeinflussen könnten.

Es wurde zudem postuliert, dass LNGFR ein Zielgen von Krox24 ist, da die LNGFR-Expression nach Nervenläsionen mit der von Krox24 korreliert und eine Überexpression von Krox24 das LNGFR-Gen stimuliert, während eine Blockade der Krox24-Expression in Antisense-Experimenten die LNGFR-Expression unterbindet (Nikam et al., 1995). Diese Hypothese konnte jedoch durch neuere Studien widerlegt werden, in denen die LNGFR-Expression durch veränderte Krox24-Spiegel nicht beeinflusst wurde (Küry et al., 2002).

Zusammenfassend bleibt die genaue Rolle von Krox24 in der Entwicklung der Schwannzelle unklar. Die Befunde aus den Zellkulturexperimenten, die eine starke Expression von Krox24 unter proliferativen Kulturbedingungen (hohe Serum- und Forskolinkonzentration) zeigen, lassen sich jedoch mit den bisherigen Erkenntnissen gut vereinbaren.

4.1.2.4. Vergleich mit Läsionsexperimenten:

In Folge einer Nervenläsion durch Quetschung oder Transektion wird Krox24 im Rahmen einer vorübergehenden Entdifferenzierung der Schwannzellen verstärkt exprimiert, um im weiteren Verlauf analog zum Expressionsverhalten in der normalen Entwicklung abzunehmen (Topilko et al., 1997). Dieses Muster entspricht dem Expressionsverhalten von Krox24 unter verschiedenen Zellkulturbedingungen mit einer Induktion durch ein proliferationsförderndes Milieu.

4.1.3. Oct-6/SCIP

4.1.3.1. Zusammenfassung des Expressionsprofils:

Die Oct-6/SCIP-Expression wird positiv durch niedrige Serumkonzentrationen und hohe

Zelldichten beeinflusst. Die Gegenwart von Forskolin hat einen stimulierenden Effekt. Die Oct-6/SCIP-Expression ist daher vor allem unter nonproliferativen Bedingungen hoch.

4.1.3.2. Vergleich mit anderen Expressionsprofilen:

Das Expressionsprofil von Oct-6/SCIP gleicht dem von Krox20. Unter subkonfluenten Wachstumsbedingungen ist eine schwächere Expression von beiden Genen zu beobachten als unter konfluenten Bedingungen. Hohe Serumspiegel und die Abwesenheit von Forskolin verstärken diesen Effekt. Im Vergleich zum Mash2-Expressionsprofil weist das Oct-6/SCIP-Profil ebenfalls Parallelen auf, da beide Gene bei hohen Serumspiegeln schwächer exprimiert werden als unter niedrigen Serumspiegeln.

4.1.3.3. Vergleich der Expressionsdaten mit bekannten Daten:

Während der Entwicklung der peripheren Nerven kommt es zur stadienabhängigen Expression des glialen POU-Domänen-Proteins Oct-6/SCIP. Während Oct-6/SCIP in Neuralleisten-Zellen nicht nachweisbar ist (Blanchard et al., 1996), können in promyelinisierenden Vorläuferzellen die höchsten Spiegel der Oct-6/SCIP-Expression nachgewiesen werden. Dies ist um die Geburt herum der Fall, wenn das Verhältnis zwischen den Axonen und den sie umgebenden Schwanzzellvorläufern 1:1 beträgt (Jaegle et al., 1996; Zorick et al., 1996; Arroyo et al., 1998; Scherer und Salzer, 2001). Mit Voranschreiten der Myelinisierung kommt es dann zur schrittweisen Abnahme der Oct-6/SCIP-Expression. In nicht-myelinisierenden Schwanzzellen ist Oct-6/SCIP nur in sehr geringem Maße nachweisbar, während in reifen Schwanzzellen Oct-6/SCIP nicht nachweisbar ist. Es wurde postuliert, dass die verminderte Expression durch die Reifung des Nerven selbst sowie eine negative Rückkopplung verursacht werden könnte (Jaegle et al., 1996).

Die im promyelinisierenden Stadium zu beobachtende verstärkte Expression von Oct-6/SCIP, die maßgeblich vom axonalen Kontakt abhängt (Scherer et al., 1994a; Murphy et al., 1996), geht der von Krox20 zeitlich voraus (Zorick et al., 1996). Diese Verzögerung beruht auf einer Abhängigkeit der Krox20-Expression von Oct-6/SCIP (Blanchard et al., 1996; Ghislain et al., 2002). So konnte gezeigt werden, dass es *cis*-regulatorische Sequenzen gibt, die - auf axonalen Kontakt angewiesen - sowohl in unreifen als auch in myelinisierenden Schwanzzellen die Krox20-Expression kontrollieren. Dabei agieren die Elemente in den unreifen Schwanzzellen (ISE) als auch diejenigen in den myelinisierenden Schwanzzellen (MSE) unabhängig voneinander und ergeben so das bekannte Expressionsprofil von Krox20 während der Entwicklung des peripheren Nerven. Zudem konnte eine Regulation des 1.3 kb großen MSE-Fragmentes durch Oct-6/SCIP bei multiplen Bindungsstellen für Oct-6/SCIP in diesem Element nachgewiesen werden (Ghislain et al., 2002).

In Zellkulturen mit Rattenschwanzzellen konnte nach einer Induktion durch cAMP eine verstärkte Expression von Oct-6/SCIP sowie eine verminderte Expression von c-jun

beobachtet werden (Monuki et al., 1989). Diese ging der verstärkten Expression der Myelogene Myelin-basisches-Protein (MBP), Protein 0 (P₀), Proteolipid-Protein (PLP), Myelin-assoziiertes Fettsäure-Transportprotein P₂ und Myelin-assoziiertes Glykoprotein (MAG) voraus. Für eine Induktion von Oct-6/SCIP durch cAMP besteht eine positive Dosis-Wirkungs-Korrelation (Monuki et al., 1989). Hierbei wird angenommen, dass der cAMP-Agonist Forskolin teilweise axonalen Kontakt nachahmt und dadurch fördernd auf Differenzierungsprozesse in den kultivierten Schwanzzellen wirkt (Monuki et al., 1990).

Die auch im Rahmen dieser Studie gezeigte Forskolinabhängigkeit der Oct-6/SCIP-Expression entspricht, wie auch bei Krox20, früheren Beobachtungen (Monuki et al., 1989; Lemke et al., 1990; 1991). Wie auch Krox20 kann durch die Gabe von TGFβ1 eine Induktion von Oct-6/SCIP durch Zusatz von cAMP antagonisiert werden (Awatramani et al., 2002). Oct-6/SCIP wird unter Bedingungen, die eine Zelldifferenzierung begünstigen, besonders stark exprimiert (Temple und Raff, 1986; Jessen et al., 1991; Barres und Raff, 1994) und zeigt - wie Krox20 - eine Diskrepanz zwischen den ersten Expressionsstudien mittels Northern Blot und späteren RT-PCR-Analysen. Im Northern Blot ist Oct-6/SCIP in Schwanzzellen, die in Vollmedium ohne Forskolinzusatz kultiviert wurden, nicht nachweisbar (Monuki et al., 1989; Lemke et al., 1990; 1991; Zorick et al., 1996; Awatramani et al., 2002). In RT-PCR-Analysen konnte hingegen eine basale Expression von Oct-6/SCIP in Schwanzzellen nachgewiesen werden, die in Vollmedium ohne Forskolin kultiviert wurden (Sim et al., 2002; Küry et al., 2003). Die Ergebnisse der RT-PCR-Experimente stimmen mit den Beobachtungen, die im Rahmen dieser Arbeit gemacht wurden, überein. Bei hohen Serumkonzentrationen konnte sowohl unter subkonfluenten als auch unter konfluenten Bedingungen bei Forskolinentzug eine zwar abgeschwächte, aber doch deutliche Oct-6/SCIP-Expression mittels semiquantitativer RT-PCR gemessen werden. Eine mögliche Erklärung für die Diskrepanz zwischen den Ergebnissen der RT-PCR- und Northern Blot-Experimente sind vor allem in der unterschiedlichen Sensitivität der Nachweismethoden zu suchen.

Das Regulationsverhalten von Oct-6/SCIP unter verschiedenen Zellkulturbedingungen verläuft analog der geschilderten bisherigen Erkenntnisse. Zum einen ist eine Induktion der Oct-6/SCIP-Expression durch Forskolin unter allen Kulturbedingungen zu beobachten. Zum anderen steigt die Oct-6/SCIP-Expression unter Bedingungen, die differenzierungsfördernd sind (konfluente Zelldichte, niedriger Serumspiegel und Anwesenheit von Forskolin), an, während sie unter proliferationsfördernden Bedingungen abnimmt.

Zur Funktion von Oct-6/SCIP in Rattenschwanzzellen wurde zunächst angenommen, dass Oct-6/SCIP ein Aktivator der Myelogene ist, da diese - nach Induktion durch cAMP - zeitlich versetzt ansteigen. In den folgenden Arbeiten konnte jedoch in Transfektionsexperimenten

gezeigt werden, dass Oct-6/SCIP in Schwanzzellen als Repressor der Myelengene agiert und die Induktion der Myelengene durch andere Faktoren verursacht werden muss (Monuki et al., 1990; Monuki et al., 1993). Weitere Erkenntnisse zur Rolle von Oct-6/SCIP wurden mittels Mausmutanten gewonnen. Homozygote "Knockout"-Mäuse, die durch Einfügen des bakteriellen β -Galaktosidase-Gens in das Oct-6/SCIP-Gen generiert wurden, zeigen eine verzögerte Differenzierung von Schwanzzellen, während heterozygote Tiere keine Veränderung der Oct-6/SCIP-Expression zeigen. Trotz einer normalen Entwicklung starben die meisten homozygoten "Knockout"-Mäuse kurz nach der Geburt an einer Ateminsuffizienz, die durch eine falsche Differenzierung von Neuronen bedingt wird, die in den respiratorischen Kerngebieten liegen (Bermingham et al., 1996). In überlebenden Tieren kommt die Myelinisierung im Stadium der Promyelinisierung zum zeitweisen Erliegen. Die Nervenentwicklung ist deshalb um etwa zwei Wochen verzögert. In Tieren, die das Erwachsenenalter erreichen, ist lediglich die mittlere Myelindichte im Vergleich zum axonalen Durchmesser vermindert. Eine Veränderung des Myelinisierungsverhaltens von Oligodendrozyten bei homozygoten Oct-6/SCIP-defizienten Mäusen konnte nicht nachgewiesen werden (Bermingham et al., 1996; Jaegle et al., 1996). Es wird daher vermutet, dass die mit Oct-6/SCIP eng verwandten und in Oligodendrozyten exprimierten POU-Klasse III Faktoren Brn-1 und Brn-2 mit einem vergleichbaren Expressionsprofil und ähnlichen DNA-Bindungseigenschaften Teil einer redundanten Regulationskaskade sind und Oct-6/SCIP daher nicht alleine für die Myelinisierung verantwortlich ist (Schreiber et al., 1997).

Für Brn-2 konnte gezeigt werden, dass es in Schwanzzellen während der Entwicklung in vergleichbarer Weise wie Oct-6/SCIP exprimiert und reguliert wird. Zudem konnte es mittels immunhistochemischer Färbungen in den Zellkernen von Rattenschwanzzellen nachgewiesen werden. In Oct-6/SCIP-defizienten Mausmutanten war die Konzentration von Brn-2 in den Schwanzzellen im Vergleich zum Wildtyp erhöht, so dass von einer negativen Regulation von Brn-2 durch Oct-6/SCIP ausgegangen werden kann, während eine Aktivierung der Brn-2-Expression unabhängig von Oct-6/SCIP erfolgt. Diese Regulation wird vermutlich über bisher unbekannte transkriptionelle und posttranskriptionelle Mechanismen vermittelt. Durch eine gezielte Überexpression von Brn-2 in Oct-6/SCIP-defizienten Schwanzzellen konnte zudem die Zahl der myelinisierenden Schwanzzellen gesteigert werden, so dass es zu einer teilweisen Rückbildung der Entwicklungsverzögerung und des Phänotyps der Oct-6/SCIP-defizienten Mausmutante kam. Dieser Prozess wird durch die Expressionsrate von Brn-2 limitiert. Ein Verlust von Brn-2 alleine führte zu keiner signifikanten Entwicklungsverzögerung oder Pathologie des peripheren Nerven. Eine kombinierte Deletion von Oct-6/SCIP und Brn-2 bewirkte jedoch eine im Vergleich zur alleinigen Deletion von Oct-6/SCIP stärker ausgeprägte Differenzierungsblockade mit

Hypomyelinisierung. Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass Brn-2 - ähnlich wie Oct-6/SCIP - den Übergang von promyelinisierenden zu myelinisierenden Schwanzzellen fördert (Jaegle et al., 2003). Die Überlappung der beiden Faktoren hinsichtlich ihrer funktionellen Bedeutung wurde außerhalb des peripheren Nervensystems innerhalb der POU-Familie für Brn-1 und Brn-2 in der Entwicklung kortikaler Neurone (Mcevilly et al., 2002; Sugitani et al., 2002) sowie für Oct-6/SCIP und Skn-1a/i in der Differenzierung epidermaler Keratinozyten vorbeschrieben (Andersen et al., 1997).

Weitere Erkenntnisse über die biologische Funktion von Oct-6/SCIP stammen aus der Analyse von Mausmutanten, die eine aminoterminal um 141 Aminosäuren verkürzte Mutante von Oct-6/SCIP unter der Kontrolle des P₀-Promotors exprimieren (P₀ΔOct-6/SCIP). Diese Tiere weisen ein geringeres Körpergewicht als die Wildtyp-Tiere, einen früheren Beginn der Myelinisierung sowie eine Hypermyelinisierung von Nervenfasern mit einem reduzierten axonalen Durchmesser auf (Weinstein et al., 1995). Bei gleichen absoluten Nervenleitgeschwindigkeiten in Mausmutanten und normalen Tieren liegt die relative Nervenleitgeschwindigkeit in den Mutanten aufgrund des niedrigeren axonalen Durchmessers höher. Zudem zeigen diese Tiere nach Nervenläsion eine verstärkte Regeneration mit Hypermyelinisierung und axonaler Hypertrophie im Sinne einer peripheren Neuropathie, was als Ausdruck einer transkriptionell aktivierenden Wirkung des verkürzten Oct-6/SCIP-Proteins zusammen mit dem endogenen Oct-6/SCIP-Protein angesehen wird (Weinstein et al., 1995; Gondre et al., 1998).

Zusammenfassend scheint eine balancierte Expression von Oct-6/SCIP in promyelinisierenden Zellen für eine intakte Entwicklung der Nervenzelle sowie für Regenerationsprozesse essentiell zu sein (Jaegle et al., 1996). Eine wichtige Rolle nehmen in diesem Zusammenhang mögliche Zielgene von Oct-6/SCIP ein, unter denen vor allem Oct-6/SCIP selbst sowie Krox20 vermutet werden. Dies basiert auf der Beobachtung, dass homozygote "Knockout"-Mäuse für Oct-6/SCIP und Krox20 im Stadium der promyelinisierenden Zellen verharren (Topilko et al., 1994) und die Krox20-Expression in homozygoten Oct-6/SCIP-"Knockout"-Mäusen verzögert ist, während dies umgekehrt in Krox20-"Knockout"-Mäusen nicht der Fall ist (Zorick et al., 1999; Topilko und Meijer, 2001). Ein möglicher Ansatzpunkt einer Regulation von Krox20 durch Oct-6/SCIP sind Octamer-Sequenzen im Krox20-Promotor. Im Fall von Oct-6/SCIP könnten hingegen autoregulatorische Regelkreise für die verminderte Expression von Oct-6/SCIP selbst verantwortlich sein. Weitere gliale Faktoren, die auf diese Regulationskaskade in Schwanzzellen und Oligodendrozyten einwirken, sind die Sry-Box Proteine Sox2, Sox10 und Sox11. In Schwanzzellen kommt es bei gleichzeitiger Bindung von Sox10 und Oct-6/SCIP an einen künstlichen Enhancer zu einer synergistischen transkriptionsaktivierenden Wirkung. In Oligodendrozyten ist eine ähnliche synergistische Wirkung zwischen Sox11 und Brn-1 sowie

Brn-2 zu beobachten, während Oct-6/SCIP und Sox-11 keine synergistischen Wechselwirkungen aufweisen. Dies deutet auf eine kooperative Wirkungsweise von Sox- und POU-Proteinen in der Myelinisierung hin (Kuhlbrodt et al., 1998a; Kuhlbrodt et al., 1998b).

Die Rolle von Oct-6/SCIP in Schwannzellen kann mit folgender Hypothese zusammenfassend charakterisiert werden: Oct-6/SCIP nimmt eine stadienspezifische Rolle ein, indem es als Aktivator in promyelinisierenden Zellen wirkt und dort nach axonalem Kontakt eine Gruppe von Zielgenen stimuliert, die Krox20 enthält, und damit den Übergang von der promyelinisierenden Zelle in die eine myelinisierende Zelle vermittelt. In der myelinisierenden Zelle wirkt es dann als Repressor von anderen Genen und sich selbst, je weiter die Myelinisierung voranschreitet (Jaegle und Meijer, 1998; Topilko und Meijer, 2001).

4.1.3.4. Vergleich mit Läsionsexperimenten:

Nach einer Quetschläsion eines peripheren Nerven bricht der axonale Kontakt im Rahmen der Waller'schen Degeneration ab. Da Oct-6/SCIP in myelinisierten Schwannzellen kaum exprimiert wird, erfährt die Oct-6/SCIP-Expression im Rahmen der zunächst erfolgenden degenerativen Effekte keine Veränderung. Mit einem Einwachsen des Axons in den distalen Nervenstumpf gegen den 10. Tag nach Läsion kommt es dann jedoch zu einer Aktivierung von Oct-6/SCIP. Im Verlauf kann Oct-6/SCIP für einen Zeitraum von bis zu zwei Monaten auf niedrigem Niveau nachgewiesen werden, was darauf hindeutet, dass im Rahmen der Regenerationsprozesse nach Nervenläsion zwar die Nervenentwicklung im wesentlichen rekapituliert wird, diese beiden Vorgänge jedoch nicht vollständig identisch ablaufen. Nach einer kompletten Transektion wird eine Regeneration mit konsekutivem Ausbleiben eines erneuten Anstiegs von Oct-6/SCIP verhindert (Scherer et al., 1994a; Zorick et al., 1996; Arroyo et al., 1998; Topilko und Meijer, 2001). Diese Beobachtung kann im Zellkulturmodell nachempfunden werden. Unter dedifferenzierenden Bedingungen kommt es zur Abnahme der Oct-6/SCIP-Expression, die in einem differenzierungsfördernden Milieu hoch ist.

4.1.4. Mash1

4.1.4.1. Zusammenfassung des Expressionsprofils:

Auch wenn die Profile für subkonfluente und konfluente Bedingungen nicht völlig deckungsgleich sind, so fördern eine hohe Zelldichte und hohe Serumkonzentrationen die Mash1-Expression. Die Rolle von Forskolin auf das Expressionsverhalten lässt sich anhand der hier vorliegenden Ergebnisse nicht sicher festlegen.

4.1.4.2. Vergleich mit anderen Profilen:

Das Expressionsprofil von Mash1 gleicht dem von Krox24, da bei beiden Profilen eine starke Induktion durch hohe Serumspiegel besteht. Die Vergleichbarkeit ist jedoch durch die unklare Rolle von Forskolin auf das Expressionsprofil von Mash1 eingeschränkt. Zudem scheint Mash1 unter konfluenten Bedingungen stärker exprimiert zu sein.

4.1.4.3. Vergleich der Expressionsdaten mit bekannten Daten:

Mash1 ist im peripheren Nervensystem als wesentliches Element zusammen mit Neurogenin in der neuralen Differenzierung in Vertebraten bekannt. Im Rahmen dieser Studie konnte Mash1 zum ersten Mal in kultivierten Rattenschwanzzellen nachgewiesen werden und eine differenzielle Regulation unter verschiedenen Kulturbedingungen aufgewiesen werden. Während weitere Informationen über die Rolle von Mash1 in Schwanzzellen bisher nicht existieren, wurde kürzlich gezeigt, dass Mash1 in Oligodendrozyten auf mRNA- und Proteinebene gebildet wird (Kondo und Raff, 2000a; 2000b; Wang et al., 2001). In Transfektionsstudien mit anschließender cDNA-Microarrayanalyse kam es weder nach Überexpression von Krox20 noch nach Überexpression von Mash2 zu einer Induktion oder Suppression von Mash1 (Nagarajan et al., 2001; Küry et al., 2002). Auch wenn das Expressionsverhalten Parallele zu dem von Krox24 aufweist, so kann über eine mögliche Rolle in der Entwicklung der peripheren Nerven nur spekuliert werden. So ist zwar bekannt, dass Mash1 postläsional in Rattenschwanzzellen exprimiert wird, doch erscheint aufgrund der fehlenden Regulation eine wesentliche Rolle von Mash1 in der Myelinisierung unwahrscheinlich. Dies entspricht Studien an Oligodendrozyten-Vorläuferzellen *in vivo*, bei denen weder eine regulierende Wirkung von Mash1 auf die Zellproliferation oder -differenzierung nachgewiesen werden konnte noch auf die zeitliche Koordination der Zelldifferenzierung (Wang et al., 2001).

Weitere Erkenntnisse über eine mögliche Funktion von Mash1 im peripheren Nervensystem stammen aus der Suche nach Interaktionspartnern. Als transkriptioneller Repressor von Mash1 konnte Hairy/enhancer of split homologue-1 (HES-1) identifiziert werden, welches neben eHAND und dHAND ebenfalls zur Gruppe der bHLH-Proteine gehört (Sasai et al., 1992; Cross et al., 1995; Cserjesi et al., 1995; Hollenberg et al., 1995; Chen et al., 1997; Jögi et al., 2002). Für die Rolle von HES-1 im zentralen Nervensystem wurde postuliert, dass eine verminderte Expression für die Differenzierung von hippocampalen Neuronen verantwortlich ist, die durch Wachstumsfaktoren induziert wird und durch Mash1 vorangetrieben wird (Castella et al., 1999). HES-1 bindet an den Mash1-Promotor und unterbindet die Mash1-Expression durch zwei Mechanismen: zum einen durch DNA-Bindung und anschließende Rekrutierung des Korepressors enhancer of split, zum anderen durch eine verminderte

Dimerbildung zwischen E-Proteinen und anderen bHLH-Proteinen, wie Mash1 (Sasai et al., 1992). Dieser Mechanismus weist Ähnlichkeiten zu dem, der bei Id-Proteinen beobachtet wurde, auf (Benezra et al., 1990; Christy et al., 1991; Sun et al., 1991; Riechmann et al., 1994). Diese Inhibitoren der Differenzierung bilden als dominant-negative Repressoren ohne eigene DNA-Bindungsdomäne inaktive Dimere mit bHLH-Proteinen, vor allem mit den ubiquitären E-Proteinen (Norton, 2000; Jögi et al., 2002). Id-Proteine werden während der Entwicklung des Nervensystems differentiell exprimiert (Riechmann und Sablitzky, 1995; Jen et al., 1996) und scheinen in der frühen Entwicklung der neuralen Zelllinie sowie der zellspezifischen Differenzierung eine wesentliche Rolle zu spielen (Martinsen und Bronner-Fraser, 1998). In differenzierenden Neuroblastom-Zellen, die Eigenschaften von sympathischen Neuroblasten aufweisen, ist die Expression des humanen achaete-scute Homologen (Hash1) vermindert, während HES-1 verstärkt exprimiert wird. Bei einer chemisch induzierten Differenzierung dieser Zellen kommt es zur verminderten Expression der Id-Proteine Id1-Id3. Die Id-Proteine, insbesondere Id2, können HES-1 komplexieren, welches wiederum die Komplexbildung von Id2 und E2 stört (Jögi et al., 2002). Diese komplexen Interaktionen der bHLH-Proteine untereinander sind im Nervensystem bislang vor allem in Differenzierungsprozessen von Neuronen oder Oligodendrozyten beschrieben worden.

In Schwanzzellen konnten neben anderen bHLH-Proteinen alle vier bekannten Id-Proteine nachgewiesen werden (Stewart et al., 1997). Interessanterweise zeigt sich während der Schwanzzellentwicklung, dass die Expressionsprofile von Id1 und Id3 invers zu denen von Id2 und Id4 reguliert werden. Während Id1 und Id3 in der frühen Entwicklungsphase des Nerven am 10. Tag kaum exprimiert werden, ist im adulten Nerven eine starke Expression zu beobachten. Id2 und Id4 weisen - zusammen mit dem Myelinprotein P₀ - hingegen in der frühen Nervenentwicklung eine hohe Aktivität auf, die im adulten Nerv abnimmt. Nach Durchtrennung eines peripheren Nerven fällt das Expressionsniveau von P₀ stark ab, während eine Aktivierung von Id1 und Id3 einsetzt. Id1 wird dabei stärker induziert als Id3, wobei Id3 - länger als Id1 - für mindestens 3 Wochen vermehrt exprimiert wird. In nativen Rattenschwanzzellen waren auf mRNA-Ebene Id1 und Id3 stark exprimiert, während die Expression von Id2, Id4 und P₀ nur auf niedrigem Niveau erfolgte. Nach Zugabe von cAMP zeigte sich ein reziprokes Regulationsverhalten mit einem Anstieg der Expression von P₀ und Id2, während die Id1- und Id3-Expression stark abnahm. Sowohl Id1 als auch Id3 waren starke Repressoren des P₀- und des MBP-Promotors. Nukleäre Faktoren, die aus kultivierten Schwanzzellen und peripheren Nerven gewonnen wurden, banden an drei verschiedene E-Box-Motive im P₀-Promotor (Thatikunta et al., 1999). Zusammenfassend wurde für die Rolle von Id-Proteinen in Schwanzzellen postuliert, dass die Myelingenexpression über die Paare Id1/Id3 und Id2/Id4 beeinflusst werden kann. Während die Proteine Id2/Id4 während der

Myelinisierung *in vivo* und einer cAMP-induzierten Differenzierung *in vitro* mittels Ausbildung von Heterodimeren eine Aktivierung der Myeligenexpression bewirken soll, könnten im Rahmen einer Nervenläsion *in vivo* oder einer Mitogenbehandlung *in vitro* Id1 und Id3 die Ausbildung von Heterodimeren fördern, die nicht an eine E-Box binden können (Thatikunta et al., 1999).

Es bleibt künftigen Studien vorbehalten, die Interaktionen dieser Faktoren in Schwanzzellen sowie *in vivo* weiter zu analysieren und zu überprüfen, ob sie an der Regulation von Mash1 in Schwanzzellen in ähnlicher Weise beteiligt sind. Auch die Rolle von Notch1 im Rahmen dieser Regulationsprozesse bedarf einer weiteren Klärung. Notch1 führt nicht nur über Transaktivierung von HES-1 zur verminderten Expression von Hash1 auf mRNA-Ebene, sondern auch über eine posttranslationale Modifikation zu einer Proteasomen-abhängigen Proteolyse von Hash1-Proteinen (Sriuranpong et al., 2002).

4.1.4.4. Vergleich mit Läsionsexperimenten:

Es konnte gezeigt werden, dass Mash1 auf Ebene der mRNA in Ischiasnerven nachgewiesen werden kann, postläsional jedoch keine transkriptionelle Regulation aufweist (Küry et al., 2001). Damit ist ein Vergleich mit den Ergebnissen der kultivierten Schwanzzellen nicht möglich.

4.1.5. Mash2

4.1.5.1. Zusammenfassung des Expressionsprofils:

Niedrige Serumkonzentrationen und Forskolinspiegel führen zu einem Anstieg der Mash2-Expression sowohl unter subkonfluenten als auch unter konfluenten Kulturbedingungen. Je weniger proliferationsfördernd die Kulturbedingungen sind, desto höher ist die Mash2-Expression.

4.1.5.2. Vergleich mit anderen Expressionsprofilen:

Mash2 zeigt damit ein Expressionsprofil, welches in weiten Teilen dem von Oct-6/SCIP und Krox20 vergleichbar ist. Insbesondere unter nonproliferativen Wachstumsbedingungen in der Zellkultur ist die Mash2-Expression hoch. Abweichend davon ist bei Mash2 keine Induktion durch Forskolin zu beobachten. Die Expressionsprofile von Mash2 und Krox24 verlaufen invers.

4.1.5.3. Vergleich der Expressionsdaten mit bekannten Daten:

Während bislang keine Studien zur entwicklungsabhängigen Expression von Mash2 im peripheren Nervensystem vorliegen, konnte Mash2 kürzlich erstmals in Rattenschwanzzellen nachgewiesen werden und im Rahmen dieser Studie erstmals eine differenzielle Regulation

in Rattenschwanzzellkulturen unter verschiedenen Kulturbedingungen aufgezeigt werden (Küry et al., 2001; Küry et al., 2002).

Mash2-Expressionsstudien *in vitro* und *in vivo* ergaben, dass Mash2 in embryonaler Plazenta, in embryonalen Schwanzzellen sowie in Mash2-überexprimierenden COS-7-Zellen mittels eines rattenspezifischen Antikörpers im Western-Blot mit einer Bande bei etwa 38 kDa nachgewiesen werden kann. In immunhistochemischen Färbungen von Ratten-Ischiasnerven gegen Mash2 wurden Schwanzzellen sowie endotheliales Gewebe angefärbt. Durch Kombination mit einer Färbung gegen das Strukturprotein S100 konnte Mash2 spezifisch in Schwanzzellen peripherer Nerven nachgewiesen werden. Die genauere Lokalisation mittels Kernfärbungen mit Sybr Green und Mash2-Antikörpern ergab in der konfokalen Lasermikroskopie, dass der Großteil des Mash2-Proteins im Zellkern der Schwanzzellen lokalisiert und nur ein kleiner Teil extranukleär nachzuweisen war. Diese Ergebnisse ließen sich auch in kultivierten Rattenschwanzzellen reproduzieren, wobei die Bedeutung der extranukleären Mash2-Ansammlung noch unklar ist. Ähnlich wie bei Krox24 könnte eine posttranslationale Regulation durch „Proteinshuttling“ hierfür verantwortlich sein (Topilko et al., 1997; Küry et al., 2002). Eine gleichzeitige immunhistochemische Anfärbung von Schwanzzellen mit Antikörpern gegen Mash2-Protein und das in nicht-myelinisierenden Schwanzzellen nachweisbare LNGFR-Protein, welches als möglicher Interaktionspartner von bHLH-Proteinen diskutiert wird (Chiamarello et al., 1995), war nicht möglich. Es konnte jedoch eine Koexpression von Mash2 und Krox20 in Ischiasnerven von Ratten gezeigt werden. Da eine Regulation von Krox20 durch Mash2 und umgekehrt nicht nachgewiesen werden konnte, scheint diese Koexpression nicht auf einer Interaktion der beiden Faktoren untereinander zu beruhen (Küry et al., 2002). In Zusammenschau dieser Befunde konnte Mash2 als ein neuer Transkriptionsfaktor im peripheren Nervensystem identifiziert werden, der spezifisch für myelinisierende Schwanzzellen ist.

In Zellkulturexperimenten unter verschiedenen Kulturbedingungen, die im Rahmen dieser Studie erstellt wurden, zeigen Mash2 und Krox24 interessanterweise ein inverses Regulationsverhalten. Liegen optimale Proliferationsbedingungen bei hohen Serum- und Forskolinspiegeln vor, so ist die Expression von Krox24 am höchsten, die von Mash2 jedoch am geringsten. Bei maximal nonproliferativen Zellkulturbedingungen mit niedrigen Serum- und Forskolinspiegeln stellt sich ein inverses Bild dar. Dieses gegenläufige Regulationsverhalten unter den verschiedenen Zellkulturbedingungen wirft die Frage auf, ob zwischen diesen beiden Faktoren eine direkte Interaktion besteht. Krox24 kann, wie bereits beschrieben, im wesentlichen in embryonalen Vorläuferzellen, in unreifen Schwanzzellen postnatal, in nicht-myelinisierenden Schwanzzellen sowie in einigen myelinisierenden Schwanzzellen nachgewiesen werden (Zorick et al., 1996; Zorick et al., 1999; Topilko und Meijer, 2001; Küry et al., 2002). Auch wenn für Mash2 keine Expressionsstudien im Verlauf

der Myelinisierung existieren, so ist aufgrund der Expressionsprofile nach Nervenläsionen eine erhöhte Mash2-Aktivität eher in myelinisierenden und reifen Schwanzzellen zu erwarten (Küry et al., 2001). Die hier implizierte mögliche antagonistische Regulation konnte mittels transienter Überexpression von Mash2 in Rattenschwanzzellen und anschließender Hybridisation der radioaktiv markierten cDNA auf Genexpressions Array-Filter bestätigt werden. Dabei zeigte sich, dass die Überexpression von Mash2 zu einer Reduktion der Krox24-Expression führt, wodurch Mash2 als übergeordneter Regulator von Krox24 identifiziert werden konnte. Über die mögliche Funktion kann nur spekuliert werden. Interessanterweise wird Krox24 jedoch vor allem unter proliferativen Bedingungen vor allem von unreifen prämyelinisierenden Schwanzzellen exprimiert. Mash2 hingegen ist in einem differenzierungsfördernden Milieu stark nachweisbar. Zusammen mit den Ergebnissen aus Läsionsexperimenten kann somit ein Expressionsmaximum im myelinisierenden Entwicklungsstadium postuliert werden. Nach dieser Beobachtung könnte Krox24 als wesentlichen Faktor für die frühe Schwanzzellentwicklung, insbesondere die Zellproliferation, verantwortlich sein, während Mash2 eher für die Aufrechterhaltung eines myelinisierenden Zelltyps verantwortlich wäre, auch wenn, wie bereits für Krox24 näher ausgeführt, eine Beschränkung von Krox24 auf nicht-myelinisierende Schwanzzellen widerlegt werden konnte.

Mit dem gleichen experimentellen Ansatz der Überexpression von Mash2 in kultivierten Rattenschwanzzellen und anschließender Auswertung mittels cDNA Expressions-Array konnten zwei weitere untergeordnete Bindungspartner von Mash2 identifiziert werden: Mob-1 und der Chemokinrezeptor CXCR4 (Küry et al., 2002).

Das α -Chemokin Mob-1 ist das Ratten-Homologe von IP10 im Menschen und dem murinen CRG2 (Liang et al., 1994) und bindet an den CXCR3-Rezeptor. Zudem wirkt es als Entzündungsmediator nach Infekten oder Verletzungen und zieht Monozyten und aktivierte T-Lymphozyten an (Taub et al., 1993; Farber, 1997). Beim Menschen konnte eine erhöhte IP-10-Expression bei Erkrankungen des zentralen Nervensystems nachgewiesen werden: der Multiplen Sklerose (Simpson et al., 2000) und der fokalen cerebralen Ischämie (Wang et al., 1998). In Rattenschwanzzellen konnte in Genexpressions Array-Experimenten und mittels quantitativer RT-PCR eine verminderte Expression nach Überexpression von Mash2 beobachtet werden. Darüberhinaus konnte mittels Immunfluoreszenzfärbungen und *in situ* Hybridisierungen eine zelluläre Kolo-kalisation der CXCR4- und Mash2-Expression in kultivierten Rattenschwanzzellen sowie in Ischiasnerven gezeigt werden. Nach einer Quetschläsion des N. ischiadicus in Ratten konnte ein transienter Anstieg der Mob-1-Konzentration mit einem Maximum etwa 7 Tage postläsional nachgewiesen werden. Diese Beobachtungen deuten auf eine Rolle von Mob-1 in degenerativen Prozessen nach Nervenläsionen hin, die wesentliche Voraussetzung für Regeneration darstellen. Mash2

kann somit über die Regulation des proinflammatorischen Zytokins Mob-1 als möglicher Mediator einer posttraumatischen Immunantwort angesehen werden (Küry et al., 2002).

Der murine Chemokinrezeptor CXCR4 (Nagasawa et al., 1996) entspricht Fusin, einem humanen Korezeptor für den Eintritt von HIV1-Viren in die Zielzellen. Das α -Chemokin SDF-1 wirkt chemoattraktiv auf Lymphozyten und ist ein Ligand von CXCR4. Es kommt bei Bindung von SDF-1 an CXCR4 zur Aktivierung von CXCR4 und zur Blockade des Eindringens von HIV1 in die Zielzelle (Bleul et al., 1996; Nagasawa et al., 1996). Die genaue Funktion dieser Signalkaskade ist derzeit unklar, wobei eine Rolle in der B-Zelldifferenzierung, eine chemoattraktive Wirkung auf T-Zellen und eine induzierende Wirkung auf die neuronale Apoptose diskutiert wird (Nagasawa et al., 1996; Aiuti et al., 1997; Hesselgesser et al., 1998). Von SDF1 sind drei Spleißvarianten bekannt, die als SDF-1 α , - β und - γ bezeichnet werden. Diese Varianten von SDF-1 konnten unter anderem auch in Strukturen des zentralen Nervensystems (Oligodendrozyten und adulte Neurone) sowie des peripheren Nervensystems (Schwannzellen) nachgewiesen werden (Gleichmann et al., 2000). CXCR4 selbst wurde im peripheren Nervensystem nach transients Überexpression von Mash2 in Rattenschwannzellen und anschließender Hybridisation der radioaktiv markierten cDNA auf einen Genexpressions Array-Filter verstärkt exprimiert. Diese Induktion von CXCR4 durch Mash2 konnte mittels quantitativer RT-PCR bestätigt werden. In einer *in situ* Hybridisierung und Immunfluoreszenzanalysen konnte zudem eine zelluläre Kolo-kalisation der Mash2- und CXCR4-Expression sowohl in kultivierten Rattenschwannzellen als auch in Ischiasnerven nachgewiesen werden. Nach einer Quetschverletzung des N. ischiadicus in Ratten konnte nach zwei Tagen eine transient verminderte CXCR4-Expression nachgewiesen werden, die mit einer verminderten Expression des transkriptionellen Regulators Mash2 korreliert. Interessanterweise konnte nach einem Zeitraum von drei Wochen nach einem Anstieg zum 7. postläsionalen Tag hin erneut ein Abfall der CXCR4-Expression nachgewiesen werden. Dies legt die Anwesenheit möglicher weiterer Regulatoren, die im Rahmen des Regenerationsprozesses aktiv werden, nahe (Küry et al., 2002). Der Nachweis des Liganden SDF-1 sowie einer durch Mash2 regulierten Expression von CXCR4 in Rattenschwannzellen deuten auf eine mögliche Funktion jenseits immunologischer Wirkmechanismen im Bereich der Schwannzell-differenzierung, -proliferation und Nervenregeneration hin. Auch der CDK-Inhibitor p57kip2 wird durch Mash2 reguliert, worauf im weiteren Verlauf näher eingegangen wird (Küry et al., 2002).

Zusammenfassend kann Mash2 als übergeordneter Regulator von Krox24, Mob-1, CXCR4 und p57kip2 angesehen werden, auch wenn eine direkte Regulation nicht gezeigt werden konnte. Für diese unmittelbare Abhängigkeit spricht jedoch die Tatsache, dass Krox24, Mob-1 und CXCR4 mehrere E-Box Bindungssequenzen enthalten, die teilweise in der 5'-

untranslatierten Region liegen, was auf eine mögliche transkriptionelle Kontrolle durch Mash2 hindeutet. Für CXCR4 konnte gezeigt werden, dass die bHLH-Transkriptionsfaktoren USF, c-myc und YY1 durch Interaktion mit einer in der Promotorregion von CXCR4 lokalisierten E-Box Bindungssequenz die CXCR4-Expression beeinflussen (Moriuchi et al., 1999). Weitere Schwannzellgene, wie die Myelogene P_0 , PMP22 und LNGFR, waren in ihrem Expressionsverhalten unverändert. Dies deutet darauf hin, dass Mash2 kein direkter Regulator der Myelogene ist (Küry et al., 2002). Während im zentralen Nervensystem bHLH-Proteine über Myelogene modulierend auf Differenzierungsprozesse in Oligodendrozyten einwirken (Kondo und Raff, 2000a; Wang et al., 2001), kann für Mash2 bei fehlender Beeinflussung der Myelogene PMP22 und P_0 eine ähnliche Rolle ausgeschlossen werden (Küry et al., 2002). Über die so regulierten Faktoren kann Mash2 in ein komplexes Netzwerk eingreifen, welches über Differenzierungsprozesse während der Schwannzellentwicklung und -myelinisierung weit hinausgeht.

Für Mash2, nicht jedoch für das eng verwandte Mash1, konnte eine Hemmung durch das bHLH Protein eHAND (Hand1, Hxt, Thing2) beschrieben werden, welches früh in der embryonalen Entwicklung im Herz, im lateralen Mesoderm, in Abkömmlingen von Neuralleisten-Zellen sowie extraembryonal (Cross et al., 1995; Cserjesi et al., 1995; Hollenberg et al., 1995) exprimiert wird. Diese Hemmung wird vermutlich über mehrere Mechanismen vermittelt, wie eine Aktivität als Korepressor, über eine Repressionsdomäne und über die Fähigkeit, Klasse A-bHLH Proteine, die an eine E-Box-Sequenz binden, in einen inaktiven Komplex zu drängen (Bounpheng et al., 2000). Die Tatsache, dass eHAND ebenfalls in Neuralleistenzellen und ihren Abkömmlingen nachgewiesen werden kann (Cserjesi et al., 1995), lässt eHAND als möglichen Interaktionspartner von Mash2 erscheinen, was künftigen Studien vorbehalten sein wird.

4.1.5.4. Vergleich mit Läsionsexperimenten:

Mash2 wurde im peripheren Nervensystem als ein postläsional reguliertes Gen nachgewiesen, dessen Expression auf mRNA-Ebene nach einer Quetschverletzung im Verlauf der Waller'schen Degeneration zunächst abnimmt, dann mit voranschreitender Regeneration wieder zunimmt (Küry et al., 2001). Sowohl nach einer Quetschverletzung als auch nach einer kompletten Durchtrennung des N. ischiadicus zeigt sich ein weitgehend paralleles Regulationsverhalten. Nach einer initialen Abnahme um den 2.-4. Tag kommt es zum 21. Tag postläsional zu einem erneuten Anstieg, der dann in eine diskrete Abnahme auf das ursprüngliche Expressionsniveau vor der Läsion übergeht. Im Vergleich zum Expressionsprofil von Krox20 verlaufen beide nach Quetschläsionen weitgehend parallel, während nach Transektionen Krox20 bis zum 30. Tag nicht wieder ansteigt, Mash2 jedoch ab dem 7. Tag erneut ansteigt. Möglich ist eine Rolle Mash2 in Regenerationsvorgängen, die mit den Ergebnissen der Schwannzell-Kulturen deckungsgleich wäre. Die *in vivo*

beobachtete verminderte Expression während der degenerationsassoziierten Dedifferenzierung der Schwanzzellen mit einem erneuten Anstieg der Expression unter voranschreitender Differenzierung folgt in kultivierten Rattenschwanzzellen dem gleichen Prinzip. Alternativ könnte Mash2 jedoch durch niedrige Spiegel während der frühen Waller'schen Degeneration zunächst zu einer Aktivierung von Mob-1 führen und so zunächst fördernd auf degenerierende Prozesse einwirken, im Verlauf durch ansteigende Mash2-Spiegel ab dem 7. Tag postläsional zu einer Aktivierung von CXCR4 führen und damit regenerative Prozesse unterstützen.

4.2. ÜBEREXPRESSION VON MASH2 IN RATTENSCHWANZZELLEN

4.2.1. Reaktion der Schwanzzelle auf eine Überexpression von Mash2

Die Generierung einer Zelllinie, die Mash2 stabil überexprimiert, war im Rahmen dieser Arbeit nicht erfolgreich. Dagegen konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass eine transiente Überexpression des pMash2/CDS-Expressionsvektors in Rattenschwanzzellen zu einer verstärkten Expression von Mash2 führt. Dafür können zahlreiche Ursachen vermutet werden. Zum einen besteht die Möglichkeit, dass die Zahl der initial transfizierten Zellen trotz der mittels Luciferase-Assay optimierten Transfektionsbedingungen zu gering war, dass trotz Übernahme der im Labor für die Hygromycin-Selektion bereits etablierten Bedingungen nicht die optimalen Selektionsbedingungen bestanden, dass der Selektionsprozeß zu lange dauerte oder die Zahl der selektionierten Klone zu gering war. Auch nachfolgende Versuche, eine Mash2 stabil überexprimierende Zell-Linie zu erzeugen, schlugen mehrfach fehl (Küry et al., 2002). Um eine alternative Erklärung für ein Scheitern dieser Bemühungen jenseits methodischer Mängel zu finden, ist eine Analyse der Funktion von Mash2 notwendig. Denn eine mögliche, die Zellproliferation hemmende Funktion von Mash2 würde die Generierung von stabilen Zelllinien *a priori* unmöglich machen. Für diese These spricht die Beobachtung, dass Mash2 während der Waller'schen Degeneration vorübergehend supprimiert wird (Küry et al., 2001). Auch die RT-PCR-Analyse der Mash2-Expression in untransfizierten Rattenschwanzzell-Kulturen zeigt einen Anstieg, je weniger proliferationsfördernd die Wachstumsbedingungen sind. Untermuert wird dies durch weiterführende Experimente, in denen Mash2 in Rattenschwanzzellen mittels transients Transfektion mit einem Mash2-enthaltenden pIRES2-EGFP-Expressionsvektor überexprimiert wurde. Obwohl optimale Proliferationsbedingungen herrschten, zeigte sich eine Reduktion der Anzahl an proliferierenden Schwanzzellen im Vergleich zu Zellen, die mit einem leeren pIRES2-EGFP-Konstrukt transfiziert worden waren (Küry et al., 2002). Damit nimmt Mash2 offenbar einen unmittelbaren Einfluß auf die Zellteilung. Dies wird beispielsweise über Proteine vermittelt, die den Zellzyklus inhibierend modulieren, indem sie Cyclin-dependente Kinasen (CDK) und

damit den Übergang von der G₁- zur S-Phase hemmen, die sogenannten CDK-Inhibitoren (Sherr und Roberts, 1999). Im Fall von Mash2 führte eine Überexpression von Mash2 in Rattenschwanzzell-Kulturen zu einer signifikant erhöhten Expression des CDK-Inhibitors p57kip2 auf mRNA-Ebene (Lee et al., 1995b). Diese Beobachtung ließ sich auf Proteinebene reproduzieren. Mittels Immunfluoreszenz konnte dort eine Kolo-kalisation von Mash2-Protein und p57kip2-Protein in Ischiasnerven von Ratten über rattenspezifische Antikörper nachgewiesen werden. In Läsionsexperimenten zeigt sich nach einer Quetschläsion von Rattenischiasnerven eine transiente Reduktion der p57kip2-Expression mit einem Minimum am 2. Tag postläsional. Der CDK-Inhibitor p57kip2 weist über diese parallele Expression mit Mash2 hinaus weitere interessante Analogien zu Mash2 auf. So kann p57kip2 ebenfalls in Spongiotrophoblasten nachgewiesen werden. Zudem liegt das p57kip2-Gen in Mäusen - ebenso wie Mash2 - auf dem distalen Chromosom 7 und beim Menschen im selben Bereich des Chromosoms 11p15.5. Dort befindet sich eine Gruppe von Genen (Mash2, Ins, Igf2 und H19), bei denen eine Expression spezifischer von den jeweiligen Elternteilen stammender Allele durch genomisches Imprinting beobachtet wurde, so dass auch bei p57kip2 ein solcher epigenetischer Mechanismus möglich ist (Guillemot et al., 1995; Alders et al., 1997; Küry et al., 2002). Die Generierung von p57kip2-„Knockout“-Mäusen ergab zudem Hinweise, dass p57kip2 eine Rolle in der Pathophysiologie des Beckwith-Wiedemann-Syndroms spielen könnte, welches beim Menschen auch als EMG (Exomphalos-Makroglossie-Gigantismus)-Syndrom bekannt ist. Es manifestiert sich mit einem variablen klinischen Bild, zu dem vor allem eine vergrößerte Zunge (Makroglossie), Nabelbrüche (Exomphalos), Gigantismus, Kerbenohren und ein erhöhtes Risiko von Neoplasien im Kindesalter (v.a. Wilms-Tumor) zählen (Reik und Maher, 1997; Maher und Reik, 2000).

4.2.2. Transiente versus stabile Überexpression

Bei einer transienten Transfektion von Zellen werden hoch aufgereinigte Expressionsvektoren mittels eines Transfektionsagens, beispielsweise einem liposomalen Komplex, oder mittels Calciumphosphat-Präzipitaten in die Zielzelle eingeschleust. Dazu muss die zu integrierende DNA als sogenannter "Supercoil" vorliegen. Im Rahmen der transienten Transfektion kommt es dann nach Aufnahme des Plasmides in den Nukleus zur episomalen Expression ohne in das Genom der Zielzelle integriert zu werden. Die Überexpression bleibt dadurch auf wenige Tage beschränkt. Bei der stabilen Transfektion erfolgt eine Integration in das Genom der Wirtszelle. Nach erfolgtem Einbringen des Expressionsvektors in den Zellkern wird dem Kulturmedium ein zytotoxischer Stoff zugesetzt, der die Zellen selektiv abtötet, die den Expressionsvektor mit dem darin enthaltenen Resistenzgen (beispielsweise Hygromycin) nicht in den Zellkern integriert haben. Unter Aufrechterhaltung dieses Milieus wird ein Selektionsdruck erzeugt, der die Zellen bevorzugt, die über einen Hemmstoff das Selektionsmittel unwirksam machen. Im Verlauf kommt es zur

zufälligen Integration von Abschnitten der Plasmid-DNA in das Zielgenom, oft in Form hintereinandergeschalteter Abschnitte, sogenannter Concatamere (Knippers, 1997). Der Vorteil einer transienten Transfektion liegt darin, dass - wie im vorliegenden Fall - eine transiente Überexpression von Genen in Rattenschwanzzellen möglich ist, die trotz wiederholter Versuche nicht zufriedenstellend stabil transfiziert werden können. Die relativ kurze Kontaktzeit von 24 bis 48 Stunden erlaubt auch die vermehrte Expression von Genen, die schädigend oder hemmend auf die Zelle einwirkend. Möglich ist damit die Überexpression von Proteinen, die - wie im Fall von Mash2 - inhibierend auf die Zellproliferation, zytotoxisch, stoffwechselhemmend oder apoptotisch wirken. Eine dauerhafte Überexpression dieser Gene wäre in den meisten Fällen unmöglich. Die kurzfristige Expression erlaubt in der Zellkultur dann die Analyse von Veränderungen der Zellmorphologie und des Proliferationsverhaltens, von biochemischen Prozessen sowie von Regulationskaskaden und Expressionsprofilen möglicher Interaktionspartner auf molekularbiologischer Ebene. Ein weiterer wesentlicher Vorteil besteht in der kurzen zeitlichen Dauer des Experiments und dem Wegfall langwieriger Klonierungs- und Selektionsverfahren. Langfristige funktionelle Untersuchungen sind jedoch meist nur an stabil transfizierten Zellen durchführbar. Dabei muss jedoch berücksichtigt werden, dass bei Verwendung von Primärkulturen mit ansteigenden Passagezahlen zunehmende Entdifferenzierungsprozesse die Aussagekraft der so gewonnenen Ergebnisse einschränken können. Ein wesentlicher Vorteil der stabilen Transfektion besteht darin, dass auch bei niedrigen Transfektionseffizienzen durch Selektionierung und Ringklonierung untransfizierte Zellen die Analyse nicht stören. Einen möglichen Ausweg bietet die Kombination einer transienten Transfektion mit neueren Selektionstechniken, wie die magnetische Zellsortierung (MACS). Hierbei wird mit dem eigentlichen Expressionsvektor ein weiteres Plasmid transfiziert, welches einen Oberflächenmarker kodiert. Die transfizierten Zellen können dann mit einem Antikörper, der spezifisch gegen diesen Marker gerichtet ist, markiert werden. Über einen ferromagnetischen Partikel, der an den Antikörper gekoppelt ist, können die transfizierten Zellen dann isoliert werden (Küry et al., 2002). Eine andere Alternative stellt die fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (FACS) dar.

4.3. ZUSAMMENFASSENDER BEWERTUNG UND AUSBLICK:

4.3.1. Zusammenfassende Bewertung:

In der hier vorliegenden Arbeit konnte ein modifiziertes Zellkulturmodell für Rattenschwanzzellen etabliert werden, in dem der Einfluß unterschiedlicher Wachstumsbedingungen auf die Genexpression der zu untersuchenden Faktoren analysiert werden kann. Dieses Modell soll in stark vereinfachender Weise *in vitro* die unterschiedlichen Entwicklungsstadien von Schwanzzellen imitieren. Erstmals konnte damit

eine differenzielle Expression der bHLH-Proteine Mash1 und Mash2 in Rattenschwanzzellen unter verschiedenen Wachstumsbedingungen nachgewiesen werden. Der Vergleich mit den für die Faktoren Krox20, Krox24 und Oct-6/SCIP publizierten Studien zeigt, dass die mit diesem Modell erhobenen Ergebnisse mit den bekannten Daten für *in vitro*- und *in vivo*-Expression übereinstimmen. Eine synoptische Übersicht der beteiligten Faktoren soll die komplexen und teilweise noch unverstandenen Wechselwirkungen der Faktoren untereinander verdeutlichen (Abb. 34).

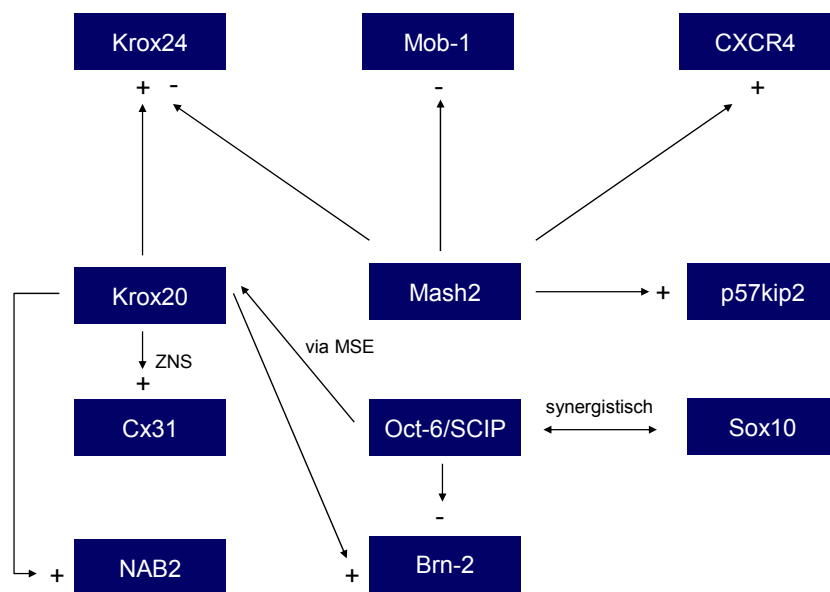


Abb. 34. Synopse der Interaktionen der Transkriptionsfaktoren im Rahmen der Schwanzzell-Entwicklung. Abkürzungen: MSE, myelinspezifisches Element; ZNS, nur im zentralen Nervensystem nachgewiesen; -, hemmend; +, stimulierend.

Damit stellt dieses Modell eine methodische Bereicherung der Analyse einer stadienabhängigen Genexpression in Rattenschwanzzellen dar. Ein wesentlicher Vorteil besteht in der einfachen Handhabung dieses relativ robusten Modells in primären Monokulturen. Einschränkend muss jedoch darauf hingewiesen werden, dass Analysen an isolierten Schwanzzellen nur eine unvollständige Annäherung an die komplexen Wechselwirkungen zwischen Axonen und Schwanzzellen in Kombinationskulturen *in vitro* und *in vivo* darstellen und diese Experimente nicht ersetzen können.

Methodisch muss festgestellt werden, dass sich für die Analyse der niedrig abundanten mRNA von Transkriptionsfaktoren die Durchführung einer semiquantitativen RT-PCR nicht als Methode der Wahl eignet, wenn eine quantitative RT-PCR zur Verfügung steht. Im Vergleich zur quantitativen RT-PCR weisen die Ergebnisse eine höhere Variabilität auf, sind störanfälliger und erfordern eine höhere Anzahl an Wiederholungen, um reproduzierbare

Ergebnisse zu erzielen. Das Auftragen einer definierten Probenmenge auf ein Agarosegel und die konsekutive photodensitometrische Quantifikation stellen eine weitere Fehlerquelle dar, die durch die direkte Fluoreszenzmessung im Reaktionsgefäß entfällt. Eine mögliche Kontamination der Reaktionsansätze durch Amplifikate aus vorangegangenen Reaktionen entfällt durch den Einsatz von dUTP statt dTTP als Nukleotid, da die Hydrolyse der Uracil-Glycosyl-Bindungen vor Beginn der eigentlichen PCR-Reaktion mittels der UNG einzel- und doppelsträngige Amplifikate aus vorigen Reaktionen unbrauchbar macht. Zudem erlaubt die computergestützte Wahl eines mit Hilfe der integrierten Software optimierten Primers bei Genen, die sich mit der semiquantitativen RT-PCR nur schwierig nachweisen lassen, einen deutlich sensitiveren Nachweis.

4.3.2. Ausblick:

Die im Rahmen dieser Arbeit gezeigte Regulation von Transkriptionsfaktoren in der Schwanzzelle stellt eine komplexe Regulationskaskade mit zahlreichen Interaktionen der beteiligten Transkriptionsfaktoren und Zielgene dar, die bislang nur teilweise bekannt ist. Insbesondere die Rolle von Mash2 bedarf der weiteren Klärung. Nachdem eine Generierung von Zelllinien, die Mash2 überexprimieren, nicht gelang, konnte im weiteren eine Regulation von Krox24 und p57kip2 durch Mash2 gezeigt werden und die genaue zelluläre Lokalisation von Mash2 erfolgen. Von speziellem Interesse wird die Frage sein, ob Mash2 in Oligodendrozyten exprimiert wird und welche potentielle Rolle es in der Regulationskaskade einnehmen könnte. Auch die Suche nach weiteren Bindungspartnern sowie die Interaktion mit den bisher bekannten Zielgenen, beispielsweise über Heterodimerenbildung verdient besonderes Interesse. Es bleibt weiteren Studien vorbehalten, die genaue Rolle von Mash2 in Schwanzzellen *in vivo* zu untersuchen. Vor allem im Hinblick auf die physiologischen und pathophysiologischen Funktionen von Mash2 wird die Generierung spezifischer Mausmutanten ("Mash2-Knockout") von besonderem Interesse sein. Die Rolle von Mash2 bei Erkrankungen des peripheren und zentralen Nervensystems hereditärer, immunologischer, entzündlicher oder degenerativer Genese wird Gegenstand künftiger Studien sein und kann potentielle diagnostische und therapeutische Konsequenzen haben.

Die Analyse der Interaktionen und der Rolle von einzelnen Transkriptionsfaktoren in der Myelinisierung von Schwanzzellen im Rahmen der Entwicklung oder der Degeneration eines peripheren Nerven stellt aufgrund der Komplexität und hohen Redundanz innerhalb der Regulationskaskaden mit den augenblicklich zur Verfügung stehenden Methoden eine zeit- und arbeitsintensive Aufgabe dar. Durch neuere und sich immer weiter verbreitende Techniken wie die cDNA-Microarray-Technologie in Kombination mit Läsions- oder Transfektionsmodellen konnte die Suche bereits vereinfacht werden und wird künftig einen höheren Durchsatz an untersuchten Genen ermöglichen. Zudem kann auch die niedrige Abundanz der Faktoren die Analyse erschweren, wenn das Detektionsvermögen der zur

Verfügung stehenden Methoden zu gering ist. Weitere wesentliche Schritte hinsichtlich einer effektiveren Methode sind künftig unter anderem aus dem Bereich der Bioinformatik zu erwarten. Da die Gewinnung der Daten mittels rasch voranschreitender Automatisierung zunimmt, wird die Prozessierung und Analyse der mittels dieser neueren Expressionsanalysen gewonnenen Daten eine zentrale Rolle einnehmen. Nicht die Tatsache, dass einzelne Gene reguliert sind, stellt das entscheidende Ergebnis dar. Vielmehr wird von Bedeutung sein, Cluster gleichartiger Gene zu identifizieren und mittels verbesserter bioinformatischer Algorithmen mögliche Vorhersagen über eine funktionelle Relevanz der Beobachtungen treffen zu können. Ein vielversprechender Ansatz zur Simulation von Interaktionen verschiedener Protein-DNA-Komplexe stellt in diesem Zusammenhang die Suche nach einem "probabilistischen Code" dar, bei dem mit Hilfe der funktionellen Bioinformatik Aminosäuresequenzen für die Protein-DNA-Erkennung vorhergesagt werden sollen. Bisherige Versuche, die sich auf die inzwischen relativ gut charakterisierte Egr-Familie fokussierten, scheiterten allerdings an der enormen Komplexität (Benos et al., 2002).

5. ABKÜRZUNGEN

5.1. ALLGEMEINE ABKÜRZUNGEN

Amp	Ampicillin
AS	Aminosäure
ASC	achaete-scute Complex
bp	Basenpaar
bHLH	basische Helix-loop-helix
BSA	Bovines Serumalbumin
cAMP	cyklisches AMP
cmp	Zählereignisse pro Minute
Ci	Curie
CI	Chloroform-Isoamylalkohol
cDNA	komplementäre DNA
Cys	Cystein
DAPI	4,6-Diamidin-2-phenylindol-dihydrochlorid
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
die	Tag
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dU	Desoxyuracil
dUTP	Desoxyuraciltriphosphat
ddH ₂ O	destilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotid-Triphosphat
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FKS	fötales Kälberserum
Fk	Forskolin
FITC	fluoreszierendes Isothiocyanat

g	G ravitationskonstante
GAPDH	G lycerinaldehyd-3- P hosphat- D ehydrogenase
h	Stunde
HEPES	4-(2- H ydroxyethyl)-1- p erazinethan- s ulfonsäure
His	H istidin
kb	K ilobasen
kDa	K ilodalton
l	L iter
LB	L uria- B roth
m	m illi
M	M ol
MACS	m agnetisches S ortieren von Zellen
MCS	M ultiple K lonierungsstelle
min	M inute
Mio.	M illion
mRNA	Boten- R ibonukleinsäure
NGS	n atural g oat s erum
NLS	N ukleäres L okalisationssignal
OD	O ptische D ichte
PBE	Dulbecco P hosphat-gepufferte Kochsalzlösung mit E DTA
PBS	Dulbecco P hosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCI	P henol- C holoform- I soamylalkohol
PCR	p olymerase c hain r eaction
Pfu	P yroccoccus f uriosus
PNS	P eripheres N ervensystem
RNA	R ibonukleinsäure
RNase	R ibonuklease
RNasin	plazentarer R Nase- I nhibitor
RSZ	R attenschwanzzelle
RT	R aumtemperatur
rT	r everse T ranskriptase
RT-PCR	r everse T ranskriptase – P CR
sek	S ekunde
SDS	Natrium d odecyl s ulfat
SSC	C itrat-gepufferte Kochsalzlösung
SZ	S chwanzzelle
TAE	T ris- A cetate- E DTA-Puffer

Taq	Thermophilus aquaticus
TE	Tris-Salzsäure/EDTA-Lösung
Tricin	N-Tris-(hydroxymethyl)-methylglycin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
u	unit
UNG	AmpErase Uracil-N-glycosylase
upm	Umdrehungen pro Minute
UTR	untranslatierte Region
UV	Ultraviolettes Licht
Vol	Volumen
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indonyl-β-D-Galaktopyranosid
ZNS	Zentrales Nervensystem

5.2. AMINOSÄUREN

Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Aspartat	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutamat	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Try	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

6. ZUSAMMENFASSUNG

Die Myelinisierung der peripheren Nerven stellt einen komplexen Prozess dar, der erst durch das Zusammenspiel von axonalen und glialen Faktoren ermöglicht wird. Eine wesentliche Rolle in diesem Prozess nehmen gliale Transkriptionsfaktoren ein. Für die Mitglieder der Krox-Familie (Krox20 und Krox24) und den POU-Domänenfaktor Oct-6/SCIP ist eine wesentliche Funktion als Regulator der Myelinisierung bekannt. Im ersten Teil dieser Arbeit wurde das Expressions- und Regulationsverhalten der Transkriptionsfaktoren Krox20, Krox24, Oct-6/SCIP, Mash1 und Mash2 in Rattenschwanzzellen unter verschiedenen Kulturbedingungen (niedriger versus hoher Serumspiegel, 0 versus 2 μ M Forskolin sowie subkonfluente versus konfluente Zelldichte) untersucht, um aus diesem *in vitro*-Modell Rückschlüsse auf die Bedeutung für die unterschiedlichen Differenzierungsstadien von Schwanzzellen *in vivo* ziehen zu können. Dabei zeigte sich, dass Krox20 und Oct-6/SCIP ein weitgehend paralleles Profil mit hohen Expressionsraten unter niedrigen Serumkonzentrationen, hohen Forskolinspiegeln und konfluenten Kulturbedingungen aufweisen, wie sie in sich differenzierenden Schwanzzellen zu finden sind. Mash2 weist ein weitgehend paralleles Regulationsverhalten auf, wobei hohe Forskolinspiegel hemmend auf die Mash2-Expression wirken. Mash1 wird insbesondere unter hohen Serumspiegeln exprimiert, wobei eine eindeutige Abhängigkeit von der Höhe des Forskolingehaltes nicht besteht. Krox24 ist unter hohen Serum- und Forskolinspiegeln besonders stark exprimiert und weist damit ein inverses Expressionsverhalten im Vergleich zu Mash2 auf. Dies deutet auf eine mögliche antagonistische Regulation hin. In nachfolgenden Studien konnte dies bestätigt werden und Mash2 als übergeordneter Regulator von Krox24 identifiziert werden. Zusammenfassend konnte in Übereinstimmung mit bisherigen Erkenntnissen aus *in vivo* und *in vitro* Experimenten für die bereits bekannten Transkriptionsfaktoren Krox20, Krox24 und Oct-6/SCIP unter den verschiedenen Kulturbedingungen ein Expressionsverhalten beobachtet werden, das bei Krox20 und Oct-6/SCIP dem von sich differenzierenden Schwanzzellen entspricht, während es bei Krox24 dem einer nicht-myelinisierenden Schwanzzelle entspricht. Erstmals konnte für Mash1 und Mash2 eine differenzielle Expression gezeigt werden.

Die Generierung einer Zelllinie, die die kodierende Sequenz von Mash2 und eine bis auf die DNA-Bindungsdomäne und ein nukleäres Lokalisationssignal trunkeerte Variante von Mash2 stabil überexprimiert, war nicht erfolgreich. Wie in nachfolgenden Experimenten gezeigt werden konnte, induziert Mash2 die Expression von p57kip2, einem Inhibitor von Cyclin-abhängigen Kinasen, der zur Hemmung des Zellzyklus am Übergang von der G₁- zur S-Phase führt.

7. LITERATURVERZEICHNIS

Abankwa D, Küry P, Müller H (2002). "Dynamic changes in gene expression profiles following axotomy of projection fibres in the Mammalian CNS." *Mol Cell Neurosci* 21: 421-435.

Abate C, Curran T (1990). "Encounters with Fos and Jun on the road to AP-1." *Semin Cancer Biol* 1: 19-26.

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

Aiuti A, Webb I, Bleul C, Springer T, Gutierrez-Ramos J (1997). "The chemokine SDF-1 is a chemoattractant for human CD34+ hematopoietic progenitor cells and provides a new mechanism to explain the mobilization of CD34+ progenitors to peripheral blood." *J Exp Med* 185: 111-120.

Alberts B, Bray D, Lewis J, Roberts K, Watson J (1994). *Molecular biology of the cell*. New York, London, Garland Publishing.

Alders M, Hodges M, Hadjantonakis A, Postmus J, Van Wijk I, Blik J, De Meulemeester M, Westerveld A, Guillemot F, Oudejans C, Little P, Mannens M (1997). "The human Achaete-scute homologue 2 (ASCL2, HASH2) maps to chromosome 11p15.5, close to IGF2 and is expressed in extravillous trophoblasts." *Hum Mol Genet* 6: 859-867.

Andersen B, Weinberg W, Rennekampff O, Mcevilly R, Bermingham J, Hooshmand F, Vasilyev V, Hansbrough J, Pittelkow M, Yuspa S, Rosenfeld M (1997). "Functions of the POU domain genes *Skn-1a/i* and *Tst-1/Oct-6/SCIP* in epidermal differentiation." *Genes Dev* 11(14): 1873-1884.

Anderson D (1993). "MASH genes and the logic of neural crest cell lineage diversification." *C R Acad Sci Paris, Sciences de la vie* 316: 1090-1096.

Anderson D (1999). "Lineages and transcription factors in the specification of vertebrate primary sensory neurons." *Curr Opin Neurobiol* 9: 517-524.

Anderson D, Jan Y (1997). "The determination of the neuronal phenotype. Molecular and cellular approaches to neural development." Cowan W. New York, Oxford University Press: 26-63.

Applied Biosystems (2001a). "SYBR Green PCR Master Mix and RT-PCR, Protocol". Foster City, CA, Applied Biosystems.

Applied Biosystems (2001b). "User Bulletin #2: ABI Prism 7700 Sequence Detection System (P/N 4303859)". Foster City, CA, Applied Biosystems.

Arroyo E, Bermingham J, Rosenfeld M, Scherer S (1998). "Promyelinating Schwann cells express Tst-1/SCIP/Oct-6." *J Neurosci* 18: 7891-7902.

Artavanis-Tsakonas S, Matsuno K, Fortini M (1995). "Notch signaling." *Science* 268: 225-232.

Atchley W, Fitch W (1997). "A natural classification of the basic helix-loop-helix class of transcription factors." *Proc Natl Acad Sci* 94: 5172-5176.

Awatramani R, Shumas S, Kamholz J, Scherer S (2002). "TGF β 1 modulates the phenotype of Schwann cells at the transcriptional level." *Mol Cell Neurosci* 19: 307-319.

Barres B, Raff M (1994). "Control of oligodendrocyte number in the developing rat optic nerve." *Neuron* 12: 935-942.

Baxevanis A, Vinson C (1993). "Interactions of coiled coils in transcription factors: where is the specificity?" *Curr Opin Genet Develop* 3: 278-285.

Bellone E, Di Maria E, Soriani S, Varese A, Doria L, Ajmar F, Mandlich P (1999). "A novel mutation (D305V) in the early growth response 2 gene is associated with severe Charcot-Marie-Tooth type I disease." *Human Mutation (Online)* 14: 353-354.

Benezra R, Davis R, Lockshon D, Turner D, Weintraub H (1990). "The protein Id: a negative regulator of helix-loop-helix DNA binding proteins." *Cell* 6: 49-59.

Benos P, Lapedes A, Stormo G (2002). "Is there a code for protein-DNA recognition? Probab(ilistical)ly..." *BioEssays* 21(5): 466-475.

Bermingham J, Scherer S, O'connell S, Arroyo E, Kalla K, Powell F, Rosenfeld M (1996). "Tst-1/Oct-6/Scip regulates a unique step in peripheral myelination and is required for normal respiration." *Genes Dev* 10: 1751-1762.

Bermingham J, Shumas S, Whisenhunt T, Rosenfeld M, Scherer S (2001). "Modification of representational difference analysis applied to the isolation of forskolin-regulated genes from Schwann cells." *J Neurosci Res* 63(6): 516-524.

Biesiada E, Razandi M, Levin E (1996). "Egr-1 activates basic fibroblast growth factor transcription. Mechanistic implications for astrocyte proliferation." *J Biol Chem* 271: 18576-18581.

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

Blanchard A, Sinanan A, Parmantier E, Zwart R, Broos L, Meijer D, Meier C, Jessen K, Mirsky R (1996). "Oct-6 (SCIP/Tst-1) is expressed in Schwann cell precursors, embryonic Schwann cells, and postnatal myelinating Schwann cells: comparison with Oct-1, Krox-20 and Pax-3." *J Neurosci Res* 46: 630-640.

Bleul C, Farzan M, Choe H, Parolin C, Clark-Lewis I, Sodroski J, Springer T (1996). "The lymphocytic chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry." *Nature* 382: 829-833.

Bondurand N, Girard M, Pingault V, Lemort N, Dubourg O, Goossens M (2001). "Human Connexin 32, a gap junction protein altered the X-linked form of Charcot-Marie-Tooth disease, is directly regulated by the transcription factor SOX10." *Hum Mol Genet* 10: 2783-2795.

Borges M, Linnoila R, Van De Velde H, Chen H, Nelkin B, Mabry M, Baylin S, Ball D (1997). "An achaete-scute homologue essential for neuroendocrine differentiation in the lung." *Nature* 386: 852-855.

Bosse F, Zoidl G, Gillen C, Kuhn H, Müller H (1994). "Differential expression of two mRNS species indicates a dual function of peripheral myelin protein PMP22 in cell growth." *J Neurosci Res* 37: 529-537.

Botti D, Pareyson D, Sghirlanzoni A, Nemni R, Riva D, Taroni F (1998). "Mutations in the transcription factor EGR2 in patients with severe hereditary demyelinating neuropathies." *Am J Hum Genet* 63: Supplement, A352.

Bounpheng A, Morrish T, Dodds S, Christy B (2000). "Negative regulation of selected bHLH proteins by eHAND." *Exp Cell Res* 257: 320-331.

Britsch S, Goerich D, Riethmacher D, Peirano R, Rossner M, Nave K, Birchmeier C, Wegner M (2001). "The transcription factor Sox10 is a key regulator of peripheral glial development." *Genes Dev* 15: 66-78.

Brockes J, Fields K, Raff M (1979). "Studies on cultured rat Schwann cells. I. Establishment of purified populations from cultures of peripheral nerves." *Brain Res* 165: 105-118.

Bruzzone R, Ressot C (1997). "Connexins, gap junctions and cell-cell signalling in the nervous system." *Eur J Neurosci* 9: 1-6.

Bunge R, Bartlett Bunge M, Eldridge C (1986). "Linkage between axonal and ensheathment and basal lamina production by Schwann cells." *Annu Rev Neurosci* 9: 304-328.

Castella P, Wagner J, Caudy M (1999). "Regulation of hippocampal neuronal differentiation by the basic helix-loop-helix transcription factors HES-1 and MASH-1." *J Neurosci Res* 56: 229-240.

Cau E, Casarosa S, Guillemot F (2002). "Mash1 and Ngn1 control distinct steps of determination and differentiation in the olfactory sensory neuron lineage." *Development* 129: 1871-1880.

Chavrier P, Zerial M, Lemaire P, Almendral J, Bravo R, Charnay P (1988). "A gene encoding a protein with zinc fingers is activated during G0/G1 transition in cultured cells." *EMBO J* 7: 29-35.

Chen H, Thiagalingam A, Chopra H, Borges M, Feder J, Nelkin B, Baylin S, Ball D (1997). "Conservation of the *Drosophila* lateral inhibition pathway in human lung cancer: a hairy-related protein (HES-1) directly represses achaete-scute homolog-1 expression." *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 5355-5360.

Cheng L, Mudge A (1996). "Cultured Schwann cells constitutively express the myelin protein P0." *Neuron* 16(2): 309-319.

Chiamarello A, Neuman K, Palm K, Metsis M, Neuman T (1995). "Helix-loop-helix transcription factors mediate activation and repression of the p75LNGFR gene." *Mol Cell Biol* 15: 6036-6044.

Chomczynski P, Sacchi N (1987). "Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." *Anal Biochem* 162: 156-159.

Christy B, Sanders L, Lau L, Copeland N, Jenkins N, Nathans D (1991). "An Id-related helix-loop-helix protein encoded by a growth factor-inducible gene." *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 1815-1819.

Cole A, Saffen D, Baraban J, Worley P (1989). "Rapid increase of an immediate early gene messenger RNA in hippocampal neurons by synaptic NMDA receptor activation." *Nature* 340: 474-476.

Cross J, Flannery M, Blonar M, Steingrimsson E, Jenkins N, Copeland N, Rutter W, Werb Z (1995). "Hxt encodes a basic helix-loop-helix transcription factor that regulates trophoblast cell development." *Development* 121: 2513-2523.

Cserjesi P, Brown D, Lyons G, Olson E (1995). "Expression of the novel basic helix-loop-helix protein eHAND in neural crest derivatives and extraembryonic membranes during mouse development." *Dev Biol* 170: 664-678.

Curtis R, Stewart HJ, Hall SM, Wilkin GP, Mirsky R, Jessen KR (1992). "GAP-43 is expressed by nonmyelin-forming Schwann cells of the peripheral nervous system." *J Cell Biol* 116(6): 1455-1464.

Dahl E, Willecke K, Balling R (1997). "Segment-specific expression of the gap junction gene connexin31 during hindbrain development." *Dev Genes Evol* 207: 359-361.

Dambly-Chaudiere C, Vervoort M (1998). "The bHLH genes in neural development." *Int J Dev Biol* 42: 269-273.

Erno H, Küry P, Botteri F, Monard D (1996). "A Krox binding site regulates protease nexin-1 promotor activity in embryonic heart, cartilage and parts of the nervous system." *Mech Dev* 60: 139-150.

Farber J (1997). "Mig and IP-10: CXC chemokines that target lymphocytes." *J Leukoc Biol* 61: 246-257.

Fawcett J, Keynes R (1990). "Peripheral nerve regeneration." *Annu. Rev. Neurosc.* 13: 43-60.

Fernandez E, Pallini R, La Marca F, Lauretti L, Scogna A (1996). "Neurosurgery of the peripheral nervous system-Part I: Basic anatomical concepts." *Surg Neurol* 46: 47-48.

Gambardella L, Schneider-Maunoury S, Voiculescu O, Charnay P, Barrandon Y (2000). "Pattern of expression of the transcription factor Krox-20 in mouse hair follicle." *Mech Dev* 96: 215-218.

Gardner E, Bunge R (1993). *Gross anatomy of the peripheral nervous system. Peripheral Neuropathy.* Dyck P. Philadelphia, PE, W.B. Saunders.

Ghislain J, Desmarquet-Trinh-Dinh C, Jaegle M, Meijer D, Charnay P, Frain M (2002). "Characterisation of cis-acting sequences reveals a biphasic, axon dependent regulation of Krox20 during Schwann cell development." *Development* 129: 155-166.

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

Gillen C, Gleichmann M, Greiner-Petter R, Müller H (1996). "Full length cloning, expression and cellular localization of rat plasmolipin mRNA, a proteolipid of PNS and CNS." *Eur J Neurosci* 8: 405-414.

Gillen C, Korfhage C, Müller H (1997). "Gene expression in nerve regeneration." *Neuroscientist* 3: 112-122.

Gleichmann M, Gillen C, Czardybon M, Bosse F, Greiner-Petter R, Auer J, Müller H (2000). "Cloning and characterization of SDF-1g, a novel SDF-1 chemokine transcript with developmentally regulated expression in the nervous system." *Eur J Neurosci* 12: 1857-1866.

Goff D, Tabin C (1997). "Analysis of Hoxd-13 and Hoxd-11 misexpression in chick limb buds reveals that Hox genes affect both bone condensation and growth." *Development* 124: 627-636.

Golding J, Cohen J (1997). "Border controls at the mammalian spinal cord: late-surviving neural crest boundary cap cells at dorsal root entry sites may regulate sensory afferent ingrowth and entry zone morphogenesis." *Mol Cell Neurosci* 9(5-6): 381-396.

Gondre M, Burrola P, Weinstein D (1998). "Accelerated nerve regeneration mediated by Schwann cells expressing a mutant form of the POU protein SCIP." *J Cell Biol* 141: 493-401.

Goodman F, Mundlos S, Muragaki Y, Donnai D, Giovannuci-Uzielli M, Lapi E, Majewski F, Mcgaughan J, Mckeown W, Reardon W, Upton J, Winter R, Olsen B, Scambler P (1997). "Synpolydactyly phenotypes correlate with size of expansions in HOXD13 polyalanine tract." *Proc Natl Acad Sci* 94: 7458-7463.

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

Grose R, Harris B, Cooper L, Topilko P, Martin P (2002). "Immediate early genes krox-24 and krox-20 are rapidly up-regulated after wounding in the embryonic and adult mouse." *Dev Dyn* 223: 371-378.

Guennon R, Benmessahel Y, Delespierre B, Gouézou M, Rajkowski K, Baulieu E, Schumacher M (2001). "Progesterone stimulates Krox-20 gene expression in Schwann cells." *Mol Brain Res* 90: 75-82.

Guillemot F, Caspary T, Tilghman S, Copeland N, Gilbert D, Jenkins N, Anderson D, Joyner A, Rossant J, Nagy A (1995). "Genomic imprinting of Mash2, a mouse gene required for trophoblast development." *Nat Genet* 9: 235-242.

Guillemot F, Lo L, Johnson J, Auerbach A, Anderson D, Joyner A (1993). "Mammalian achaete-scute homolog-1 is required for the early development of olfactory and autonomic neurons." *Cell* 75: 463-476.

Guillemot F, Nagy A, Auerbach A, Rossant J, Joyner A (1994). "Essential role of Mash-2 in extraembryonic development." *Nature* 371: 333-336.

Gupta S, Poduslo J, Dunn R, Roder J, Mezei C (1990). "Myelin-associated glycoprotein gene expression in the presence and absence of Schwann cell-axonal contact." *Dev Neurosci* 12: 22-31.

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

He X, Gerrero R, Simmons D, Park R, Lin C, Swanson L, Rosenfeld M (1991). "Tst-1, a member of the POU domain gene family, binds to the promotor of the gene encoding the cell surface adhesion molecule Po." *Mol Cell Biol* 11: 1739-1744.

Herdegen T, Kiessling M, Bele S, Bravo R, Zimmermann M, Gass P (1993). "The KROX-20 transcription factor in the rat central and peripheral nervous systems: novel expression pattern of an immediate early gene-encoded protein." *Neuroscience* 57: 41-52.

Herdegen T, Leah J (1998). "Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CREB/ATF proteins." *Brain Research Reviews* 28: 370-490.

Hesselgesser J, Taub D, Baskar P, Greenberg M, Hoxie J, Kolson D, Horuk R (1998). "Neuronal apoptosis induced by HIV-1 gp120 and the chemokine SDF-1 alpha is mediated by the chemokine receptor CXCR4." *Curr Biol* 8: 595-598.

Hollenberg S, Sternglanz R, Cheng P, Weintraub H (1995). "Identification of a new family of tissue-specific helix-loop-helix proteins with a yeast two-hybrid system." *Mol Cell Biol* 15: 3813-3822.

Inoue K, Tanabe Y, Lupski J (1999). "Myelin deficiencies in both the central and the peripheral nervous systems associated with a SOX10 mutation." *Ann Neurol* 46: 313-318.

Jaegle M, Ghazvini M, Mandemakers W, Piirso M, Driegen S, Levavasseur F, Raghoenath S, Grosveld F, Meijer D (2003). "The POU proteins Brn-2 and Oct-6 share important functions in Schwann cell development." *Genes Dev* 17: 1380-1391.

Jaegle M, Mandemakers W, Broos L, Zwart R, Karis A, Visser P, Grosveld F, Meijer D (1996). "The POU factor Oct-6 and Schwann cell differentiation." *Science* 273: 507-510.

Jaegle M, Meijer D (1998). "Role of Oct-6 in Schwann cell differentiation." *Microscopic Research Techniques* 41: 372-378.

Jen Y, Manova K, Benezra R (1996). "Expression patterns of Id1, Id2, and Id3 are highly related but distinct from that of Id4 during mouse embryogenesis." *Dev Dyn* 207(3): 235-252.

Jessen K, Mirsky R (1991). "Schwann cell precursors and their development." *Glia* 4: 185-194.

Jessen K, Mirsky R (1992). "Schwann cells: early lineage, regulation of proliferation and control of myelin formation." *Curr Opin Neurobiol* 2: 575-581.

Jessen K, Mirsky R (1999). "Schwann cells and their precursors emerge as major regulators of nerve development." *Trends Neurosci* 22: 402-410.

Jessen K, Mirsky R, Morgan L (1991). "Role of cyclic AMP and proliferation controls in Schwann cell differentiation." *Annu NY Acad Sci* 633: 78-89.

Jiang H, Duchala C, Awatramani R, Shumas S, Carlock L, Kamholz J, Garbern J, Scherer S, Shy M, Macklin W (2000). "Proteolipid protein mRNA stability is regulated by axonal contact in the rodent peripheral nervous system." *J Neurobiol* 44: 7-19.

Jögi A, Persson P, Grynfeld A, Pahlman S, Axelson H (2002). "Modulation of basic helix-loop-helix transcription complex formation by Id proteins during neuronal differentiation." *J Biol Chem* 277(11): 9118-9126.

Johnson J, Birren S, Anderson D (1990). "Two rat homologues of *Drosophila* achaete-scute specifically expressed in neuronal precursors." *Nature* 346: 858-861.

Johnson J, Birren S, Saito T, Anderson D (1992). "DNA binding and transcriptional regulatory activity of mammalian achaete-scute homologous (MASH) proteins revealed by interaction with a muscle-specific enhancer." *Proc Natl Acad Sci* 89: 3596-3600.

Joseph L, Le B, Jamieson G, Acharya S, Shows T, Rowley J, Sukhatme V (1988). "Molecular cloning, sequencing, and mapping of EGR2, a human early growth response gene encoding a protein with "zinc-binding finger" structure." *Proc Natl Acad Sci* 85: 7164-7168.

Jungbluth S, Willecke K, Champagnat J (2002). "Segment-specific expression of *connexin31* in the embryonic hindbrain is regulated by *Krox20*." *Dev Dyn* 223: 544-551.

Kageyama R, Ishibashi M, Takebayashi K, Tomita K (1997). "bHLH transcription factors and mammalian neuronal differentiation." *Int J Biochem Cell Biol* 29(12): 1389-1399.

Khachigian L, Lindner V, Williams A, Collins T (1996). "Egr-1-induced endothelial gene expression: a common theme in vascular injury." *Science* 271: 1427-1431.

Kioussi C, Gross M, Gruss P (1995). "Pax3: a paired domain gene as regulator in PNS myelination." *Neuron* 15: 553-562.

Knippers R (1997). *Molekulare Genetik*. Stuttgart, Georg Thieme Verlag.

Kondo T, Raff M (2000a). "Basic helix-loop-helix proteins and the timing of oligodendrocyte differentiation." *Development* 127: 2989-2998.

Kondo T, Raff M (2000b). "The Id4 HLH protein and the timing of oligodendrocyte differentiation." *EMBO J* 19: 1998-2007.

Kozak M (1991a). "An analysis of vertebrate mRNA-Sequences: Imitations of translational control." *J Cell Biol* 115: 887-903.

Kozak M (1991b). "An analysis of vertebrate mRNA-Sequences: Structural features in eukaryotic mRNAs that modulate the initiation of translation." *J Cell Biol* 115: 19867-19870.

Kramer B, Meichle A, Hensel G, Charnay P, Kronke M (1994). "Characterization of an Krox-24/Egr-1-responsive element in the human tumor necrosis factor promoter." *Biochim Biophys Acta* 1219: 413-421.

Kuhlbrodt K, Herbarth B, Sock E, Enderich J, Hermans-Borgmeyer I, Wegner M (1998a). "Cooperative function of POU proteins and SOX proteins in glial cells." *J Biol Chem* 273(26): 16050-16057.

Kuhlbrodt K, Herbarth B, Sock S, Hermans-Borgmeyer I, Wegner M (1998b). "Sox10, a novel transcriptional modulator in glial cells." *J Neurosci* 18: 237-250.

Küry P, Abankwa D, Kruse F, Greiner-Petter R, Hw M (2004). "Gene expression profiling reveals multiple novel intrinsic and extrinsic factors associated with axonal regeneration failure." *Eur J Neurosci* 19: 32-42.

Küry P, Bosse F, Müller H (2001). "Transcription factors in nerve regeneration." *Prog Brain Res* 132: 579-595.

Küry P, Greiner-Petter R, Cornely C, Jürgens T, Müller H (2002). "Mammalian Achaete Scute Homolog 2 Is Expressed in the Adult Sciatic Nerve and Regulates the Expression of Krox24, Mob-1, CXCR4 and p57kip2 in Schwann cells." *J Neurosci* 22(17): 7586-7595.

Küry P, Köller H, Hamacher M, Cornely C, Hasse B, Müller H (2003). "Cyclic AMP and tumor necrosis factor- α regulate CXCR4 gene expression in Schwann cells." *Mol Cell Neurosci* 24: 1-9.

Latchman D (1996). "Inhibitory transcription factors." *Int J Biochem Cell Biol* 28(9): 965-974.

Latchman D (1998). *Eukaryotic transcription factors*. London, Academic Press.

Latour P, Gagnon A, Boutrand L, Nivelon-Chevallier A, Giraud M, Boucherat M, Chazot G, Vandenberghe A (1999). "A R381H mutation in the EGR2 gene associated with a severe peripheral neuropathy with hypotonia." *J Peripher Nerv Syst* 4: 293-294.

Leblanc A, Poduslo J (1990). "Axonal modulation of gene expression in the peripheral nerve." *J Neurosci Res* 26: 317-326.

Ledent V, Paquet O, Vervoort M (2002). "Phylogenetic analysis of the human basic helix-loop-helix proteins." *Genome Biol* 3(6): 1-18.

Ledent V, Vervoort M (2001). "The basic helix-loop-helix protein family: comparative genomics and phylogenetic analysis." *Genome Res* 11: 1499-1505.

Lee J, Hollenberg S, Snider L, Turner D, Lipnick N, Weintraub H (1995a). "Conversion of *Xenopus* ectoderm into neurons by neuroD, a basic helix-loop-helix protein." *Science* 268: 836-844.

Lee M, Reynisdottir I, Massague J (1995b). "Cloning of p57KIP2, a cyclin-dependent kinase inhibitor with unique domain structure and tissue distribution." *Genes Dev* 9: 639-649.

Lee S, Sadovsky Y, Swirhoff A, Polish J, Goda P, Gavrilina G, Milbrandt J (1996). "Luteinizing hormone deficiency and female infertility in mice lacking the transcription factor NGFI-A (*Egr-1*)." *Science* 273: 1219-1221.

Leighton P, Saam J, Ingram R, Stewart C, Tilghman S (1995). "An enhancer deletion affects both *H19* and *Igf2* expression." *Genes Dev* 9: 2079-2089.

Lemaire P, Revelant O, Bravo R, Charnay P (1988). "Two mouse genes encoding potential transcription factors with identical DNA-binding domains are activated by growth factors in cultured cells." *Proc Natl Acad Sci* 85: 4691-4695.

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

Lemke G, Kuhn R, Monuki E, Weinmaster G (1990). "Transcriptional controls underlying Schwann cell differentiation and myelination." *Annu NY Acad Sci* 605: 248-253.

Lemke G, Kuhn R, Monuki E, Weinmaster G (1991). "Expression and activity of the transcription factor SCIP during glial differentiation and myelination." *Annu NY Acad Sci* 633: 189-195.

Levi G, Topilko P, Schneider-Maunoury S, Lasagna M, Mantero S, Cancedda R, Charnay P (1996). "Defective bone formation in *Krox-20* mutant mice." *Development* 122: 113-120.

Liang P, Averboukh L, Zhu W, Pardee A (1994). "Ras activation of genes: *Mob-1* as a model." *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 12515-12519.

Lim R, Varnum B, Herschman H (1987). "Cloning of tetradecanoyl phorbol ester-induced "primary response" sequences and their expression in density-arrested Swiss 3T3 cells and a TPA non-proliferative variant." *Oncogene* 1: 263-270.

Liu C, Yao J, De Belle I, Huang R, Adamson E, Mercola D (1999). "The transcription factor EGR-1 suppresses transformation of human fibrosarcoma HT1080 cells by coordinated induction of transforming growth factor-beta 1, fibronectin, and plasminogen activator inhibitor-1." *J Biol Chem* 274: 4400-4411.

Lufkin T (1996). "Transcriptional control of Hox genes in the vertebrate nervous system." *Curr Opin Genet Dev* 6: 575-580.

Ma Q, Sommer L, Cserjesi P, Anderson D (1997). "Mash1 and neurogenin1 expression patterns define complementary domains of neuroepithelium in the developing CNS and are correlated with regions expressing notch ligands." *J Neurosci* 17(10): 3644-3652.

Magyar J, Martini R, Ruelicke T, Aguzzi A, Adlkofer K, Dembic Z, Zielasek J, Toyka K, Suter U (1996). "Impaired differentiation of Schwann cells in transgenic mice with increased PMP22 gene dosage." *J Neurosci* 17: 5351-5360.

Maher E, Reik W (2000). "Beckwith-Wiedemann syndrome: imprinting in clusters revisited." *J Clin Invest* 105(3): 247-252.

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

Martinsen B, Bronner-Fraser M (1998). "Neural crest specification regulated by the helix-loop-helix repressor Id2." *Science* 281(5379): 988-991.

Massari M, Murre C (2000). "Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms." *Mol Cell Biol* 20: 429-440.

McEvelly R, De Diaz M, Schonemann M, Hooshmand F, Rosenfeld M (2002). "Transcriptional regulation of cortical neuron migration by POU domain factors." *Science* 295: 1528-1532.

Mechta-Grigoriou F, Garel S, Charnay P (2000). "Nab proteins mediate a negative feedback loop controlling Krox-20 activity in the developing hindbrain." *Development* 127: 119-128.

Meijer D, Graus A, Kraay R, Langeveld A, Mulder M, Grosveld G (1990). "The octamer binding factor Oct-6: cDNA cloning and expression in early embryonic cells." *Nucl Acid Res* 18: 7357-7365.

Mello C, Vicario D, Clayton D (1992). "Song presentation induces gene expression in the songbird forebrain." *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 6818-6822.

Meyer M, Matsuoka I, Wetmore C, Olson L, Thoenen H (1992). "Enhanced synthesis of brain-derived neurotrophic factor in the lesioned peripheral nerve: different mechanisms are responsible for the regulation of BDNF and NGF mRNA." *J Cell Biol* 119(1): 45-54.

Milbrandt J (1987). "A nerve growth factor-induced gene encodes a possible transcriptional regulatory factor." *Science* 238(797-799).

Mirsky R, Jessen K (2001). Embryonic and early postnatal development of Schwann cells. *Glial Cell Development - Basic Principles and Clinical Relevance*. Jessen K, Richardson W. Oxford, Oxford University Press.

Monuki E, Kuhn R, Lemke G (1993). "Repression of the myelin P₀ gene by the POU transcription factor SCIP." *Mech Dev* 42: 15-32.

Monuki E, Kuhn R, Weinmaster G, Trapp B, Lemke G (1990). "Expression and activity of the POU transcription factor SCIP." *Science* 249: 1300-1303.

Monuki E, Weinmaster G, Kuhn R, Lemke G (1989). "SCIP: a glial POU domain gene regulated by cyclic AMP." *Neuron* 3: 783-793.

Morgan L, Jessen K, Mirsky R (1991). "The effects of cAMP on differentiation of cultured Schwann cells: progression from an early phenotype (O4⁺) to a myelin phenotype (P₀⁺, GFAP⁺, N-CAM⁺, NGF-receptor⁺) depends on growth inhibition." *J Cell Biol* 112: 457-467.

Morgan L, Jessen K, Mirsky R (1994). "Negative regulation of the P₀ gene in Schwann cells: suppression of P₀ mRNA and protein induction in cultured Schwann cells by FGF2 and TGFb1, TGFb2 and TGFb3." *Development* 120: 1399-1409.

Moriuchi M, Moriuchi H, Margolis D, Fauci A (1999). "USF/c-Myc enhances, while Yin Yang 1 suppresses, the promoter activity of CXCR4, a coreceptor for HIV-1 entry." *J Immunol* 162(10): 5986-5992.

Mortlock D, Post L, Innis J (1996). "The molecular basis of hypodactyly (Hd): a deletion in Hoxa 13 leads to arrest of digital arch formation." *Nat Genet* 13: 284-289.

Müller H (2000). "Tetraspan myelin protein PMP22 and demyelinating peripheral neuropathies: New facts and hypothesis." *Glia* 29: 182-185.

Mumenthaler M (1993). *Läsionen peripherer Nerven: Diagnostik und Therapie*. Stuttgart, Georg Thieme Verlag.

Murphy P, Topilko P, Schneider-Maunoury S, Seitanidou T, Baron-Van Evercooren A, Charnay P (1996). "The regulation of Krox-20 expression reveals important steps in the control of peripheral glial development." *Development* 122: 2847-2857.

Nagarajan R, Svaren J, Le N, Araki T, Watson M, Milbrandt J (2001). "EGR2-Mutations in Inherited Neuropathies Dominant-Negatively Inhibit Myelin Gene Expression." *Neuron* 30: 355-368.

Nagasawa T, Nakajima T, Tachibana K, Iizasa H, Bleul C, Yoshie O, Matsushima K, Yoshida N, Springer T, Kishimoto T (1996). "Molecular cloning and characterization of a murine pre-B-cell growth-stimulating factor/stromal cell-derived factor 1 receptor, a murine homolog of the human immunodeficiency virus 1 entry coreceptor fusin." *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 14726-14729.

Narayanan V, Barbosa E, Reed R, Tennekoon G (1988). "Characterization of a cloned cDNA encoding rabbit myelin P₂ protein." *J Biol Chem* 263: 8332-8337.

Niederlander C, Lumsden A (1996). "Late emigrating neural crest cells migrate specifically to the exit points of cranial branchiomotor nerves." *Development* 122(8): 2367-2374.

Nikam S, Tennekoon G, Christy B, Yoshino J, Rutkowski J (1995). "The zinc finger transcription factor Zif268/Egr-1 is essential for Schwann cell expression of the p75 NGF receptor." *Mol Cell Neurosci* 6: 337-348.

Nonchev S, Vesque C, Maconochie M, Seitanidou T, Ariza-Mcnaughton L, Frain M, Marshall H, Sham M, Krumlauf R, Charnay P (1995). "Segmental expression of Hoxa2 in the hindbrain is directly regulated by Krox20." *Development* 122: 543-554.

Norton J (2000). "ID helix-loop-helix proteins in cell growth, differentiation and tumorigenesis." *J Cell Sci* 113: 3897-3905.

Notterpeck L, Snipes G, Shooter E (1999). "Temporal expression pattern of peripheral myelin protein 22 during in vivo and in vitro myelination." *Glia* 25: 358-369.

O'Donovan K, Tourtelotte W, Milbrandt J, Baraban J (1999). "The EGR family of transcription-regulatory factors: progress at the interface of molecular and systems neuroscience." *Trends Neurosci* 22(4): 167-173.

Pabo C, Sauer R (1992). "Transcription factors: Structural Families and Principles of DNA recognition." *Annu Rev Biochem* 61: 1053-1095.

Parkinson D, Dickinson S, Bhaskaran A, Kinsella M, Brophy P, Sherman D, Shargi-Namini S, Duran Alonso M, Mirsky R, Jessen K (2003). "Regulation of the myelin gene periaxin provides evidence for Krox-20-independent myelin-related signalling in Schwann cells." *Mol Cell Neurosci* 23: 13-27.

Parras C, Schuurmanns C, Scardigli R, Kim J, Anderson D, Guillemot F (2002). "Divergent functions of the proneural genes Mash1 and Ngn2 in the specification of neuronal subtype identity." *Genes Dev* 16: 324-338.

Pfaff S, Kintner C (1998). "Neuronal diversification: development of motor neuron subtypes." *Curr Opin Neurobiol* 8: 27-36.

Placzek M, Furley A (1996). "Patterning cascades in the neural tube. Neural development." *Curr Biol* 6:526-9.

Poduslo J, Walikonis R, Domec M, Berg C, Holtz-Heppelmann C (1995). "The second messenger, cyclic AMP, is not sufficient for myelin gene induction in the peripheral nervous system." *J Neurochem* 65: 149-159.

Reik W, Maher E (1997). "Imprinting in clusters: lessons from Beckwith-Wiedemann syndrome." *Trends Genet* 13: 330-334.

Renner K, Sock E, Gerber J, Wegner M (1996). "T Antigen of human papovavirus JC stimulates transcription of the POU domain factor Tst-1/Oct6/SCIP." *DNA Cell Biol* 15: 1057-1062.

Riechmann V, Sablitzky F (1995). "Mutually exclusive expression of two dominant-negative helix-loop-helix (dnHLH) genes, Id4 and Id3, in the developing brain of the mouse suggests distinct regulatory roles of these dnHLH proteins during cellular proliferation and differentiation of the nervous system." *Cell Growth Differ* 6(7): 837-843.

Riechmann V, Van Cruchten I, Sablitzky F (1994). "The expression pattern of Id4, a novel dominant negative helix-loop-helix protein, is distinct from Id1, Id2 and Id3." *Nucl Acid Res* 22: 749-755.

Riley P, Anson-Cartwright L, Cross J (1998). "The Hand1 bHLH transcription factor is essential for placentation and cardiac morphogenesis." *Nat Genet* 18: 271-275.

Rossant J, Guillemot F, Tanaka M, Latham K, Gertenstein M, Nagy A (1998). "Mash2 is expressed in oogenesis and preimplantation development but is not required for blastocyst formation." *Mech Dev* 73: 183-191.

Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbour, NY, Cold Spring Harbour Laboratory.

Sanger F, Nicklen S, Coulson A (1977). "DNA sequencing with chain terminating inhibitors." *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 5463-5467.

Sasai Y, Kageyama R, Tagawa Y, Shigemoto R, Nakanishi S (1992). "Two mammalian helix-loop-helix factors structurally related to *Drosophila* hairy and Enhancer of split." *Genes Dev* 6: 2620-2634.

Scherer S, Deschenes S, Xu Y-T, Grinspan J, Fischbeck K, Paul D (1995a). "Connexin32 is a myelin-related protein in the PNS and CNS." *J Neurosci* 15: 8281-8294.

Scherer S, Salzer J (2001). Axon-Schwann cell interactions during peripheral nerve degeneration and regeneration. *Glial Cell Development - Basic Principles and Clinical Relevance*. Jessen K, Richardson W. Oxford, Oxford University Press.

Scherer S, Wang D, Kuhn R, Lemke G, Wrabetz L, Kamholz J (1994a). "Axons regulate Schwann cell expression of the POU transcription factor SCIP." *J Neurosci* 14: 1930-1942.

Scherer S, Xu Y-T, Bannerman P, Sherman D, Brophy P (1995b). "Periaxin expression in myelinating Schwann cells: modulation by axon-glia interactions and polarized localization during development." *Development* 121: 4265-4273.

Scherer S, Xu Y, Roling D, Wrabetz L, Feltri M, Kamholz J (1994b). "Expression of growth-associated protein-43 kD in Schwann cells is regulated by axon-Schwann cell interactions and cAMP." *J Neurosci Res* 38(5): 575-589.

Schiebler T, Schmidt W (1991). *Anatomie*. Berlin, Heidelberg, New York, Springer-Verlag.

Schneider-Maunoury S, Topilko P, Seitanidou T, Levi G, Cohen-Tannoudji M, Pournin S, Babinet C, Charnay P (1993). "Disruption of Krox-20 results in alteration of rhombomeres 3 and 5 in the developing hindbrain." *Cell* 75: 1199-1214.

Schreiber J, Enderich J, Sock E, Schmidt C, Richter-Landsberg C, Wegner M (1997). "Redundancy of class III POU proteins in the oligodendrocyte lineage." *J Biol Chem* 272: 32286-32293.

Scott M (1997). "Hox genes, arms and the man." *Nat Genet* 15: 117-118.

Seamon K, Daly J (1986). "Forskolin: its biological and chemical properties." *Adv Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Res* 20: 1-150.

Sevetson B, Svaren J, Milbrandt J (2000). "A novel activation function for NAB proteins in Egr-dependent transcription of the Luteinizing hormone-beta gene." *J Biol Chem* 275: 9749-9757.

Shapiro L, Doyle J, Hensley P, Colman D, Hendrickson W (1996). "Crystal structure of the extracellular domain from P₀, the major structural protein of peripheral nerve myelin." *Neuron* 17: 435-449.

Sharkey M, Graba Y, Scott M (1997). "Hox genes in evolution: protein surfaces and paralog groups." *Trends Genet* 13(4): 145-151.

Sherr C, Roberts J (1999). "CDK inhibitors: positive and negative regulators of the G1-phase progression." *Genes Dev* 13: 1501-1512.

Shy M, Shi Y, Wrabetz L, Kamholz J, Scherer S (1996). "Axon-Schwann cell interactions regulate the expression of c-jun in Schwann cells." *J Neurosci Res* 43: 511-525.

Sieber M, Allemann R (1998). "Single chain dimers of MASH-1 bind DNA with enhanced affinity." *Nucl Acid Res* 26(6): 1408-1413.

Sim F, Zhao C, Wen-Wu L, Lakatos A, Franklin R (2002). "Expression of the POU-domain transcription factors SCIP/Oct-6 and Brn-2 is associated with Schwann cell but not oligodendrocyte remyelination of the CNS." *Mol Cell Neurosci* 20: 669-682.

Simpson J, Newcombe J, Cuzner M, Woodroffe M (2000). "Expression of the interferon-g-inducible chemokines IP-10 and Mig and their receptor, CXCR3, in multiple sclerosis lesions." *Neuropathol Appl Neurobiol* 26: 133-142.

Skeath J, Doe C (1996). "The achaete-scute complex proneural genes contribute to neural precursor specification in the Drosophila CNS." *Curr Biol* 6: 1146-1152.

Sock E, Leger H, Kuhlbrodt K, Schreiber J, Enderich J, Richter-Landsberg C, Wegner M (1997). "Expression of Krox proteins during differentiation of the 0-2A progenitor cell line CG-4." *J Neurochem* 68: 1911-1919.

Spreyer P, Kuhn G, Hanemann C, Gillen C, Schaal H, Kuhn R, Lemke G, Müller H (1991). "Axon-regulated expression of a Schwann cell transcript that is homologous to a "growth arrest-specific" gene." *EMBO J* 10: 3661-3688.

Sriuranpong V, Borges M, Strock C, Nakakura E, Watkins N, Blaumueller C, Nelkin B, Ball D (2002). "Notch signaling induces rapid degradation of achaete-scute homolog 1." *Mol Cell Biol* 22(9): 3129-3139.

Stewart H (1995). "Expression of c-Jun, Jun B, Jun D and cAMP response element binding protein by Schwann cells and their precursors in vivo and in vitro." *Eur J Neurosci* 7: 1366-1375.

Stewart H, Morgan L, Jessen K, Mirsky R (1993). "The relationship between DNA synthesis, embryonic development and myelination in the rat sciatic nerve." *Eur J Neurosci* 5: 1136-1144.

Stewart H, Zoidl G, Rossner M, Brennan A, Zoidl C, Nave K, Mirsky R, Jessen K, Richardson W (1997). "Helix-loop-helix proteins in Schwann cells: a study of regulation and subcellular localization of Ids, REB and E12/47 during embryonic and postnatal development." *J Neurosci Res* 50: 684-701.

Sugitani Y, Nakai S, Minowa O, Nishi M, Jishage K, Kawano H, Mori K, Ogawa O, Noda T (2002). "Brn-1 and Brn-2 share crucial roles in the production and positioning of mouse neocortical neurons." *Genes Dev* 16: 1760-1765.

Sukhatme V, Cao X, Chang L, Tsai M, Stamenkovich D, Ferreira P, Cohen D, Edwards S, Shows T, Curran T (1988). "A zinc finger-encoding gene coregulated with c-fos during growth and differentiation, and after cellular depolarization." *Cell* 53: 37-43.

Sun X, Copeland N, Jenkins N, Baltimore D (1991). "Id proteins Id1 and Id2 selectively inhibit DNA binding by one class of helix-loop-helix proteins." *Mol Cell Biol* 11: 5603-5611.

Sunderland S (1991). *Nerve injuries and their repair - a critical appraisal*. Edinburgh, Longman.

Suter U, Moskow J, Welcher A, Snipes G, Kosaras B, Sidman R, Buchberg A, Shooter E (1992a). "A leucine-to-proline mutation in the putative 1st transmembrane domain of the 22-kDa peripheral myelin protein in the Trembler-J mouse." *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 4382-4386.

Suter U, Snipes G, Schoener-Scott R, Welcher A, Pareek S, Lupski J, Murphy R, Shooter E, Patel P (1994). "Regulation of tissue-specific expression of alternative peripheral myelin protein-22 (PMP22) gene transcripts by two promoters." *J Biol Chem* 269(41): 25795-25808.

Suter U, Welcher A, Ozcelik T, Snipes G, Kosaras B, Francke U, Billings G, Sidman R, Shooter E (1992b). "Trembler mouse carries a point mutation in a myelin gene." *Nature* 356: 241-244.

Svaren J, Sevetson B, Apel E, Zimonjic D, Popescu N, Milbrandt J (1996). "NAB2, a corepressor of NGFI-A (Egr-1) and Krox20, is induced by proliferative and differentiative stimuli." *Mol Cell Biol* 18: 3545-3553.

Swirnoff A, Apel E, Svaren J, Sevetson B, Zimonjic D, Popescu N, Milbrandt J (1998). "Nab1, a corepressor of NGFI-A (Egr-1), contains an active transcriptional repression domain." *Mol Cell Biol* 18: 512-524.

Tamura T-A, Konishi Y, Makino Y, Mikoshiba K (1996). "Mechanisms of transcriptional regulation and neural gene expression." *Neurochem Int* 29(6): 573-581.

Tanabe Y, Jessell T (1996). "Diversity and pattern in the developing spinal cord." *Science* 274: 1115-1123.

Tanaka M, Gertsenstein M, Rossant J, Nagy A (1997). "Mash2 acts cell autonomously in mouse spongiotrophoblast development." *Dev Biol* 190: 55-65.

Taub D, Lloyd A, Conlon K, Wang J, Ortaldo J, Harada A, Matsushima K, Kelvin D, Oppenheim J (1993). "Recombinant human interferon-inducible protein 10 is a chemoattractant for human monocytes and T lymphocytes and promotes T cell adhesion to endothelial cells." *J Exp Med* 177: 1809-1814.

Temple S, Raff M (1986). "Clonal analysis of oligodendrocyte development in culture: evidence for a developmental clock that counts cell divisions." *Cell* 44: 773-779.

Thatikunta P, Qin W, Christy B, Tennekoon G, Rutkowski J (1999). "Reciprocal Id expression and myelin gene regulation in Schwann cells." *Mol Cell Neurosci* 14: 519-528.

Thor S, Andersson S, Tomlinson A, Thomas J (1999). "A LIM-homeodomain combinatorial code for motor-neuron pathway selection." *Nature* 397: 76-80.

Thor S, Thomas J (1997). "The *Drosophila* islet gene governs axon pathfinding and neurotransmitter identity." *Neuron* 18: 397-409.

Timmermann V, De Jonghe P, Ceuterinck C, De Vriendt E, Debrabandere S, Lofgren A, Nelis E, Warner L, Lupski J, Martin J, Van Broeckhoven C (1999). "Novel missense mutation in the early growth response gene 2 associated with a Dejerine-Sottas syndrome phenotype." *Neurology* 52: 1827-1832.

Tobler A, Schreiber E, Fontana A (1993). "The human Oct-6 POU transcription factor lacks the first 50 amino acids of its murine counterpart." *Nucl Acid Res* 21(4): 1043.

Topilko P, Levi G, Merlo G, Mantero S, Desmarquet C, Mancardi G, Charnay P (1997). "Differential regulation of the zinc finger genes Krox-20 and Krox-24 (Egr-1) suggests antagonistic roles in Schwann cells." *J Neurosci Res* 50: 702-712.

Topilko P, Meijer D (2001). Transcription factors that control Schwann cell development and myelination. Embryonic and early postnatal development of Schwann cells. Jessen K, Richardson W. Oxford, Oxford University Press.

Topilko P, Schneider-Maunoury S, Levi G, Baron-Van Evercooren A, Ben Younes Chennoufi A, Seltanidou T, Babinet C, Charnay P (1994). "Krox-20 controls myelination in the peripheral nervous system." *Nature* 371: 796-799.

Topilko P, Schneider-Maunoury S, Levi G, Trembleau A, Gourdj D, Driancourt M, Rao C, Charnay P (1998). "Multiple pituitary and ovarian defects in Krox-24 (NGFI-A, Egr-1) targeted mice." *Mol Endocrin* 12: 107-122.

Tsuchida T, Ensini M, Morton S, Baldassare M, Edlund T, Jessell T, Pfaff S (1994). "Topographic organization of embryonic motor neurons defined by expression of LIM homeobox genes." *Cell* 79: 957-970.

Van Den Akker E, Fromental-Ramain C, De Graff W, Le Moullic H, Brulet P, Chambon P, Deschamps J (2001). "Axial patterning in mice lacking all paralogous group 8 Homeobox genes." *Development* 128: 1911-1921.

Wang D, Mayo M, Baldwin A (1997). "Basic fibroblast growth factor transcriptional autoregulation requires EGR-1." *Oncogene* 14: 2291-2299.

Wang S, Sdrulla A, Johnson J, Yokota Y, Barres B (2001). "A role for the helix-loop-helix protein Id2 in the control of oligodendrocyte development." *Neuron* 29: 603-614.

Wang X, Ellison J, Siren A, Lysko P, Yue T, Barone F, Shatzman A, Feuerstein G (1998). "Prolonged expression of interferon-inducible protein-10 in ischemic cortex after permanent occlusion of the middle cerebral artery in rat." *J Neurochem* 71: 1194-1204.

Warner L, Mancias P, Butler I, McDonald C, Keppen L, Koob K, Lupski J (1998). "Mutations in the early growth response 2 (EGR2) gene are associated with hereditary myelinopathies." *Nat Genet* 18: 382-384.

Warner L, Svaren J, Milbrandt J, Lupski J (1999). "Functional consequences of mutations in the early growth response 2 gene (EGR2) correlate with severity of human myelinopathies." *Hum Mol Genet* 8: 1245-1251.

Wegner M (2000). "Transcriptional control in myelinating glia: The basic recipe." *Glia* 29: 118-123.

Wegner M, Drolet W, Rosenfeld M (1993a). "POU-domain proteins: structure and function of developmental regulators." *Curr Opin Cell Biol* 5: 488-498.

Wegner M, Drolet W, Rosenfeld M (1993b). "Regulation of JC virus by the POU-domain transcription factor Tst-1, implications for progressive multifocal leukoencephalopathy." *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 4743-4747.

Weinstein D, Burrola P, Lemke G (1995). "Premature Schwann cell differentiation and hypermyelination in mice expressing a targeted antagonist of the POU transcription factor SCIP." *Mol Cell Neurosci* 6: 212-229.

Westerman B, Poutsma A, Looijenga L, Wouters D, Van Wijk I, Oudejans C (2001). "The human achaete scute homolog 2 gene contains two promoters, generating overlapping transcripts and encoding two proteins with different nuclear localisation." *Placenta* 22: 595-607.

Wilkinson D, Bhatt S, Chavrier P, Bravo R, Charnay P (1989). "Segment-specific expression of a zinc-finger gene in the developing nervous system of the mouse." *Nature* 337(6206): 461-464.

Wolpert L, Beddington R, Brockes J, Jessell T, Lawrence P, Meyerowitz E (1998a). Development of the nervous system. Principles of development. Wolpert R; Brockes J; Jessell T; Lawrence P; Meyerowitz E;. London, Oxford, Oxford University Press: 339-369.

Wolpert L, Beddington R, Brockes J, Jessell T, Lawrence P, Meyerowitz E (1998b). Patterning of the vertebrate body plan II: The mesoderm and the early nervous system. Principles of development. Wolpert L; Brockes J; Jessell T; Lawrence P; Meyerowitz E;. London, Oxford, Oxford University Press.

Wrabetz L, Feltri M, Hanemann C, Müller H (2001). The molecular genetics of hereditary demyelinating neuropathies. Axon-Schwann cell interactions during peripheral nerve degeneration and regeneration. Jessen K, Richardson W. Oxford, Oxford University Press.

Yokota Y (2001). "Id and development." *Oncogene* 20: 8290-8298.

Zorick T, Syroid D, Arroyo E, Scherer S, Lemke G (1996). "The transcription factors SCIP and Krox-20 mark distinct stages and cell fates in Schwann cell differentiation." *Mol Cell Neurosci* 8: 129-145.

Zorick T, Syroid D, Brown A, Gridley T, Lemke G (1999). "Krox-20 controls SCIP expression, cell cycle exit and susceptibility to apoptosis in developing myelinating Schwann cells." *Development* 126: 1397-1406.

8. ANHANG

8.1. DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. Hans Werner Müller danke ich an erster Stelle für die fachliche Betreuung, die gewährte experimentelle Freiheit und großzügige Förderung der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. H.-P. Hartung danke ich für die Möglichkeit, in der Neurologischen Klinik diese Dissertation anzufertigen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Patrick Küry für seine fachliche Supervision, unermüdliche Diskussionsbereitschaft sowie die praktische Anleitung, die die tägliche Arbeit erleichtert hat. Auch Herrn Dr. Frank Bosse bin ich für seine Mitarbeit und Hilfsbereitschaft zu tiefstem Dank verpflichtet. Herrn Dr. Christian Korfhage danke ich an dieser Stelle für die Initiierung des Projektes.

Allen Mitarbeitern des Neurochemischen Labors, allen voran Herrn Dipl. biol. Ulrich Pippirs und Herrn Dr. Michael Hamacher, möchte ich für das kollegiale Miteinander und die Hilfsbereitschaft danken.

Herrn PD Dr. rer. nat. Heiner Schaal und den Mitgliedern seiner Arbeitsgruppe am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Virologie danke ich für die Möglichkeit, die Experimente zur Optimierung der Transfektionseffizienz in ihrem Labor durchführen zu können.

Frau Jenifer Vogel bin ich für die immerwährende moralische Unterstützung, die viel zum Abschluß dieses Projektes beigetragen hat, tief verbunden.

8.2. LEBENSLAUF

Name: Tim Patrick Jürgens
Anschrift: Prinzenweg 8, 93047 Regensburg
Geburtsdatum: 15. August 1974
Geburtsort: Haan
Staatsangehörigkeit: deutsch
Eltern: Gabriele Jürgens-Till, geb. Till
Selbstständig
Christoph Jürgens
Gymnasiallehrer

Bildungsgang:

1981-1985: Don-Bosco-Schule, Haan
1985-1993: Städt. Gymnasium, Haan
mit Abschluß Abitur (Note 1.2)
1993-1994: Studium Chemie, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
1994-2001: Studium Humanmedizin
Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
März 1996: Bestehen der Ärztlichen Vorprüfung
September 1997: Bestehen des Ersten Abschnittes der Ärztlichen Prüfung
September 2000: Bestehen des Zweiten Abschnittes der Ärztlichen Prüfung
13. November 2001: Bestehen der Ärztlichen Prüfung (Gesamtnote 2.16)
Praktisches Jahr: Innere Medizin, Nephrologie/Rheumatologie, Prof. Dr. med. B. Grabensee, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Chirurgie, Dr. med. M. Furrer, Ospidal Val Müstair, Sta. Maria i.M., Schweiz
Neurologie, Dr. med. H. Kaube, Institute of Neurology/National Hospital for Neurology and Neurosurgery, Queen Square, London, GB

Stipendien:

- 1995-2000: Studienbegleitendes Stipendium der Konrad-Adenauer-Stiftung, St. Augustin
- 1997-1999: Kollegiat im Graduiertenkolleg „Pathologische Prozesse: Vom Gen zum Verhalten“, gefördert durch die Deutsche Forschungsgesellschaft

Beruflicher Werdegang:

- 2002-2003: Arzt im Praktikum in der Neurologischen Universitätsklinik Regensburg, Prof. Dr. med. U. Bogdahn
- seit 2003: Assistenzarzt in der Neurologischen Universitätsklinik Regensburg, Prof. Dr. med. U. Bogdahn