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

Untersuchung des Transkriptionsfaktors Mash2 und der von ihm regulierten Zielgene bezüglich ihres Einflusses auf Proliferation und Apoptose von Schwannzellen

Dissertation

zur
Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt von
Christiane Cornely
2006

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

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Bernd Nürnberg

Dekan

Referent: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Patrick Küry

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. med. Guido Reifenberger

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

1.1	Schwannzellen	01
1.2	Proliferation und Apoptose	06
1.3	Mammalian Achaete Scute Homolog 2 (Mash2)	09
1.4	Ziel der Doktorarbeit	11

2. Material und Methoden

2.1	Material	
2.1.1	Zellkultur, Proliferations- und Apoptoseanalysen	13
2.1.2	Molekularbiologische Experimente	14
2.2	Methoden	
2.2.1	Primäre Schwannzellkultur	17
2.2.2	Transfektion	17
2.2.3	Magnetisches Zellsortieren (MACS)	18
2.2.4	Proliferationsversuch	19
2.2.4.1	BrdU-Inkorporation	19
2.2.4.2	Immunhistochemie	19
2.2.5	Apoptoseversuch	20
2.2.6	RNA-Extraktion	22
2.2.7	Reverse Transkription	23
2.2.8	Polymerasekettenreaktion (PCR)	23
2.2.9	Agarose-Gelelektrophorese	23
2.2.10	Aufreinigung der PCR-Produkte	24
2.2.11	Klonierung	24
2.2.12	Transformation	25
2.2.13	Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*	25
2.2.13.1	Plasmid-Minipräparation	25
2.2.13.2	Plasmid-Maxipräparation	26

2.2.13.3 Restriktion der DNA 26
2.2.13.4 Dephosphorylierung 26
2.2.13.5 Isolierung und Reinigung von DNA-Fragmenten 27
2.2.14 Sequenzierung 27
2.2.15 Ligation in pIRES2EGFP Expressionsvektor 27
2.2.16 Quantitative Polymerasekettenreaktion (Q-PCR) 28

3. Ergebnisse

3.1 Proliferationsanalysen
3.1.1 Proliferationsbedingungen von Schwannzellen 30
3.1.2 Proliferationsanalyse nach Überexpression von Mash2 33
3.1.3 Proliferationsanalyse nach Stimulation mit Mob-1 37
3.1.4 Proliferationsanalyse nach Stimulation mit SDF-1α 39
3.2 Apoptoseanalysen
3.2.1 Apoptoseanalyse unstimulierter Schwannzellen 40
3.2.2 Apoptoseinduktion durch Staurosporin 41
3.2.3 Apoptoseinduktion mittels TNFα 42
3.2.4 Apoptoseinduktion mit TNFα in Kombination mit TGFβ 43
3.2.5 Apoptoseinduktion mit SDF-1α 44
3.2.6 Apoptoseanalyse nach Stimulation mit Mob-1 46
3.2.7 Apoptoseanalyse nach Überexpression von Mash2 an unstimulierten Schwannzellen und nach Apoptoseinduktion durch Staurosporin, TNFα in Kombination mit TGFβ und SDF-1α 47
3.3 p57kip2
3.3.1 Klonierung und Sequenzierung von p57kip2 52
3.3.2 Analyse der p57kip2-transfizierten Zellen mittels quantitativer PCR 55
3.3.3 Apoptoseanalyse nach Überexpression von p57kip2 57

4. Diskussion

4.1 Mash2 und seine Zielgene 60

4.2 Schwannzellproliferation 70
4.3 Schwannzellapoptose 75

6. Literaturverzeichnis 81

7. Abkürzungen 101

8. Danksagung 102

9. Lebenslauf 103

10. Zusammenfassung

1. Einleitung

1.1 Schwannzellen

Nervenfasern stellen eine Einheit aus Axon und der zur Glia gehörenden Axonscheide dar. Im peripheren Nervensystem (PNS) bilden Schwannzellen die Hauptpopulation der Gliazellen. Erstmals beschrieben wurden die Schwannzellen vom Anatom und Physiologen Theodor Schwann (1810-1880). In adulten Nerven dienen sie vor allem dazu, eine schützende Markscheide um die Axone der Neuronen zu bilden und diese je nach Kaliberstärke des Axons zu myelinisieren. Im zentralen Nervensystem (ZNS) übernehmen Oligodendrozyten diese Funktion. Es besteht eine enge Beziehung zwischen Umfang der Markscheide und Dicke des Axons. Jeweils Teile des Achsenzylinders einzelner großkalibriger Axone mit einem Durchmesser >1µm werden von einer Schwannzelle umhüllt, die Myelin in das umhüllende Neurolemm einlagert. Die isolierende Myelinscheide ist in bestimmten Abständen jeweils an der Stelle der Ranvierschen Schnürringe unterbrochen, wodurch eine saltatorische Erregungsleitung und somit eine schnellere Fortleitung von Aktionspotentialen ermöglicht wird. Axone schmaleren Kalibers (<1µm) werden in Bündeln von 6-12 Axonen von den Zytoplasmaausläufern einer Schwannzelle umschlossen und bleiben unmyelinisiert, was eine deutlich langsamere Erregungsleitung zur Folge hat. Weiterhin gibt es noch spezialisierte Schwannzellen, die als sogenannte perisynaptische Zellen oder Mantelzellen die motorische Endplatte bedecken und eine wichtige Rolle im Zusammenhalt der motorischen Einheit spielen [Son und Thompson, 1995; Trachtenberg und Thompson, 1996; Lubischer und Bebinger, 1999; Rochon *et al*., 2001] Außer an der Markscheidenbildung sind Schwannzellen aber auch an der Entwicklung und Erhaltung von peripheren Nerven maßgeblich beteiligt [Mirsky *et al*., 2002].

Die Entwicklung der Schwannzelle von einer multipotenten Neuralleistenzelle zu einer differenzierten adulten Schwannzelle verläuft über verschiedene Zwischenstufen, die jeweils von bestimmten exogenen und endogenen Faktoren abhängig sind und durch unterschiedliche Genexpressionsmuster charakterisiert werden [Lobsiger *et al.*, 2002]. Schwannzellen entstehen aus den Neuralleistenzellen, wie auch der Großteil der anderen Komponenten des peripheren Nervensystems. Neuralleistenzellen

stammen aus dem Neuroepithel am dorsalen Ende des sich schließenden Neuralrohrs [Liem *et al*., 1995; La-Bonne und Bronner-Fraser, 1999] und stellen eine Population von migrationsfähigen, multipotenten Stammzellen dar, die zu den Bestandteilen des PNS, aber auch, je nach axialem Niveau, zu Melanozyten, zu kraniofaszialen Knorpel- und Knochenelementen, zu glatten Muskelzellen, die den Ausflusstrakt des Herzens und den Aortenbogen bilden [Chrezzo *et al*. 1998], und zu chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks differenzieren können. Induziert werden die Neuralleistenzellen durch das Bone Morphogenetic Protein (BMP-4), das von dem der Neuralplatte anliegenden Ektoderm sezerniert wird [Liem *et al*., 1995]. BMP ist ebenfalls verantwortlich für die Ablösung vom Neuralrohr mit anschließender Migration nach lateral-ventral [Sela-Donenfeld und Kalcheim, 1999, 2000]. Dazu kommt es um den Embryonaltag 9-10 (E9-E10) herum. Dabei begleiten die potentiellen Schwannzellen aussprossende motorische und sensorische Nervenbündel in die Peripherie, oder sie bilden die Spinalganglien der Hinterwurzeln, in denen die sensorischen Neurone lokalisiert sind. Sobald die potentiellen Schwannzellen ihr Zielgewebe erreicht haben, beginnen sie zu differenzieren. Aus den multipotenten Neuralleistenzellen entstehen unter dem Einfluss des von den Neuronen sezernierten ß-Neuregulins etwa ab dem 12. Embryonaltag Schwannzellvorläuferzellen [Shah *et al*., 1994]. Als weiteres gliogenes Signal im peripheren Nervensystem ist das aktivierte Notch beschrieben worden [Morrison *et al*., 2000; Wakamatsu *et al*., 2000]. Die Neuralleistenzellen exprimieren das Intermediärfilament Protein Nestin, Sox10 als ersten Gliamarker und den low affinity Nerven-Wachstumsfaktor Rezeptor p75 LNGFR [Jessen *et al*., 1994; Lobsiger *et al*., 2000]. Die Schwannzellvorläuferzellen exprimieren wie die Neuralleistenzellen Nestin, Sox10 und p75 LNGFR, darüber hinaus aber auch das Wachstums-assoziierte Protein 43 (GAP43), die Transkriptionsfaktoren Krox-24 und Oct-6 (SCIP), sowie in niedrigen Konzentrationen die Myelinproteine Protein 0 (P0) und Peripheres Myelin Protein 22 (PMP22) [Jessen *et al*., 1994; Blanchard *et al*., 1996; Hagedorn *et al*.; 1999]. Die Schwannzellvorläuferzellen besitzen weiterhin ein hohes migratorisches Potential. Am Tag E16.5 findet die Differenzierung von Schwannzellvorläuferzellen zu frühen Schwannzellen statt [Jessen *et al*., 1994]. Der Differenzierungsprozess läuft sehr schnell und synchronisiert ab. Im Unterschied zu den Schwannzellvorläuferzellen zeichnen sich die frühen Schwannzellen durch eine starke Expression des kleinen Kalziumbindungsproteins S 100, der Formation des sulfatierten Galaktozerebrosid O4-Antigens und der Expression des Intermediärfilamentes

Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) aus [Jessen *et al*., 1990, 1994; Mirsky *et al*., 1990]. Ebenfalls hochreguliert werden die Transkriptionsfaktoren Oct-6 [Arroyo *et al*., 1998] und Krox-20, während Krox-24 herunterreguliert wird. Auch morphologische Unterschiede sind erkennbar: die bipolare Form der frühen Schwannzellen unterscheidet sich deutlich von der flachen, epithelähnlichen Morphologie der Schwannzellvorläuferzellen [Lobsiger *et al*., 2001]. Anders als die Schwannzellvorläuferzellen, die bei Verlust des axonalen Kontaktes umgehend den Zelltod via Apoptose einleiten, sind frühe Schwannzellen in der Lage, auch ohne das Axon und die von ihm sezernierten Wachstumsfaktoren, insbesondere ß-Neuregulin, zu überleben. Daher nimmt man an, dass frühe Schwannzellen einen autokrinen Überlebenskreislauf besitzen [Jessen *et al.,* 1994]. Zwischen Embryonaltag 17 und Postnataltag 7 wird die korrekte Anzahl an Schwannzellen pro Axon reguliert, so dass es zum apoptotischen Zelltod zahlreicher Schwannzellen und Neurone kommt [Meier *et al*., 1999]. Die verbleibende Anzahl der Neurone wird vom einerseits vom Zielgewebe bestimmt, andererseits aber auch von der Zahl der Schwannzellen. Diese wird wiederum auch von der Zahl der Axone reguliert [Grinspan *et al*., 1996; Sancho *et al*., 2001]. Differenzierung und Überleben im PNS scheinen somit durch ein Zusammenspiel zwischen den sich entwickelnden Schwannzellen und Neuronen bestimmt zu sein [Mirsky und Jessen, 1999]. Die frühen Schwannzellen differenzieren um den Geburtstermin herum zu reifen Schwannzellen, die sich in myelinisierende und nicht-myelinisierende Schwannzellen einteilen lassen. Bei den myelinisierenden Schwannzellen kommt es zu einer Herunterregulation des Rezeptors p75 LNGFR, während alle Myelingene (wie z. B. P0, PMP22, MBP) und der Transkriptionsfaktor Krox-20 hochreguliert werden. Dagegen finden sich in nicht-myelinisierenden Schwannzellen niedrige Niveaus an Myelingenen, aber hohe Konzentrationen des Transkriptionsfaktors Krox-24. Zu welchem dieser reifen Schwannzelltypen eine Zelle differenziert, hängt von dem Kaliber des Axons ab, den sie umgibt. Auf molekularer Ebene sind in diesen Prozess die drei Transkriptionsfaktoren Oct-6, Krox-20 und Sox10 involviert [Wegner, 2000]. Ebenfalls wichtig für die Induktion der Myelinisierung ist das vom Axon ausgehende ß-Neuregulin-Signal, bei dem es zur Aktivierung einer Phosphoinositidyl-3-Kinase kommt. An Positionierung und Aufrechterhaltung des Myelins ist ß-Neuregulin jedoch nicht mehr beteiligt [Dong *et al*., 1999].

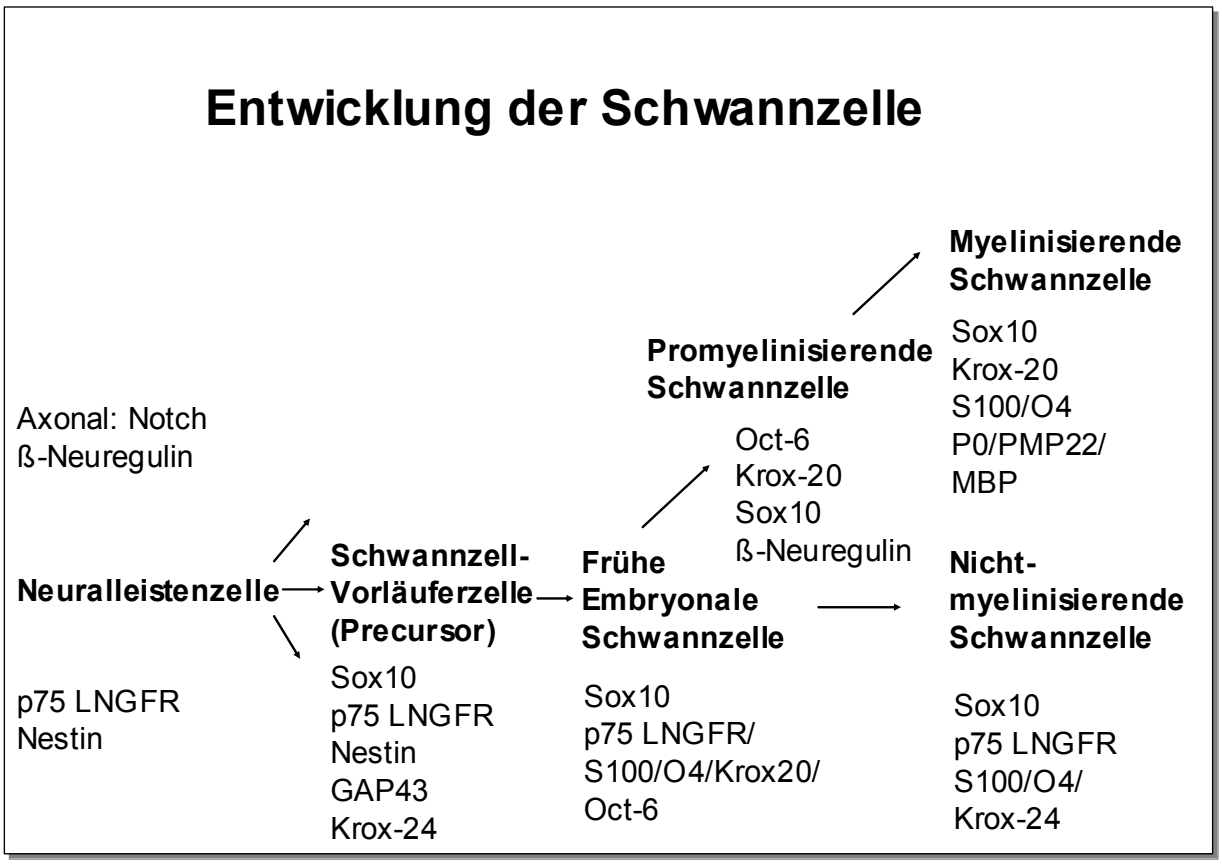


Abb. 1: Entwicklung der Schwannzelle

Die Abbildung zeigt die Entwicklung von der Neuralleistenzelle über die verschiedenen Vorstufen bis zur reifen Schwannzelle. Dabei werden die Gene berücksichtigt, die für die jeweiligen Abschnitte der Entwicklung wichtig sind oder diese markieren.

Das Zusammenspiel zwischen Schwannzellen und Neuronen ist nicht nur für die Entwicklung von Bedeutung, sondern ist auch maßgeblich an der Regeneration von Verletzungen peripherer Nerven beteiligt. Das periphere Nervensystem besitzt gegenüber dem zentralen Nervensystem eine einzigartige Regenerationskapazität, die die Strukturen eines verletzten Nervs wiederherstellen kann, auch wenn adulte Neurone kein Teilungsvermögen mehr besitzen. Nach Axotomie kommt es sowohl proximal als auch distal der Läsion zu spezifischen Veränderungen. Im distalen Axonsegment findet in stereotyper Weise aus Mangel an Nachschub von Nährstoffen die absteigende Waller'sche Degeneration statt, bei der es zum Zerfall des Axons und der Myelinscheide kommt. Die Schwannzellen kehren zu einem Phänotyp zurück, der dem von Schwannzellvorläuferzellen ähnelt, schränken die Expression von Myelingenen ein und beginnen zu proliferieren. Die degenerierten Axon- und Myelinreste werden dann von Schwannzellen und Makrophagen phagozytiert. Zur Regeneration

wird im proximalen Segment des Axons die Proteinsynthese gesteigert, um das benötigte Material zur Ausbildung eines Wachstumskegels zur Verfügung stellen zu können. Dieser Wachstumskegel wächst mit einer Geschwindigkeit von 0,5-3mm pro Tag auf das Zielgewebe zu. Entscheidend für eine erfolgreiche Reinnervation ist das Vorhandensein einer Leitstruktur, die den Weg zum Zielorgan weist. Diese Leitschiene, die auch als Hanke-Büngner Band bezeichnet wird, wird von der noch bestehenden Basallamina des degenerierten Axons und von den neu proliferierenden Schwannzellen, die sich entlang des degenerierten Segmentes aufreihen, gebildet. Das axonale Auswachsen wird zudem mittels Sekretion von Nervenwachstumsfaktoren durch Schwannzellen und umgebenes Bindegewebe stimuliert. Nach Auswachsen des Axons entlang der Leitschiene und Wiederherstellung des Kontaktes zu den umgebenen Schwannzellen, induziert es ihre Redifferenzierung und erneute Myelinisierung. Schwannzellen sind also sowohl an der Degeneration als auch an der Regeneration von Verletzungen im Bereich des peripheren Nervensystems beteiligt [Kürry *et al*., 2001; Reichert, 2000; Schiebler *et al*., 1997].

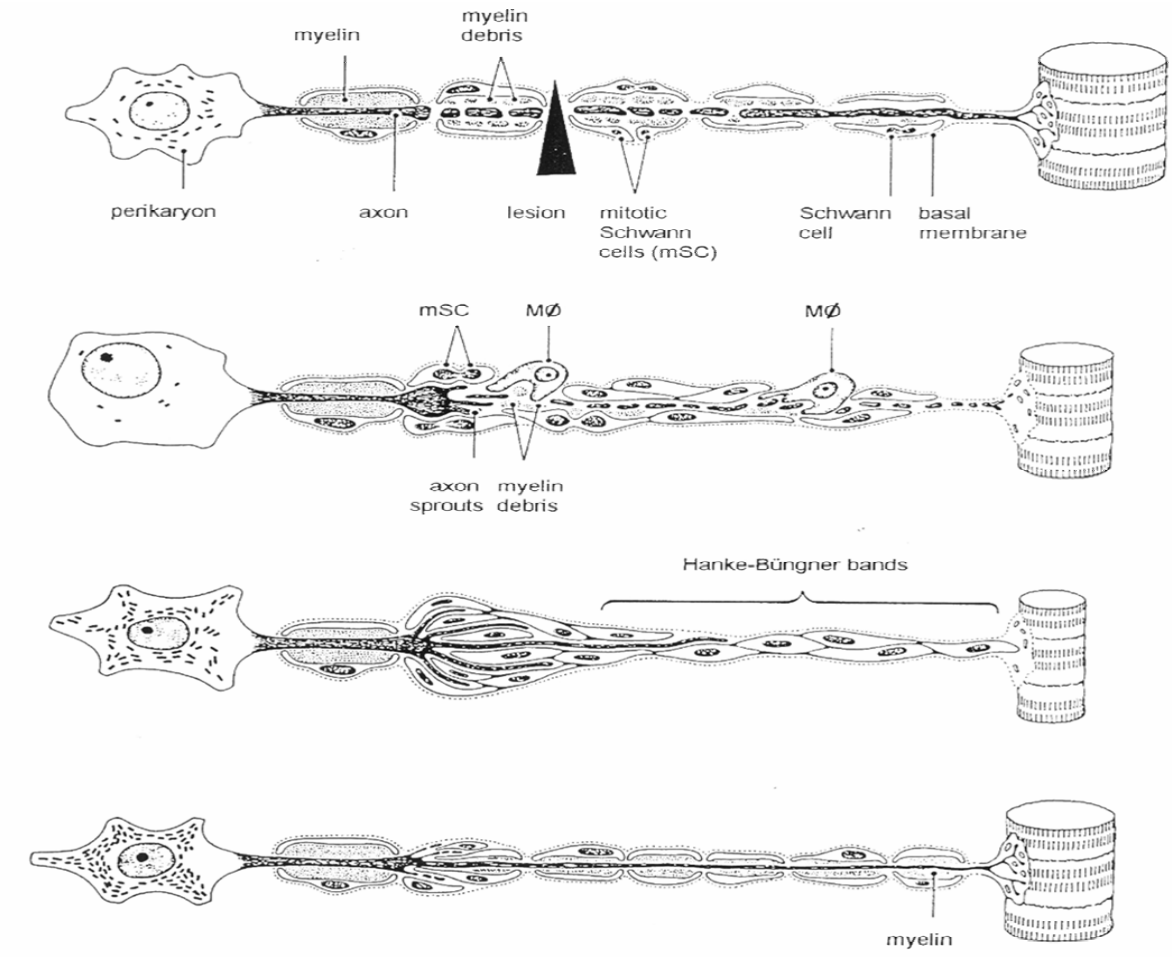


Abb. 2: Regeneration eines axotomierten Motoneurons

Nach der Läsion kommt es zur Degeneration des distalen Axonsegments, sowie zur Proliferation von Schwannzellen und zur Phagozytose der degenerierten Axon- und Myelinfragmente durch Schwannzellen und Makrophagen (Mø). Am regenerierenden Ende des proximalen Axonsegments bildet sich ein Wachstumskegel aus, der entlang des Hanke-Büngner-Bandes, das aus Basallamina und Schwannzellen besteht, in Richtung des denervierten Zielgewebes auswächst. Nach erfolgter Reinnervation beginnen die Schwannzellen erneut, Myelin zu produzieren.

1.2 Proliferation und Apoptose

Zu den wichtigsten Zellfunktionen, die im Nervensystem für Entwicklung, Überleben und Erhaltung der Plastizität erforderlich sind, zählen Proliferation, Apoptose, Migration und Differenzierung. Als Proliferation wird die quantitative Zunahme der Zellzahl durch Zellteilung bezeichnet. Diesem Prozess liegt der mitotische Zellzyklus zugrunde. Als Motoren der Zellzyklusmaschinerie dienen die Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK's), die unter der engmaschigen Kontrolle sowohl von positiven als auch von negativen Regulatoren stehen [Lee und Yang, 2001]. Der mitotische Zellzyklus von Säugetieren lässt sich in vier Phasen einteilen: Mitose (M-Phase), erste Ruhephase (G_1), Synthesephase der genomischen DNA (S) und zweite Ruhephase (G_2), auf die wiederum die Mitose folgt. Die Progression von einer Phase zur nächsten wird durch Cyclin-abhängige Kinasen und ihre assoziierten Cyclin-Untereinheiten reguliert. Die CDK's werden aktiviert durch Assoziation mit Cyclinen zu Heterodimeren, bzw. durch Phosphorylierung oder Dephosphorylierung von bestimmten Abschnitten. In der G_1-Phase kommt es entweder zum Eintritt in eine weitere Runde der Zellteilung, zum permanenten Austreten aus dem Zellzyklus oder zu einem transienten Austritt in die ruhende G_0-Phase. Tritt die Zelle unter Einfluss mitogener Stimuli in einen neuen Zellzyklus ein, benötigt sie das Vorhandensein der D-Cycline 1,2 und 3 und der CDK's 4 und 6, bis ein bestimmter Grenzpunkt überschritten wird, von dem an die Zelle ihr Genom replizieren und den Zellzyklus unabhängig beenden kann. Die G_2-Phase zwischen DNA-Synthese und Mitose dient der Korrektur von Replikationsfehlern und Strangbrüchen während der Synthesephase, sowie der Vorbereitung auf die Mitose. Der Übergang in S-, G_2- und M-Phase wird durch Cyclin E/CDK2, Cyclin A/CDK2 und Cyclin B/CDK1 vermittelt [Cunningham und Roussel, 2001; Pardee, 1989, Nurse, 1994; Nigg, 1995].

Die negative Regulation der Cyclin-Cyclin-abhängigen Kinasen-Komplexe und damit der Zellproliferation unterliegt den Inhibitoren der Cyclin-abhängigen Kinasen (CDKI's). Die CDKI's stellen eine Gruppe von kleinen Polypeptiden dar, die in zwei Familien unterteilt werden: die Ink4-Familie, Inhibitoren der CDK 4/6, zu denen p16Ink4a, p15Ink4b, p18Ink4c und p19Ink4d zählen und die Cip/Kip-Familie, die aus p21cip1, p27kip1 und p57kip2 besteht [Ruas und Peters, 1998; Sherr und Roberts, 1999]. Die Cip/Kip-Proteine sind Inhibitoren der Cyclin E- und A-CDK2 und Cyclin B-CDK1-Komplexe. p21cip1 und p27kip1 können aber gleichzeitig auch als positive Regulatoren des Cyclin D-CDK 4/6 Komplexes in der frühen G_1-Phase auftreten [La-Baer *et al*., 1997; Cheng *et al*., 1999].

Apoptose oder programmierter Zelltod ist ein energieabhängiger, stets stereotyp ablaufender Prozess, der zum Zelluntergang führt und weitgehend an Einzelzellen stattfindet. Ausgelöst wird er durch Mangel an nutritiven Faktoren oder durch Vorhandensein von Faktoren, die das Überleben negativ beeinflussen. Apoptose ist zu Beginn histomorphologisch charakterisiert durch Chromatinmargination und Kondensation des Zellkerns. Später nimmt die Kondensation zu, bis der Kern aufbricht (=Karyorhexis) und in einzelne Fragmente zerfällt. Die Kondensation des Zellkörpers findet unter Erhalt der Zellorganellen statt und führt zur Bildung von Abschnürungen, die dicht mit Chromatinresten und Zellorganellen gepackt sind und als sogenannte apoptotische Körperchen bezeichnet werden. Diese werden später von benachbarten Makrophagen unter Ausbleiben einer Entzündungsreaktion phagozytiert [Kerr *et al*., 1972; Kerr *et al*., 1994]. Biochemische Grundlage der Apoptose ist die internukleosomale Degradation der DNA in Fragmente von 180-200 Basenpaaren Länge durch selektiv aktivierte DNAsen. Diese Fragmente lassen sich mittels Elektrophorese nachweisen. DNAsen liegen im Cytoplasma der Zellen als inaktiver Komplex gemeinsam mit einem spezifischen Inhibitor vor. Während der Apoptose kommt es zur Aktivierung von Caspasen, die als intrazelluläre Proteasen ihre Substrate spezifisch hinter Aspartatresten spalten und für die Ablösung der inhibitorischen Proteine von dem DNAse-Komplex verantwortlich sind. Aktiviert werden die Caspasen durch Oberflächenrezeptoren und proapoptotische mitochondriale Proteine [Enari *et al*., 1998; Wyllie, 1980; Sanejima *et al*., 1998; Thornberry und Lazebnik, 1998]. Caspasen stellen somit einen Angriffspunkt dar, um den Ablauf der Apoptose zu verhindern. Ein apoptotischer Prozess dauert etwa 12-24h, erste morphologische Kriterien

können aber schon nach 2h unter dem Lichtmikroskop nachgewiesen werden. Der Apoptose gegenüber steht der nicht-apoptotische Zelluntergang, der als Nekrose bezeichnet wird und zum Beispiel als Folge einer Ischämie auftritt. Charakteristisch sind Entleerung der intrazellulären ATP-Speicher, Verlust des Membranpotentials, gesteigerte Permeabilität der Zellmembran mit konsekutivem osmotischen Wassereinstrom, sowie Anschwellen und Ruptur der Zellen und Zellorganellen und Auslösung einer Entzündungsreaktion im nekrotischen Gewebe. Nekrose betrifft im Gegensatz zur an Einzelzellen stattfindenden Apoptose immer Gruppen von Zellen [Majno und Joris, 1995]. Der Prozess der Apoptose ist ein wichtiger Bestandteil der Entwicklung des peripheren Nervensystems, welche auf Interaktionen zwischen Schwannzellen und den neuronalen Axonen beruht. Dabei kommt es zunächst zur Proliferation der Schwannzellen, an die sich eine Phase der Migration entlang der Axone anschließt. Postnatal kommt es dann zur terminalen Differenzierung und Myelinbildung (s.o.). Nach Abschluss der Entwicklung müssen die überzähligen Schwannzellen mittels Apoptose eliminiert werden, um ein konstantes 1:1 Verhältnis zwischen Axon und der es umgebenden Schwannzelle zu erreichen. Bei der Modulation der postnatalen Schwannzellzahl spielt der programmierte Zelltod also eine bedeutende Rolle, ebenso aber auch nach Schwannzellproliferation im Rahmen einer Läsion von adulten Nerven. Besonderes Interesse liegt daher an der Identifikation von Genen und Proteinen, die regulierend in den Prozess der Apoptose von Schwannzellen eingreifen können.

1.3 Mammalian Achaete Scute Homolog 2 (Mash2)

Das Mammalian Achaete Scute Homolog Gen 2 (Mash2) ist, wie das verwandte Mash1, zuerst in einer Zelllinie aus sympathischen neuronalen Vorläuferzellen aus der Neuralleiste von Ratten entdeckt worden, und stellt eine der Säugetierhomologien zum „Achaete-Scute“ Komplex der *Drosophila melanogaster* dar [Johnson *et al*., 1990; Guillemot *et al*., 1994]. Diese Gene spielen eine wichtige Rolle in der neuralen Entwicklung der *Drosophila melanogaster.* Das Mash2-Gen enthält ein „basic helix-loop-helix“-Motiv, dass eine DNA-Bindungsdomäne kodiert [Villares und Cabrera, 1987; Ghysen and Dambly-Chaudiere, 1988; Campuzano and Modolell, 1992]. Mash2 gehört damit wie MyoD und E12 zur Klasse B der bHLH-Familie der

Transkriptionsfaktoren. Diese Gruppe agiert charakteristisch als A/B Heterodimere und bindet ihre Zielgene über E-Box Bindungsstellen in den Promotorregionen [Johnson *et a*l., 1992]. Interessanterweise ist die Sequenz der bHLH-Region von Mash1 und Mash2 den Genen des „Achaete-Scute" Komplex ähnlicher als denen der anderen Mitglieder der bHLH-Familie aus Säugetieren [Johnson *et al*., 1990]. Mash2 konnte in einer Gruppe von „imprinted" Genen auf dem distalen Ende von Chromosom 7 der Maus, bzw. auf dem humanen Chromosom 11p15.5 lokalisiert werden [Guillemot et al., 1995; Hatada und Mukai, 1995; Matusoka *et al.*, 1995]. Genomisches „Imprinting" bezeichnet einen epigenetischen Prozess, bei dem es zur unterschiedlichen Expression eines Gens in Abhängigkeit von der Vererbung über die väterliche oder mütterliche Gametogenese kommt. Dabei wird entweder das väterliche oder mütterliche Allel funktionell ausgeschaltet [Guillemot *et al*., 1995]. Zur selben Ansammlung von „imprinted" Genen am distalen Ende von Mauschromosom 7 gehören H19, Kvlqt1 und p57kip2, bei denen wie bei Mash2 das maternale Allel exprimiert und das väterliche Allel inaktiviert wird, daneben Igf2 und Insulin2, bei denen das väterliche Allel zur Expression kommt [Capary *et al*., 1998]. Die genauen Kontrollmechanismen, die zum genomischen „Imprinting" führen, sind noch nicht genau bekannt, für einige Gene nimmt man den Prozess der Methylierung von DNA-Strängen an. Für Mash2 konnte dagegen nachgewiesen werden, dass das „Imprinting" auch in Methyltransferase-Knockout-Mäusen stattfindet und somit die Methylierung nicht der Hauptmechanismus zur Ausschaltung des väterlichen Allels sein kann [Dell *et al*., 2001]. Möglicherweise spielt dabei die allelspezifische Chromatinkonformation eine Rolle [Tanaka *et al*., 1999].

Während für Mash1 ein Einfluss auf Entwicklung und Differenzierung von Neuronen nachgewiesen werden konnte [Guillemot, 1999], schien Mash2 lange Zeit nur eine Rolle bei der Entwicklung des Trophoblasten während der frühen Embryogenese zu spielen. Mash2 kodiert dabei ein trophoblastenspezifisches Protein, das verantwortlich für die Differenzierung von Trophoblastenzellen zu Spongiotrophoblastenzellen ist. Die Entwicklung der Trophoblasten-Riesenzelllinie oder der Synzytiotrophoblastenzellen, die ebenfalls aus den Stammzellen des Trophoblasten hervorgehen, bleibt von Mash2 unbeeinflusst und unterliegt der Regulation anderer Gene [Guillemot *et al*., 1994; Tanaka *et al*., 1997]. Mash2$^{-/-}$ Embryos sterben am 10. Tag *post conceptionem* aufgrund von Plazentainsuffizienz. In den untersuchten Plazenten

fehlten Spongiotrophoblastenzellen ebenso wie ihre Vorläufer [Guillemot *et al*., 1994]. In gesunden Mausembryonen kommt es während der postimplantatorischen Phase zu einer starken Expression von Mash2 in den diploiden Trophoblastenzellen [Guillemot *et al*., 1994]. Allerdings wurden Transkripte von Mash2 auch während der Oogenese und in allen Zellen des präimplantatorischen Embryos entdeckt, auf die diploiden Trophoblastenzellen ist es erst zum Zeitpunkt der Implantation beschränkt. Die starke Expression in den Trophoblastenzellen besteht bis zum 12. Tag *p.c*., danach kommt es zu einem Abfall der Transkripte [Rossant *et al*., 1998]. Dieses Expressionsmuster ließ die Vermutung zu, dass das maternale Mash2 auch an der Entwicklung der Blastozyste oder an der Implantation beteiligt ist, die These konnte aber durch Experimente an tetraploiden Mäusen widerlegt werden [Rossant *et al*., 1998].

Abseits von der Plazentaentwicklung konnte aber mittels RT-PCR gezeigt werden, dass Mash2 auch von Rattenschwannzellen des adulten Ischiasnervs und von Rattenschwannzellen in Zellkulturen exprimiert wird [Küry *et al.*, 2002]. Sowohl nach Durchtrennung als auch nach Quetschung von Ischiasnerven der Ratte kam es zur transienten Herabregulierung der Expression von Mash2, was einen Zusammenhang impliziert zwischen niedrigen Mash2-Konzentrationen und Waller´scher Degeneration. In der Rolle als Transkriptionsfaktor besteht die Hauptfunktion von Mash2 aus der Regulation von Genaktivität untergeordneter Zielgene. Um die Rolle von Mash2 im peripheren Nervensystem genauer verstehen zu können, war es somit wichtig, die Zielgene von Mash2 zu identifizieren. Dies gelang mit Hilfe von Genexpressions-Arrays an Mash2-überexprimierenden Schwannzellen. Dabei zeigte sich, dass es zu einer Suppression des Transkriptionsfaktorgens Krox-24 durch erhöhte Mash2-Konzentrationen kam. Ebenso sank die Expression des Chemokins Mob-1/IP-10/CRG-2, dahingegen kam es zum Anstieg der Expression des Chemokinrezeptorgens CXCR4. Ergebnisse von Analysen mit quantitativer real-time RT-PCR bestätigten, dass Krox-24 und Mob-1 direkt durch Mash2 herunterreguliert werden, CXCR4 dagegen durch Mash2 induziert wird. Immunhistochemisch konnten Mash2, Krox-24, Mob-1 und CXCR4 im Zellkern von myelinisierenden Schwannzellen kolokalisiert werden. Weiterhin konnte mittels quantitativer real-time RT-PCR demonstriert werden, dass p57kip2, ein Inhibitor cyclin-abhängiger Kinasen, durch Überexpression von Mash2 stark induziert wird. Mash2 kann also abhängig vom Zielgen sowohl als

Transkriptionsaktivator (CXCR4 und p57kip2) als auch als Transkriptionsinhibitor (Krox-24, Mob-1) agieren [Küry *et al.*, 2002]. Eine genauere Betrachtung der Eigenschaften und Funktionen der Zielgene von Mash2, die möglicherweise Rückschlüsse auf die Rolle von Mash2 im peripheren Nervensystem erlauben, soll im Diskussionsteil vorgenommen werden.

1.4 Ziel der Doktorarbeit

Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle des Transkriptionsfaktors Mash2 im peripheren Nervensystem zu analysieren. Dabei sollten auch die Funktionen der von ihm regulierten Zielgene, zu denen der Transkriptionsfaktor Krox-24, das Chemokin Mob-1, der Chemokinrezeptor CXCR4 und der Inhibitor Cyclin-abhängiger Kinasen p57kip2 gehören, untersucht werden. Proliferation und Apoptose zählen zu den elementaren Funktionen, die einerseits den Fortbestand einer einzelnen Zelle bestimmen, andererseits aber auch für die Entwicklung so komplexer Systeme wie des Nervensystems verantwortlich sind. Da Mash2 in seiner Funktion als Transkriptionsfaktor die Genexpression von Schwannzellen reguliert, ist es von Interesse, seinen Einfluss auf diese wichtigen Zellfunktionen zu untersuchen und dabei herauszufinden, inwiefern seine Zielgene als Mediatoren dieser Effekte agieren. In dieser Arbeit lag die Konzentration auf der Untersuchung von Proliferation und Apoptose, da diese Zellfunktionen bestimmend auf die Interaktionen zwischen Neuronen und Schwannzellen wirken. So wird während der Entwicklung des peripheren Nervensystems über den programmierten Zelltod die Zahl der Schwannzellen pro Axon reguliert, dahingegen ist die Proliferation nach einer Nervenläsion unerlässlich zur Ausbildung einer das Auswachsen des Axons ermöglichenden Leitschiene. Zur Analyse des Proliferations- und Apoptoseverhaltens von Schwannzellen unter unterschiedlichen Bedingungen wurden verschiedene Methoden eingesetzt, die im Weiteren beschrieben werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zellkultur, Proliferations- und Apoptoseanalyse

Material	Firma
5-Brom-2'-deoxyuridin (BrdU)	Roche (Mannheim)
Anti-BrdU-Antikörper	Roche (Mannheim)
Anti-EGFP-Antikörper	Invitrogen (Groningen,NL)
Anti-Kaninchen-Biotin-Antikörper	Roche (Mannheim)
Anti-Maus-Cy-3-Antikörper	Jackson Immuno (West Grove, USA)
Avidin-Alexa-Green	Jackson Immuno (West Grove, USA)
Bovines Serum Albumin (BSA)	Gibco (Karlsruhe)
Deckgläschen	Menzel-Glaser (Braunschweig)
Dulbecco`s Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco (Karlsruhe)
Dulbecco`s Modified Eagle Medium (DMEM) + Hepes	Gibco (Karlsruhe)
Fetales Kälberserum (FCS)	Gibco (Karlsruhe)
Fluoreszenzmikroskop	Nikon (Düsseldorf)
Fluoromount G	Southern Biotechnolgy Associates
Forskolin (Fsk)	Sigma (Deisenhofen)
Fugene 6	Roche (Mannheim)
Glutamin	Gibco (Karlsruhe)
HCl	Merck (Darmstadt)
Hoechst-Kernfärbung 33342	Roche (Mannheim)
In Situ Cell Death Detection Kit, TMR red	Roche (Mannheim)
IP-10	R&D Systems (Wiesbaden)
LabTek Chamber Slights	Nunc (Wiesbaden)
MACS High Gradient Magnetic Seperation Columns	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
MACSelect CD14 MicroBeads	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)

Na$_2$B$_4$O$_7$	Merck (Darmstadt)
Na$_2$-Ethylendiamin-tetraessigsäure (EDTA)	Merck (Darmstadt)
Natriumcitrat	Karl Roth (Karlsruhe)
Paraformaldehyd (PFA)	Merck (Darmstadt)
PBE (= PBS+ bovines Serumalbumin+ EDTA)	Gibco (Karlsruhe)
Penizillin/Streptomyzin	Gibco (Karlsruhe)
Phosphat gepufferte Saline (PBS)	PAA (Linz, Österreich)
Poly-D-Lysin (PDL)	Sigma (Deisenhofen)
SDF-1α	R&D Systems (Wiesbaden)
Staurosporin	Calbiochem (Bad Soden)
TGFβ	R&D Systems (Wiesbaden)
TNFα	R&D Systems (Wiesbaden)
Triton-X-100	Merck (Darmstadt)
Trypsin/EDTA	Gibco (Karlsruhe)
Zellkulturschalen	Greiner (Frickenhausen)

2.1.2 Molekularbiologische Experimente

Material	**Firma**
2-Mercaptoethanol	Merck (Darmstadt)
1 kb-DNA-Leiter	Roche (Mannheim)
10x PCR-Puffer	Qiagen (Hilden)
2x Ligationspuffers	Roche (Mannheim)
5x DNA-Dilutionspuffer	Roche (Mannheim)
5x First Strand Puffer	Roche (Mannheim)
ABI GeneAmp 5700	Applied Biosystems (Foster City, CA)
ABI Prism^{TM} 310 Genetic Analyzer	Applied Biosystems (Foster City, CA)
Agarose	Ampresco
Ampicillin	Boehringer (Mannheim)
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
ddH$_2$O^{DEPC}	

Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma (München)
deoxy-Nukleotidtriphosphat (dNTP)	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
Dithiothreitol (DTT)	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
DyeEx Spin Kit	Qiagen (Hilden)
Ethanol	Merck (Darmstadt)
Ethidiumbromid	Merck (Darmstadt)
Glyzerin	Merck (Darmstadt)
Hot-Star-Taq Polymerase	Qiagen (Hilden)
Kanamyzin	Serva, Heidelberg
LB-Medium	
Merckwasser (Lichrosolv)	Merck (Darmstadt)
MicroAmp Optical Caps	Applied Biosystems (Foster City, USA)
MicroAmp Optical Tubes	Applied Biosystems (Foster City, USA)
Oligodeoxynukleotide	MWG Biotech (Ebersberg)
Oligo(dT) Primer (dT19 GAC)	MWG Biotech (Ebersberg)
Pharmacia S 200 Spin columns	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
pIRES2EGFP-Expressionsvektor	BD Biosciences/ Clontech
QIAex Kit	Qiagen (Hilden)
Qiagen Plasmid Maxi Kit	Qiagen (Hilden)
QIAprep Spin Plasmid Prep Kit	Qiagen (Hilden)
QIAshredder-Säulen	Qiagen (Hilden)
Q-Puffer	Qiagen (Hilden)
RLT-Puffer	Qiagen (Hilden)
RNase	Qiagen (Hilden)
RNasin	Invitrogen (Gromingen, NL)
RNeasy Prep Systems	Qiagen (Hilden)
Sequenziermix (= DNA- Sequencing Kit Big Dye)	Applied Biosystems (Foster City, USA)
Shrimp Alkalische Phosphatase (SAP)	Roche (Mannheim)
SOC-Medium	Invitrogen (Gromingen, NL)
Superscript II	Invitrogen (Gromingen, NL)

SYBR Green PCR Mastermix	Applied Biosystems (Foster City, USA)
T4 DNA-Polymerase	Roche (Mannheim)
Tris-Acetat-Puffer (TAE)	Merck (Darmstadt)
Template Suppression Reagent	Applied Biosystems (Foster City, USA)
TOP 10	Invitrogen (Gromingen, NL)
TOPO Klonierungssystem	Invitrogen (Gromingen, NL)
Trio Thermocycler	Biometra

2.2 Methoden

2.2.1 Primäre Schwannzellkultur

Neonatale Rattenschwannzellen wurden nach der Methode von Brockes *et al*., (1979) präpariert und in Zellkulturflaschen kultiviert, deren Kultivierungsfläche 75 cm³ bzw. 210 cm³ betrug. Alle zur Kultivierung von Schwannzellen verwendeten Kulturgefäße wurden mit 1mg/ml Poly-D-Lysin (PDL)/PBS-Lösung bei RT für 15 min beschichtet und anschließend dreimal mit PBS gewaschen. Das Kulturmedium bestand aus DMEM, 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin, 1% Glutamin und dem cAMP-Agonisten Forskolin (Konzentration 2µM), welches dem Ansatz jeweils frisch beizumischen war. Alle 3 Tage wurde das Medium gewechselt, bis die Zellen ein konfluentes Stadium erreicht hatten. Die Kultivierung erfolgte in einem Brutschrank unter Standardbedingungen bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 10% CO_2-Zufuhr.
Konfluente Zellrasen wurden zur Zellexpansion passagiert. Dazu wurde das Kulturmedium mit einer Glaspipette abgesaugt, die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und mit 3ml Trypsin/EDTA pro 75 cm³ (9ml pro 210 cm³) für 2 min bei 37°C inkubiert. Die proteolytische Ablösungsreaktion wurde mittels 10% FCS/DMEM unterbrochen, die Zellen wurden gesammelt und anschließend durch 15 min Zentrifugation bei 1200 U/Min pelletiert. Das Pellet wurde dann vorsichtig in Kulturmedium resuspendiert. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 10 µl der Zellsuspension in die Neubauer-Zellkammer gegeben und unter dem Lichtmikroskop ausgezählt. Die Schwannzellen wurden in einer Dichte von 10'000 Zellen/cm² in frischem Kulturmedium ausgesät.

2.2.2 Transfektion

Die Transfektion primärer Schwannzellen erfolgte unter Verwendung des Fugene 6 Agens nach Anleitung des Herstellers (Roche). Zur spezifischen Überexpression der Mash2 und p57kip2 Gene wurden Schwannzellen mit den entsprechenden Konstrukten pMash2-IRES2EGFP [Küry *et al*., 2002], p57kip2-IRES2EGFP (s.u.), sowie pIRES2EGFP als Kontrollvektor transfiziert. Gleichzeitig fand eine Kotransfektion mit dem CD14-Expressionsvektor pMACS-14.1 (Miltenyi Biotech)

statt. Dazu wurden Schwannzellen der Passage 9-12 auf mit Poly-D-Lysin beschichteten Zellkulturschalen (15cm Durchmesser) in einer Dichte von 10'000 Zellen/cm² ausplattiert und für 24 h in Kulturmedium gehalten. Dann wurden nach Protokoll pro Ansatz 1800µl des Transfektionsmediums DMEM+Hepes mit 54µl des Transfektionsreagenz Fugene 6 vermischt und für 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden je 18µg DNA (1mg/ml) in den Ansatz pipettiert und für weitere 5 min bei RT inkubiert. Zur Kotransfektion wurde den oben beschriebenen Konstrukten pMACS-14.1 im Verhältnis 5:1 hinzugefügt. Nach einem Mediumwechsel wurde der Transfektionsansatz auf die Kulturschalen gegeben, die dann für weitere 24 h im Brutschrank unter Standardbedingungen kultiviert wurden.

2.2.3 Magnetisches Zellsortieren (MACS)

Um ausreichend hohe Transfektionsraten bei der Transfektion von Rattenschwannzellen zu erreichen, wurden transfizierte von untransfizierten Zellen mittels magnetischen Zellsortierens getrennt [Petry *et al*., 1999]. Mit dieser Methode konnte die Transfektionseffizienz auf über 70% gesteigert werden [Küry *et al*., 2002]. Bei der Kotransfektion der Konstrukte pMash2-IRES2EGFP, p57kip2-IRES2EGFP und pIRES2EGFP mit pMACS-14.1 wird laut den Angaben von Miltenyi Biotech eine Kotransfektionsrate von über 90% erreicht. Das Plasmid pMACS-14.1 (4.4 kb) kodiert für ein humanes CD14-Oberflächenprotein. Der CD14-Oberflächenmarker wird von dem monoklonalen Maus-Anti-Human CD14 Antikörper (Isotype: Maus IgG2a) der mit den MACSelect CD14 MicroBeads konjugiert ist, gebunden. So werden alle transfizierten Zellen mittels der MikroBeads magnetisch markiert und können so über eine Säule (MACS High Gradient Magnetic Seperation Columns), die in das starke Magnetfeld eines MACS Separators gebracht wird, von den untransfizierten Zellen getrennt werden. Hierfür wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und anschließend mittels Trypsin-EDTA (1500µl, 2min bei 37° und 10% CO_2) abgelöst. Dann wurde fetales Kälberserum (FCS, 300µl) hinzugegeben und resuspendiert. Nun wurden die MACSelect CD14 Mikrobeads (200µl) hinzugefügt und die Zellen anschließend für 15 Minuten auf einem Schüttler inkubiert (100/Min., RT). Nach erneuter Resuspension wurde dem Ansatz steril filtriertes PBE hinzugegeben, die Zellen gesammelt und unter Vermeidung von Luftblasen auf die vorher mit PBE

gewaschenen Säulen pipettiert, jeweils in 500µl Schritten. Zum Schluß wurden die Säulen viermal mit PBE (je 500µl) gewaschen. Anschließend wurden die an die Säule gebundenen transfizierten Zellen mit PBE (1000µl) und mit Hilfe eines Kolbens außerhalb des Magnetfeldes eluiert. Das Eluat wurde mit Schwannzellmedium versetzt und zentrifugiert (15 Min. bei 1200 U). Nach Resuspension des entstandenen Pellets wurden die Zellen gezählt und auf PDL-beschichteten Labtek Kulturgefässen ausplattiert. Die Transfektionseffizienz konnte unter dem Fluoreszenzmikroskop durch die Eigenfluoreszenz des EGFP direkt nach der Transfektion oder später mittels Immunhistochemie bestimmt werden.

2.2.4 Proliferationsversuch

Zur Untersuchung der Proliferation von Schwannzellen wurde die BrdU-Methode verwendet [Gratzner *et al.*, 1982].

2.2.4.1 BrdU-Inkubation

Zur Messung der Proliferation wurden Rattenschwannzellen auf mit PDL beschichteten Objektträgerkammern (Labtek) ausplattiert. 24 Stunden nach dem Ausplattieren, nach Stimulation oder Transfektion der Zellen, wurden diese mit 10µM 5-Brom-2'-deoxyuridin (BrdU) inkubiert. Die BrdU-Pulsdauer ist abhängig vom Zelltyp und den Kulturbedingungen und variierte zwischen 8 und 48 Stunden. BrdU dient als Proliferationsmarker, da es von den Zellen an Stelle von Thymidin während der DNA-Replikation in der S-Phase der Mitose in neu synthetisierte DNA-Stränge eingebaut wird. Nach Abschluss der Inkubationsdauer wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit 4% Paraformaldehyd für 15 min. bei RT fixiert. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden die Zellen bei 4°C aufbewahrt bzw. direkt immunhistochemisch gefärbt.

2.2.4.2 Immunhistochemie

Zur Darstellung des BrdU-Epitops muss zunächst die DNA freigelegt und von ihrer Proteinumhüllung aus Histonen befreit werden, dazu wurden die Chromosomen mit 2M Salzsäure (aus PBS und 37%iger HCl, rauchend; frisch angesetzt) denaturiert

und danach mit 0.1M $Na_2B_4O_7$ (aufgelöst in PBS; pH:9; frisch angesetzt) wieder neutralisiert. Die De- und die Renaturierung fand bei RT für jeweils 10 Minuten statt. Dann folgte die Blockierung mit einem Puffer aus PBS + 10% FCS + 0,1% Triton-X-100 für 2 h bei RT. Nun wurde als Erstantikörper der Anti-BrdU-Antikörper (Maus) in der Konzentration 1:17 in Blockierungspuffer gelöst aufgetragen (jeweils 50µl pro Labtekfeld), mit einem Deckgläschen abgedichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert. Handelte es sich um transfizierte Schwannzellen, so konnte gleichzeitig eine Doppelfärbung gegen EGFP mit dem 1:1000 verdünnten Anti-EGFP-Antikörper (Kaninchen) durchgeführt werden. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit dem Zweitantikörper Ziege-Anti-Maus (Cy3 konjugiert; Konzentration 1:500) ebenfalls für 24h bei 4°C inkubiert. Bei transfizierten Zellen wurde der Ziege-Anti-Kaninchen-Antikörper (an Biotin gekoppelt; Konzentration 1:200) hinzugegeben. Am darauf folgenden Tag wurde wiederum mit PBS gewaschen. Transfizierte Zellen, bei denen eine Doppelfärbung durchgeführt wurde, wurden mit dem Farbstoff Avidin-Alexa-Green, der mit Biotin in Bindung geht, für eine Stunde bei RT inkubiert (Konzentration 1:1000). Nach einem weiteren Waschschritt wurde bei allen Zellen die Zellkerne mit Hoechst 33342 (Konzentration 1:1000, 10 Min. RT) markiert. Nach anschließendem Waschen wurden die Objektträger in Fluoromount eingebettet und mit einem Deckgläschen abgedichtet.
Die Auswertung des Proliferationsexperimentes erfolgte mittels Fluoreszenz-mikroskopie. Dazu wurden bei einer Wellenlänge von 340nm jeweils 9 Gesichtsfelder pro Labtekfeld ausgezählt. Dabei wurde die Zahl der proliferierenden Zellen der Gesamtzahl der Zellen gegenübergestellt und statistisch ausgewertet. Zur Quantifizierung diente die Lucia G/F Auswertungssoftware, die das Zählverfahren mit Hilfe von Makros vereinfacht. Mit diesem Programm wurden auch die Aufnahmen der Präparate gemacht.

2.2.5 Apoptose-Versuch

Zur Detektion und Quantifizierung von Einzelzellapoptose wurde das In Situ Cell Death Detektion Kit, TMR red von Roche verwendet, das auf der TUNEL-Technologie (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling) basiert [Gavrieli Y *et al*., 1992]. Während der Apoptose kommt es frühzeitig

zur Fragmentierung der DNA, die dabei entstehenden Strangbrüche können durch Markierung an ihrem freien 3´OH-Ende identifiziert werden. Das Enzym Terminale Deoxynukleotidyl Transferase (TdT) katalysiert die Polymerisation der Nukleotide, die mit einem roten Farbstoff (TMR =Tetra-Methyl-Rhodamine) kombiniert sind, an die freien 3´OH-Enden der Strangbrüche auf eine Sequenz-unabhängige Weise. Die markierten Moleküle können nun am Fluoreszenzmikroskop oder durch Fluss-Zytometrie identifiziert und quantifiziert werden. Die TUNEL-Reaktion ist spezifisch für DNA-Strangbrüche, die während der Apoptose entstehen, so dass zwischen Apoptose und Nekrose, bzw. primären Strangbrüchen, die durch Zytostatika oder Bestrahlung entstehen, differenziert werden kann.

Zur Durchführung des Versuches wurden Rattenschwannzellen (unbehandelt, transfiziert oder stimuliert) auf mit PDL-beschichteten Labtek Kulturgefässen ausplattiert (10000/Feld) und nach 48 Stunden mit 2% Paraformaldehyd für eine Stunde fixiert. Nach dreifachem Waschen mit PBS wurden die Zellen für 2 Minuten auf Eis gestellt und anschließend mit einer Lösung aus 0,1% Triton-X-100 und 0,1% Natrium-Citrat in PBS permeabilisiert. Nach erneutem dreifachem Waschen mit PBS wurde die TUNEL-Reaktionslösung aufgetragen (50µl pro Feld), die aus der Nukleotidlösung (450µl) und aus der TdT aus Kälber Thymus (50µl) besteht. Als Positivkontrolle wurde ein Teil der Zellen für 10 min bei 37°C mit 7,5U DNase I in 10mM Tris/HCl ph 7,5 und 25 mM $MgCl_2$ behandelt. Nun wurde der Objektträger mit einem Deckgläschen abgedeckt, so dass eine homogene Ausbreitung der TUNEL-Lösung gewährleistet und der Verlust von Flüssigkeit vermieden wurde. Anschließend wurde für 60 min. bei 37° im Dunkeln inkubiert. Dann wurde die TUNEL-Reaktion mit einem Puffer aus PBS, 0,1% Triton-X-100 und 0,5% bovinem Serum Albumin (BSA) blockiert. Nach einem erneuten Waschschritt mit PBS wurden die Zellkerne mit Hoechst 33342 (Verdünnung 1:1000, Inkubation für 10 Minuten bei Raumtemperatur) angefärbt und die Objektträger anschließend in Fluoromount eingebettet.

Darauf folgte die Auswertung am Fluoreszenzmikroskop. Es wurden jeweils 9 Blickfelder pro Labtekfeld bei 340 nm Wellenlänge ausgezählt und zur Quantifizierung der Apoptose die Zahl der apoptotischen Zellen mit der Gesamtzahl der Zellen verglichen. Dazu wurde das Computerprogramm LUCIA F/G (siehe 2.2.5.2) verwendet.

2.2.6.1 RNA-Isolierung

Alle Lösungen, die zur RNA-Isolierung verwendet wurden, sind mit RNase-freien ddH_2O^{DEPC} angesetzt worden. Hierfür wurde Aqua dest. mit DEPC (= Diethylpyrocarbonat) in einer Endkonzentration von 0,1% angesetzt, 3h gerührt und autoklaviert. Weiterhin wurde jede RNA und jede cDNA bei -20°C gelagert. Schwannzellen wurden auf 6-Well-Kulturplatten ausgesät und kultiviert. Zur Isolierung der RNA aus den Schwannzellkulturen wurden diese mit PBS gewaschen und anschließend mit je 350µl Lyse-Puffer (RLT-Puffer der mit 0,1M 2-Mercaptoethanol im Verhältnis 100:1 versetzt worden ist), von der Kulturfläche abgelöst und lysiert. Dann wurde das Lysat mit Hilfe einer QIAshredder-Säule homogenisiert und das Eluat bei -20°C aufbewahrt. Die RNA wurde nun mit Hilfe des RNeasy Prep Systems von Qiagen nach den Abgaben des Herstellers isoliert. Dafür wurde das Eluat mit 350µl 70%igen Ethanol versetzt und zur Absorption der RNA auf die RNeasy Spin Column gegeben. Um die RNA von Kontaminationen mit genomischer DNA zu reinigen, wurde eine DNase-Behandlung (RNase-Free DNase, Qiagen) durchgeführt. Dazu werden 10µl DNase I (1500 U) mit 70µl RDD-Puffer vermischt und für 20 min auf den Säulen inkubiert. Anschließend wurden Verunreinigungen der RNA durch mehrfaches Waschen mit RW1- und RPE-Puffer und darauf folgendes Zentrifugieren eliminiert. Schließlich wurde die RNA mit Hilfe von 30µl ddH_2O^{DEPC} aus der Säule eluiert. Die RNA wurde sofort auf Eis gestellt oder bei -20°C gelagert.

2.2.6.2 Messung der RNA-Konzentration

Quantität und Qualität der extrahierten RNA wurde spektrophotometrisch bestimmt. Hierfür wurde die zu quantifizierende Nukleinsäure mit ddH_2O^{DEPC} als Lösungsmittel verdünnt (1/100) und in einer Quarzküvette gegen das als Nullwert eingestellte Lösungsmittel gemessen. Die Konzentration der RNA wurde durch Messung der optischen Dichte bei 260 nm bestimmt. Verunreinigungen durch Proteine wurde mittels Bestimmung des Quotienten OD_{260}/OD_{280} ausgeschlossen. Ein Quotient >1,8 identifiziert dabei reine RNA.

2.2.7 Reverse Transkription

Die RNA wurde mit dem Enzym Superscript II (Gibco) in einer Reversen Transkription in cDNA umgeschrieben. Dazu wurde 1µg totale RNA mit 1µl Oligo(dT)GAC Primer (50µM), 3µl dNTP (2.5mM), 2µl DTT, 4.5µl 5x First Strand Puffer und 1µl RNasin (10U) gemischt und anschließend 1µl der Reversen Transkriptase Superscript II (1U) hinzugegeben. Nach 10 min Inkubation bei RT erfolgte die Reverse Transkription bei 42°C für 60 min, anschließend wurde das Enzym 2 min lang bei 95°C inaktiviert. Die cDNA wurde unverzüglich auf Eis gestellt und eingefroren.

2.2.8 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die bei der Reversen Transkription entstandene cDNA wurde mit Hilfe von spezifischen Primern in einer Polymerasekettenreaktion vervielfältigt. Das Ziel war die Klonierung von p57kip2 cDNA der Ratte. Dazu wurden 2µl der cDNA mit 5µl 10x Puffer, 4µl dNTP-Mix (2,5mM), 5µl Forward-Primer (20pmol/µl), 5µl Reverse-Primer (20pmol/µl), 10µl Q-Puffer, 19µl ddH_20 und 0.5µl Hot-Star Taq-DNA-Polymerase versetzt. Das Profil eines Amplifikationszyklus war: 30 sec bei 94°C zur Denaturierung der DNA, gefolgt von 1 min bei 55°C zur Hybridisierung der Primer mit der DNA und anschließend 1 min bei 72°C zur Elongation. Die PCR-Produkte wurden gelelekrophoretisch aufgetrennt und die Spezifität des jeweiligen Amplifikates wurde durch Sequenzierung verifiziert. (s.u.)
Folgende Primer wurden verwendet (r=Ratte; m=Maus):

mp57kip2-Forward1	5´-AGCCAGCAGAACAGCATG-3´
mp57kip2-Forward2	5´-AGCGATGGAACGCTTGGCCTC-3´
rp57kip2-Reverse	5´-GGTCTAAACTAACTCATC-3´

2.2.9 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Herstellung des Gels wurde die Agarose in einer Konzentration von 1% in 1x TAE-Puffer (50x TAE: 242g Tris-Base, 57.1 ml Eisessig, 100ml EDTA (500 mM, pH 8.0, ad 1l mit aq. dest.) durch Kochen gelöst und nach Abkühlen mit Ethidiumbromid

(0,5µg/ml) versetzt. Das Gel wurde nun in einen Gelschlitten gegossen, in den vorher ein Gelkamm eingesteckt worden ist. Nach Abkühlen und Erhärten des Gels wurde der Kamm herausgezogen und das Gel mit dem Gelschlitten in eine Gelkammer gesetzt. Als Laufpuffer wurde 1x TAE-Puffer in die Kammer gegossen, bis das Gel vollständig von Puffer bedeckt war. Die Proben wurden vor der Beladung des Gels mit 1/10 Volumen Blaumarker (Bromphenolblau 0.25%, Saccharose 40%) versetzt und ebenso wie eine 1 kb-Leiter, die als Längenstandard diente, in die Geltaschen pipettiert. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 100V bis zur gewünschten Laufstrecke. Die Visualisierung der DNA wurde durch das sich in die Tertiärstruktur der Nukleinsäuren interkalierende Ethidiumbromid ermöglicht und erfolgte bei 312 nm mit einem UV-Transluminator (Raytest). Zur Dokumentation wurde eine integrierte CCD-Kamera verwendet. Als Auswertungsprogramm diente die Software DIANA.

2.2.10 Aufreinigung der PCR-Produkte

Zur Aufreinigung wurden die Amplfikate auf eine Säule (Pharmazia S 200) pipettiert und 3 min bei 3000U zentrifugiert.

2.2.11 Klonierung

Die aufgereinigten PCR-Produkte, die mit einer TA-Überhänge produzierenden DNA-Polymerase erzeugt worden sind, wurden mit Hilfe des TOPO Klonierungssystems (Invitrogen) nach den Herstellerangaben in den pCR-Vektor einkloniert, der sowohl ein Ampicillin- als auch ein Kanamycin-Resistenzgen besitzt. Der geschnittene Vektor ist an seinen Enden mit Topoisomerasemolekülen gekoppelt. Der Ligationsansatz bestand aus 3µl PCR-Produkt, 1µl Vektor und 1µl Salzlösung. Inkubiert wurde für 10 min bei RT. Das Ligationsprodukt wurde sofort zur Transformation eingesetzt.

2.2.12 Transformation

Zur Transformation wurden chemokompetente *E. coli* TOP 10 Bakterien verwendet. Zu den Bakterien, die auf Eis aufgetaut worden sind, wurden 5µl des Ligationsproduktes gegeben und vorsichtig gemischt. Der Ansatz aus Bakterien und dem zu transformierenden Plasmid wurde für 30 min auf Eis inkubiert. Dann wurde das Reaktionsgefäß für 45 sec bei 42°C erhitzt und sofort wieder für 2 min zum Abkühlen auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 200µl SOC-Medium [20g Bacto-Trypton, 5g Bacto-Hefeextrakt, 10ml NaCl (1M), 2.5ml KCl (1M), 10ml $MgCl_2$ (1M), $MgSO_4$ (1M), 10ml Glukose (2M), ad 1l aq. dest.; die letzten drei Substanzen erst unmittelbar vor Gebrauch hinzugeben] wurden die Bakterien für 1h bei 37°C inkubiert. Dann wurden die Bakterien auf Ampicillin-LB-Platten ausgestrichen und über Nacht in feuchter Atmosphäre bei 37°C gelagert. Die transformierten Bakterien werden über ihre Ampicillinresistenz selektiert, so dass nur aus transformierten Bakterien mit Resistenzgen Kolonien entstehen können. Am nächsten Tag wurden die Klone mit einem sterilen Zahnstocher gepickt und jeweils in ein Röhrchen mit 5ml LB-Medium überführt, das vorher mit 5µl Kanamycin (Endkonzentration 50µg/ml) versetzt worden war. Die Röhrchen wurden in einem Schüttelinkubator bei 37°C mit einer Schüttelfrequenz von 200 rpm wiederum über Nacht inkubiert. Ein Teil der Bakteriensuspension wurde mit einem Volumen Glyzerin versetzt und bei -20°C eingefroren.

2.2.13 Isolierung von Plasmid-DNA aus E.coli

2.2.13.1 Plasmid-Minipräparation

Die Plasmid-DNA wurde mittels einer Mini-Präparation aus den transformierten Bakterien isoliert. Die Methode nach Birmboim und Doly (1979) wurde nach dem Herstellerprotokoll der Firma Qiagen modifiziert als QIAprep Spin Plasmid Prep Kit verwendet. Dazu wurden 1,5ml einer Bakterienkultur zentrifugiert (Zentrifugations-bedingungen: 2.000 x g, 10 min., 4°C) und das Bakterienpellet in 250µl P1 RNase-Puffer resuspendiert. Anschließend wurden 250µl P2-Puffer zur Lyse zugegeben, vorsichtig vermischt und das Röhrchen für 3 min bei RT stehengelassen. Dann

wurden 350µl N3-Puffer zum Ausfällen der Proteine hinzupipettiert und 8 min bei maximaler Umdrehungszahl (14.000 x g) zentrifugiert. Der Überstand wurde direkt auf eine im Kit enthaltende Spin-Säule gegeben, 30 sec maximal zentrifugiert, mit 500µl PE-Puffer gewaschen, wiederum 30 sec bei maximaler Umdrehungszahl zentrifugiert und schließlich mit 40µl Elutionspuffer versetzt und 5min bei RT inkubiert. Dann wurde 1 min bei 12.000 x g zentrifugiert und das Eluat in ein neues Eppendorfgefäß überführt.

2.2.13.2 Plasmid-Maxipräparation

Wurden größere Mengen an Plasmid-DNA benötigt, wurde das Qiagen Plasmid Maxi Kit zur Isolation der DNA verwandt. Dazu wurde nach dem Protokoll des Herstellers verfahren, welches nach dem gleichen Prinzip wie bei der Miniplasmidpräparation vorgeht.

2.2.13.3 Restriktion der DNA

Die DNA wurde sequenzspezifisch mit Hilfe der Restriktiondendonuklease EcoRI geschnitten. Dabei wurden für 1µg DNA eine Enzymeinheit (1U) des Enzyms eingesetzt. Gemeinsam mit 2µl 10x Puffer H und ad 20µl H_2O wurde der Reaktionsansatz 1h bei 37°C inkubiert.

2.2.13.4 Dephosphorylierung

Vektoren, die mittels Restriktionsenzymen geschnitten worden sind, wurden mit einer Alkalischen Phosphatase (Shrimp Alkali Phosphatase, SAP) nach Herstellerangaben mit einer Enzymeinheit (1U) SAP je pmol DNA-Enden dephosphoryliert. Um eine Ligation der Vektorenden alleine ohne Insertion der DNA zu vermeiden, war es notwendig, die Enden der Vektoren zu dephosphorylieren, da eine Ligation nur über Phosphatgruppen erfolgt. Da nur noch das Insert phosphoryliert ist, kann es gut in die Vektoren integriert werden. Die Anzahl der Enden wurde nach der Formel µg

DNA/kb DNA x 3.04 bestimmt. Die SAP wurde nach 15 minütiger Inkubation durch Erwärmen auf 65°C irreversibel denaturiert.

2.2.13.5 Isolierung und Reinigung von DNA-Fragmenten

Nach Auftrennung der DNA-Fragmente über ein Agarosegel konnten gewünschte Fragmente unter einer UV-Lampe visualisiert und aus dem Gel herausgeschnitten werden. Die Aufreinigung erfolgte dann über das QIAex Kit (Qiagen) oder Ultrafree DA (Millipore) nach Herstellerangaben.

2.2.14 Sequenzierung

Zur Sequenzierung von DNA nach der Sanger Dideoxy-Methode wurde der ABI Prism^{TM} 310 Genetic Analyzer von Applied Biosystems verwendet, der mit einem Kapillarelektrophorese-System ausgestattet ist. Der Sequenzierreaktionsansatz bestand aus 7µl Sequenziermix, 1µl DMSO, 1.5µl eines spezifischen Oligonukleotidprimers (entweder forward oder reverse, 5 µM), 200-500ng der aufgereinigten DNA und aq. dest bis zu einem Reaktionsvolumen von 20µl. Mit dem Ansatz wurde nun folgendes Amplifikationsprogramm im Thermocycler durchgeführt: initial 5 min bei 95°C, dann 25 Zyklen à 30 s bei 94°C, 30 s bei 54°C und 4 min bei 60°C. Nach erfolgter PCR wurde der Sequenzieransatz mit Hilfe des DyeEx Spin Kits aufgereinigt. Dazu wurde er auf die zum Kit gehörigen Säulen, die vorher 3 min bei 3.000 x g zentrifugiert worden sind, gegeben und ebenfalls 3 min bei 3.000 x g zentrifugiert. Das Eluat wurde anschließend mit dem gleichen Volumen an Template Suppression Reagent vermischt, für 2 min auf 92°C erhitzt und dann auf Eis gestellt. Nun erfolgte die Kapillarelektrophorese im Sequenziergerät (s.o.) und die anschließende Analyse mittels der Sequencher Software von Gene Codes.

2.2.15 Ligation in den pIRES2EGFP Expressionsvektor

Nach Restriktion der DNA mit EcoRI, Dephosphorylierung mittels alkalischer Phosphatase (SAP) und der Durchsequenzierung von mindestens vier unabhängigen Klonen wurde das gesuchte DNA-Fragment in einen pIRES2EGFP Expressionsvektor mit Hilfe des T4 Rapid Ligation Kit (Roche) umkloniert. Dazu wurden das DNA-Fragment und pIRES2EGFP-Vektor-DNA (EcoRI geschnitten) im Verhältnis 4:1 eingesetzt und mit 2µl 5x DNA-Dilutionspuffer und ad 10µl ddH_2O versetzt. Nach Zugabe von 10µl des 2x Ligationspuffers und 1U T4 DNA-Polymerase wurde für 45 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden *E.coli* TOP 10 Bakterien mit dem neuen Vektor transformiert (siehe 2.14 Transformation). Der Expressionsvektor enthält neben einem CMV-Promotor eine interne Ribosomenbindungstelle (IRES) und eine EGFP-Sequenz, die ein grünes Fluoreszenzprotein kodiert. Das einklonierte DNA-Fragment ist durch die interne Ribosomenbindungstelle von der EGFP-Sequenz getrennt.

2.2.16 Quantitative Polymerasekettenreaktion (Q-PCR)

Zur Untersuchung von Genexpressionsprofilen in Schwannzellen diente die quantitative PCR nach Heid *et al*., 1996, die mittels Fluoreszenzmessung eine Echtzeitanalyse des Amplifikationsverlaufes und die Bestimmung der ursprünglich eingesetzten Anzahl an DNA-Kopien ermöglicht. Dazu wurde der GeneAmp 5700 (Applied Biosystems) verwendet. Als Fluoreszenzfarbstoff wurde der Doppelstrang-DNA-bindende Farbstoff SYBR Green (Applied Biosystems) benutzt. Die Fluoreszenzemissionen wurden mit einer CCD-Kamera aufgezeichnet. Zur Analyse wurden zunächst Schwannzellen lysiert, die RNA isoliert und mittels einer Reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Je 40µl der cDNA-Proben wurden mit 180µl H_2O LiChrosolv (Merck) verdünnt. Davon wurden jeweils 5µl mit 15µl SYBR Green PCR Mastermix, einer entsprechenden Menge 5´-Primer und 3´-Primer und ad 30µl H_2O versetzt. Als Reaktionsgefäße wurden spezielle MicroAmp Optical Tubes mit entsprechenden MicroAmp Optical Caps (Applied Biosystems) verwendet. Das Amplifikationsstandardprogramm bestand aus 1 Zyklus mit 2 min bei 50°C und 10 min bei 95°C, gefolgt von 40 Zyklen mit je 15 s bei 95°C und 1 min bei 60°C. Die

quantitative Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software von Applied Biosystems und Anwendung der $\Delta\Delta C_T$–Methode. Die einzelnen Messdaten wurden dabei jeweils auf die Glyzeraldehyd 3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH) und Ornithin-Decarboxylase (ODC) Expressionswerte bezogen. Hierbei handelt es sich um zwei für Schwannzellen Genexpressionsanalysen geeignete Referenzgene.

Folgende Primer wurden verwendet:

Mash2 forward:	AACTTTCCAACCTGGCCAAGGT
Mash2 reverse:	AGCCAGGCATCTTGCCC
Mash2_2 forward:	GGTGGACCTACCTGCGTTTC
Mash2_2 reverse:	GCTGCACTAGACAGCATGGG
GAPDH forward:	GAACGGGAAGCTCACTGGC
GAPDH reverse:	GCATGTCAGATCCACAACGG
p57kip2 forward:	CAGGACGAGAATCAGGAGCTGA
p57kip2 reverse:	TTGGCGAAGAAGTCGTTCG
CXCR3 forward 1:	AGCCATGTGGACGCCA
CXCR3 forward 2:	GGCCTCCTACTTGGGCTTGT
CXCR3 reverse 1:	GTGCATGTAGCCCATGCCT
CXCR3 reverse 1:	GGGTTGCACAGGCTCCAGT
ODC forward:	GGTTCCACAGGCCAAACATC
ODC reverse:	GTTGCCACATTGACCGTGAC

3. Ergebnisse

3.1 Proliferationsanalysen

3.1.1 Proliferationsbedingungen von Schwannzellen

Um die Proliferation von Schwannzellen beurteilen zu können, war es wichtig, zunächst die optimalen Wachstumsbedingungen auszutesten. Dafür wurden Rattenschwannzellen auf Labtek Kulturgefässen in einer Dichte von 5´000, 7´500, 10´000, 15´000 und 20´000 SC/Feld in Dulbecco`s Modified Eagle Medium (DMEM), 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin, 1% Glutamin und 2µM des cAMP-Agonisten Forskolin ausgesät. Die Zellen wurden für 24h unter Standardbedingungen (37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 10% CO_2-Zufuhr) im Brutschrank kultiviert. Dann wurden die Zellen unterschiedlichen Medien ausgesetzt, die jeweils aus DMEM, 1% Penicillin/Streptomycin und 1% Glutamin bestanden, aber bezüglich ihres FCS und Forskolingehaltes variierten:

MEDIUM	**FCS**	**Forskolin**
I.	10%	2µM
II.	10%	
III.	0,5%	2µM
IV.	0,5%	

Nach weiteren 24h im Brutschrank wurden die Zellen mit 10µM 5-Brom-2'-deoxyuridin (BrdU) für eine Pulsdauer von 8h bzw. 24h inkubiert. Nach Fixation und Immunhistochemie mit einem monoklonalen anti-BrdU Antikörper (Roche) konnte mittels Fluoreszenzmikroskopie folgendes Ergebnis ermittelt werden: Schwannzellen proliferieren nur stark, wenn ihrem Medium sowohl 10% FCS als auch 2µM Forskolin zugesetzt wurde [Abb. 3 und 4]. Dieser Effekt war sowohl nach 8h als auch nach 24h BrdU-Inkubationsdauer erkennbar, die Proliferationraten lagen nach 8h bei etwa 20% der Zellen und stiegen nach 24h auf bis zu 82% an. Dabei muss berücksichtigt werden, dass nach 24h auch Schwannzellen erfasst werden, die schon mehr als einen Mitosezyklus durchlaufen haben. Alle Zellen, die unter Mediumsbedingungen

kultiviert wurden, denen FCS, Forskolin oder beide Substanzen entzogen worden sind, zeigten nur geringe Teilungsaktivität. Ihre Proliferationsraten erreichten nur Werte zwischen 1 und 9,5%.

Auch morphologische Unterschiede ließen sich erkennen: Rattenschwannzellen, die durch Zusatz von 10% FCS und 2µM Fsk voll stimuliert wurden, stellten sich flach und unpolar dar, wohingegen die Zellen, die ohne Forskolinzusatz und mit einer zum Überleben gerade ausreichenden minimalen Menge an FCS auskommen mussten, eine langgestreckte, spindelförmige und bi- oder tripolare Morphologie zeigten.

Interessant war auch die Proliferationsanalyse für die unterschiedliche Plattierungsdichte der Schwannzellen. Dabei war zu beobachten, dass das Proliferationsmaximum bei einer Dichte von 10´000 bis 15´000 SC pro Fläche lag, während Zellen, die weniger dicht oder dichter ausplattiert worden sind, geringere Proliferationsraten zeigten. Hier zeigt sich die Abhängigkeit des Schwannzellwachstums von Zell-Zell-Kontakten bei geringer Zellzahl bzw. die Kontaktinhibition bei zu großer Zelldichte. Die Konditionierung durch das Medium führt dabei nur zu einem zusätzlichen Effekt, da Schwannzellen eine Reihe von Wachstumsfaktoren selber produzieren.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die optimalen Proliferationsbedingungen für Schwannzellen durch den Zusatz von 10% FCS und 2µM Forskolin und einer Plattierungsdichte von 10´000-15´000 Zellen pro Feld charakterisiert sind.

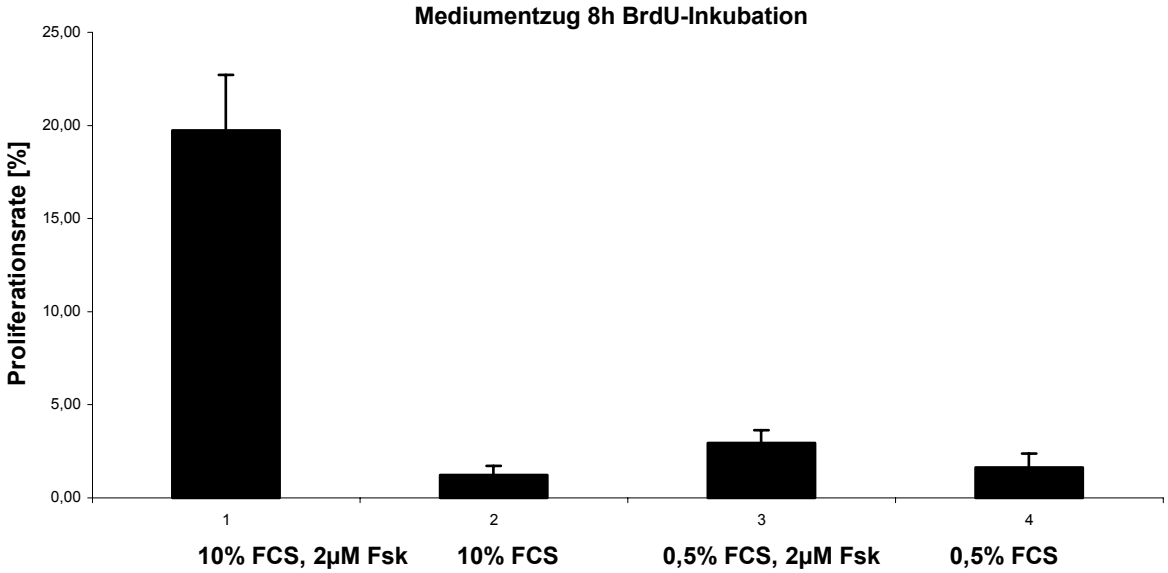


Abb. 3 zeigt Rattenschwannzellen der 10. Passage, die in einer Dichte von 15´000 Zellen pro 1cm^2 Fläche auf Labtek Kulturgefässen ausplattiert und unter verschiedenen Mediumsbedingungen kultiviert wurden. Anschließend wurde mittels 10µM 5-Brom-2'-deoxyuridin (BrdU) die Proliferationsaktivität der Zellen bestimmt. Die BrdU-Pulsdauer dauerte 8h an. Gezeigt werden die Daten eines von drei unabhängigen Experimenten.

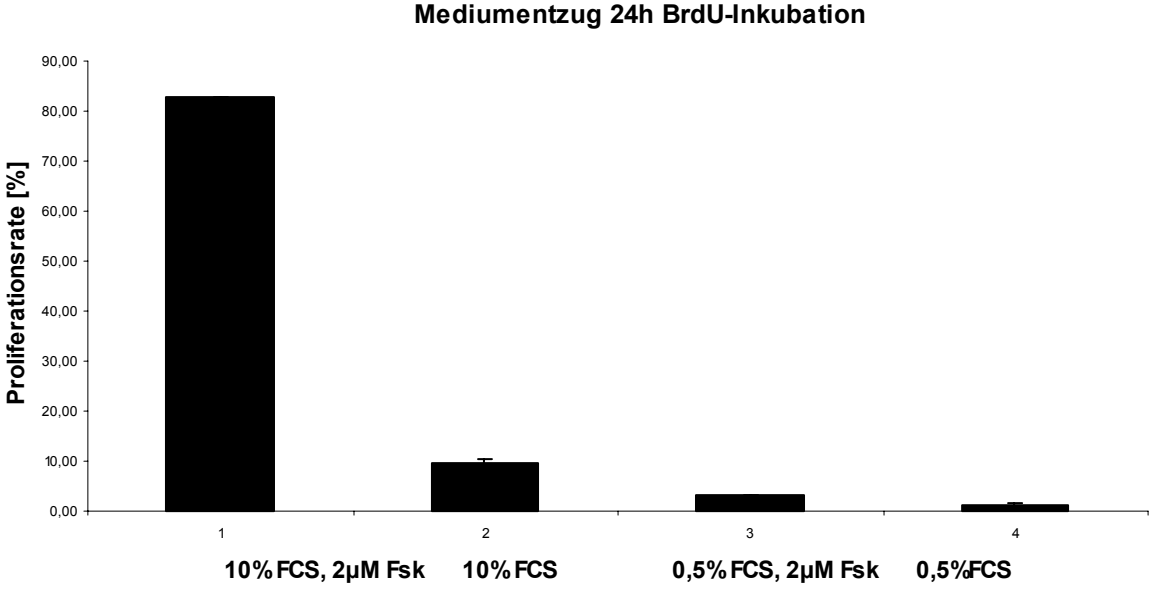


Abb. 4 zeigt Rattenschwannzellen der 10. Passage, die in einer Dichte von 15´000 Zellen pro 1cm^2 Fläche auf Labtek Kulturgefässen ausplattiert und unter verschiedenen Mediumsbedingungen kultiviert wurden. Anschließend wurde mittels 10µM 5-Brom-2'-deoxyuridin (BrdU) die Proliferationsaktivität der Zellen bestimmt. Die BrdU-Pulsdauer betrug 24h. Gezeigt werden die Daten eines von drei unabhängigen Experimenten.

3.1.2 Proliferationsanalyse nach Überexpression von Mash2

Um die Bedeutung und Funktion des Transkriptionsfaktors Mash2 hinsichtlich der Proliferation von Schwannzellen näher zu charakterisieren, musste das Gen zunächst überexprimiert werden. Dazu wurden Rattenschwannzellen mit den Konstrukten pMash2-IRES2EGFP [Küry *et al*., 2002], [Abb. 5] und pIRES2EGFP als Kontrollvektor wie unter 2.3 beschrieben transfiziert, wodurch es zu einer transienten Überexpression der Gene kam. Der Expressionsvektor pIRES2EGFP enthält neben einer internen Ribosomenbindungsstelle (IRES2) nur die EGFP-Sequenz, die für ein grünes Fluoreszenzprotein (GFP) kodiert. Daher dient er als Kontrollvektor, um Mash2-unabhängige Beeinflussungen durch die Transfektion erfassen zu können. Bei der transienten Transfektion wird das DNA-Plasmid zwar in den Zellkern aufgenommen und transkribiert, es wird jedoch nicht chromosomal integriert und geht nach mehreren Zellteilungen wieder verloren. Unter dem Mikroskop zeigt sich mittels Grünfluoreszenz des GFP-Proteins die Anzahl der transfizierten Zellen.

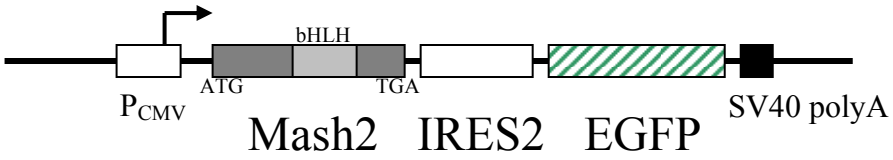


Abb. 5: **Expressionsvektor Mash2**

Mash2 wurde zur Erstellung dieses Konstruktes in einen pIRES2EGFP-Vektor [BD/Clontech] einkloniert. So kommt es zu einer Koexpression mit dem grünen Fluoreszenzprotein (EGFP), von dem die Mash2-Sequenz durch eine interne Ribosomenbindungsstelle (IRES) getrennt wird. Die Koexpression ermöglicht die schnelle Detektion transfizierter Zellen mittels des Fluoreszenzmikroskopes.

Die Transfektionseffizienz lag bei primären Schwannzellen, bezogen auf die Gesamtzahl der Zellen, bei etwa 10-15%. Um aber eine gesicherte Aussage über den Einfluss von Mash2 treffen zu können, mussten die Transfektionsraten erhöht werden. Dies geschah durch magnetisches Zellsortieren (MACS) [Siebenkotten *et al*., 1997], mittels dessen die transfizierten Zellen selektioniert wurden. So konnte mittels Immunhistochemie eine Anreicherung der transfizierten Zellen von 70-80% detektiert werden [Abb. 6]. Methode und Durchführung des magnetischen Zellsortierens sind unter 2.2.3 beschrieben.

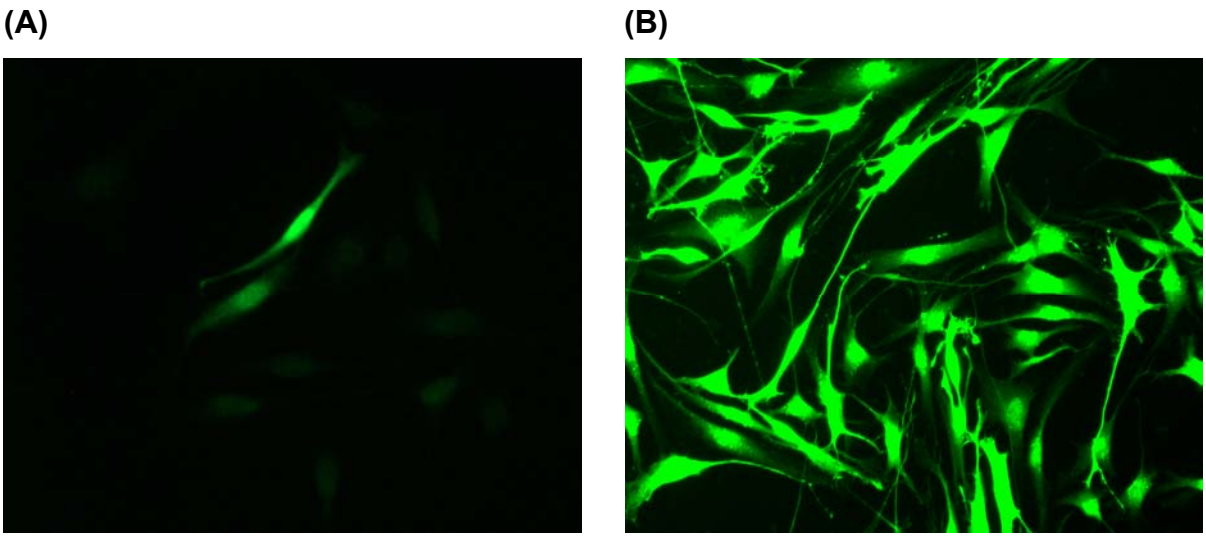


Abb. 6: EGFP- Färbung einfach transfizierter und gesorteter Zellen

Schwannzellen wurden nach der Transfektion mit einem Anti-EGFP-Antikörper immunhistochemisch markiert, der das Fluoreszenzsignal des eingebauten EGFPs verstärkt. EGFP dient als Marker für eine erfolgreiche Transfektion. (A) zeigt die EGFP-Färbung Mash2-transfizierter Schwannzellen, (B) die Färbung der gleichen Zellen nach Selektion der transfizierten Zellen durch magnetisches Zellsortieren. Vergrößerung jeweils 40fach.

Wenn dem Schwannzellmedium Serum (FCS) und Forskolin entzogen wird, kann man mittels Quantitativer RT-PCR, abhängig vom Grad der Reduktion der mitogenen Stimuli, einen Anstieg der Mash2-Expression beobachten [Küry *et al*., 2002]. Dies führte zu der Vermutung, dass Schwannzellproliferation und Mash2-Expression miteinander verknüpft sind. Um herauszufinden, ob Mash2 direkten Einfluss auf die Proliferation hat, wurden Mash2 transfizierte und mit dem leeren Vektor transfizierte Schwannzellen mit Hilfe von 5-Brom-2'-deoxyuridin (BrdU) markiert, um alle in der Synthesephase (S-Phase) befindlichen Zellen kenntlich zu machen.

Dafür wurden die Schwannzellen nach dem Magnetischen Zellsortieren wieder auf Labtek Kulturgefässen in Kulturmedium mit 10% FCS und 2µM Forskolin ausgesät, für 24h unter Standardbedingungen (37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 10% CO_2-Zufuhr) im Brutschrank kultiviert und dann mit 10µM 5-Brom-2'-deoxyuridin (BrdU) für eine variable Pulsdauer von 8h, 24h oder 48h inkubiert, an die sich Fixation und Immunhistochemie mittels anti-BrdU Antikörper (Roche), anti-EGFP Antikörper (Invitrogen) und Zellkernfärbung (Hoechst 33342) anschloss [Abb. 8; Siehe 2.2.4].

Durch Auswertung am Fluoreszenzmikroskop konnte folgendes Ergebnis ermittelt werden: Die Überexpression mit Mash2 führt in Rattenschwannzellen zu einer signifikanten Reduktion der Zahl der proliferierenden Zellen im Vergleich zu den

Proliferationsraten der mit dem Kontrollvektor pIRES2EGFP transfizierten Zellen und dies, obwohl die Zellen mit FCS und 2µm Fsk kultiviert wurden, d.h. hohe mitotische Stimulation erfuhren. Dieser Effekt zeigt sich konstant in fünf voneinander unabhängigen Experimenten, so dass angenommen werden kann, dass Mash2 einen direkten Einfluss auf Zellen hat, die im Begriff sind, sich zu teilen. Abb. 7 zeigt beispielhaft das Ergebnis eines der fünf Experimente.

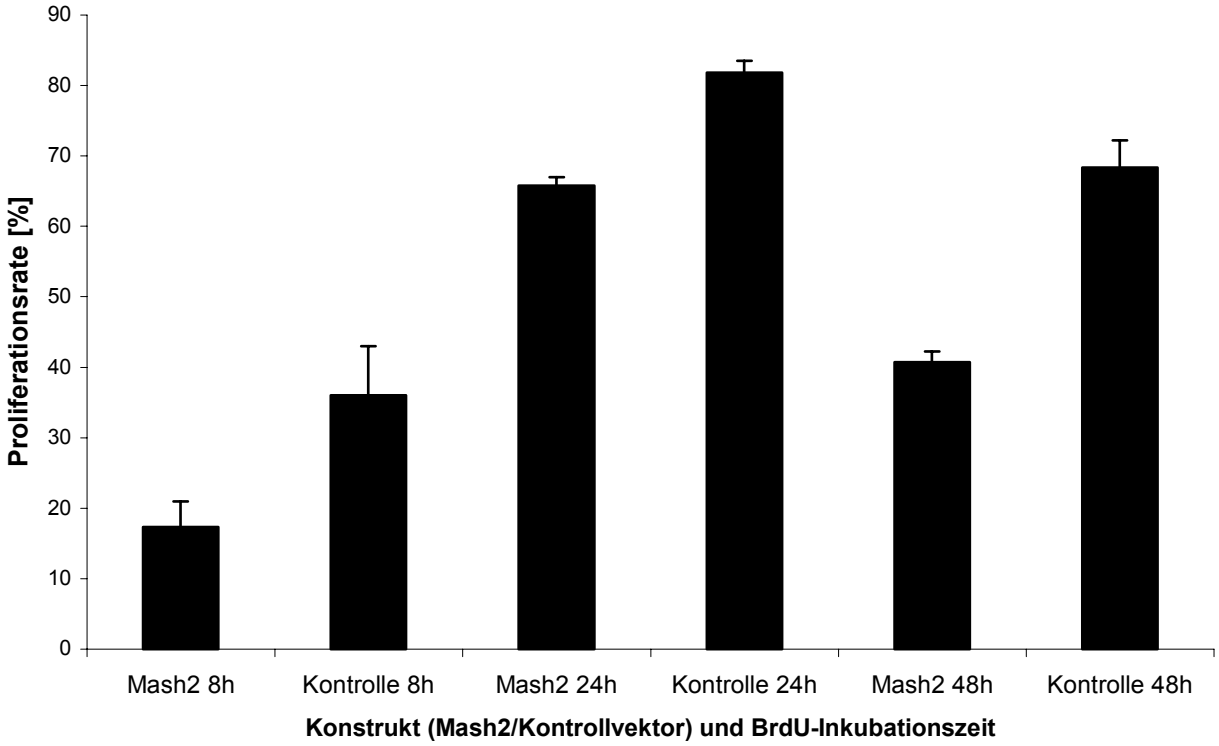
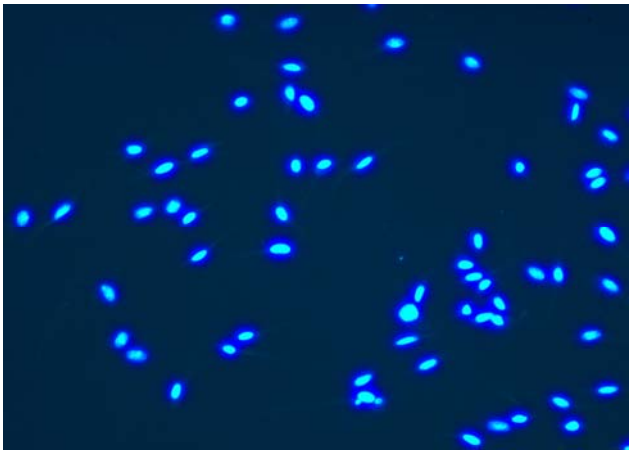


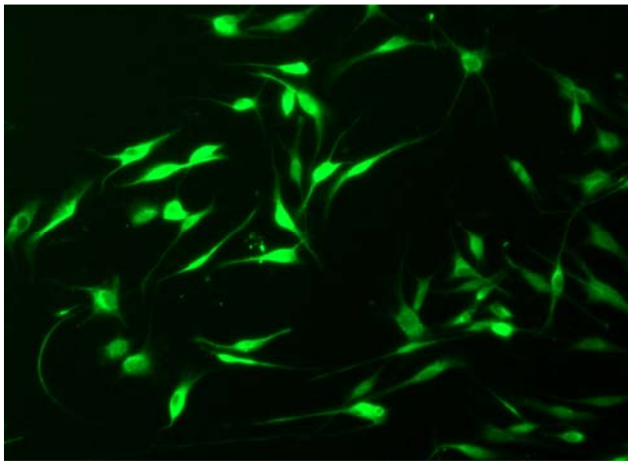
Abb. 7: Proliferationsanalyse nach Transfektion mit Mash2/pIRES2EGFP und anschließendem Magnetischen Zellsortieren

Nach Kultivierung von transfizierten Rattenschwannzellen in Vollmedium mit 10% FCS und 2µM Forskolin und 8, 24 und 48h Inkubation mit 5-Brom-2'-deoxyuridin (BrdU) zeigt sich eine signifikante Reduktion der Proliferationsrate Mash2-transfizierter Schwannzellen im Vergleich zu denen, die mit dem Kontrollvektor transfiziert wurden.

(A)



(B)



(C)

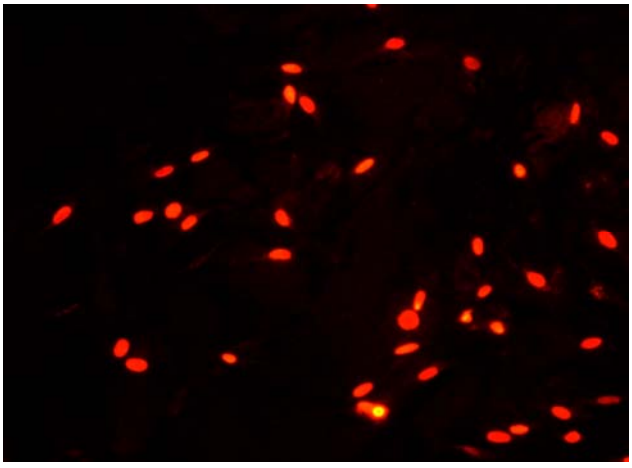


Abb. 8: Immunhistochemische Färbung von Mash2 transfizierten Schwannzellen und anschließendem magnetischen Zellsortieren
(A) Zellkernfärbung mit Hoechst 33342, (B) Anti-EGFP-Färbung mit einem monoklonalen Anti-Kaninchen-AK, 1:1000, Invitrogen, (C) Anti-BrdU-Färbung mit einem monoklonalen Anti-Maus-AK, 1:17, Roche (Vergrößerung jeweils 40fach).

3.1.3 Proliferationsanalyse nach Stimulation mit Mob-1

Mash2 besitzt durch Reduktion der Proliferationsrate Einfluss auf die mitotische Teilungsaktivität von Schwannzellen. In seiner Rolle als Transkriptionsfaktor besteht seine Funktion hauptsächlich in der Regulation der Aktivität von Zielgenen. Es stellt sich nun die Frage, welches seiner Zielgene als Mediator des antiproliferativen Effektes dient. Ein potentieller Kandidat ist das Chemokin Mob-1, welches aktiv an Entzündungsreaktionen des zentralen und peripheren Nervensystems beteiligt ist und durch Mash2 supprimiert wird. Aufgrund der negativen Regulation durch Mash2 wäre es denkbar, dass Stimulation mit Mob-1 ein Ansteigen der Proliferation bedingt.
Zur Durchführung der Proliferationsanalyse wurden Schwannzellen, die in einer Dichte von 15´000 pro Feld auf mit PDL beschichteten Labtek Kulturgefässen ausplattiert und 24h in Vollmedium (inklusive 10% FCS und 2µM Fsk) kultiviert worden sind, mit rekombinanten Mob-1 Protein in verschiedenen Konzentrationen stimuliert. Dazu wurde die Stockkonzentration [100µg/ml] mit Vollmedium zu den Arbeitskonzentrationen 1µg/ml, 200ng/ml, 100ng/ml und 50ng/ml verdünnt und die Schwannzellen damit für 24h stimuliert. Daran schloss sich die Inkubation mit 10µM 5-Brom-2'-deoxyuridin (BrdU) an, wobei auch hier für die Inkubationsdauer variable Zeitpunkte (8, 24, 48h) gewählt wurden. Die Auswertung am Fluoreszenzmikroskop erbrachte eine geringe, jedoch nicht signifikante Zunahme der Proliferationsaktivität Mob-1 stimulierter Schwannzellen gegenüber den unstimulierten Zellen, die aus sechs voneinander unabhängigen Versuchen mit einer Mob-1-Konzentration von 100ng/ml 10,21 % betrug [Abb. 9].
Das Ergebnis konnte somit die oben geäußerte Vermutung, dass Mob-1 im Vergleich zu Mash2 einen gegenläufigen Effekt bezüglich der Proliferation aufweist, tendenziell bestätigen. Als Mediator des antiproliferativen Effektes von Mash2 kommt es aber nicht in Frage, deshalb rückten die anderen Zielgene von Mash2 in den Mittelpunkt des Interesses. Zu beachten ist bezüglich dieses Ergebnisses auch die hohe Schwankung innerhalb der einzelnen Experimente; die Standardabweichung der Kontrolle beträgt 12.88 %, die der stimulierten Zellen 10.84 %. Um die Spezifität des Ergebnisses beurteilen zu können, wurde mittels Quantitativer PCR (s. 2.19) versucht, den CXCR3-Rezeptor in Schwannzell-DNA nachzuweisen. Mob-1 bindet als Ligand spezifisch an diesen Chemokinrezeptor. Dazu wurden Rattenschwannzellen auf 6-Well-Platten in verschiedenen Medien kultiviert, die

jeweils aus DMEM, 1% Penicillin/Streptomycin und 1% Glutamin bestanden, aber bezüglich ihres FCS und Forskolingehaltes variierten:

MEDIUM	**FCS**	**Forskolin**
I.	10%	2µM
II.	10%	
III.	0,5%	2µM
IV.	0,5%	

Die Zellen wurden nach 24h zur RNA-Präparation lysiert, die RNA in einer Reversen Transkription in c-DNA umgeschrieben und die Proben anschließend mittels Quantitativer PCR analysiert.

Leider zeigte sich in drei unabhängigen Experimenten kein Hinweis auf eine Expression des CXCR3-Rezeptors durch Rattenschwannzellen. Daher muss man annehmen, dass die oben beobachtete Steigerung der Proliferationsaktivität unspezifisch ist, und dass Mob-1 keinen spezifischen Einfluss auf die Proliferation von Schwannzellen zeigt.

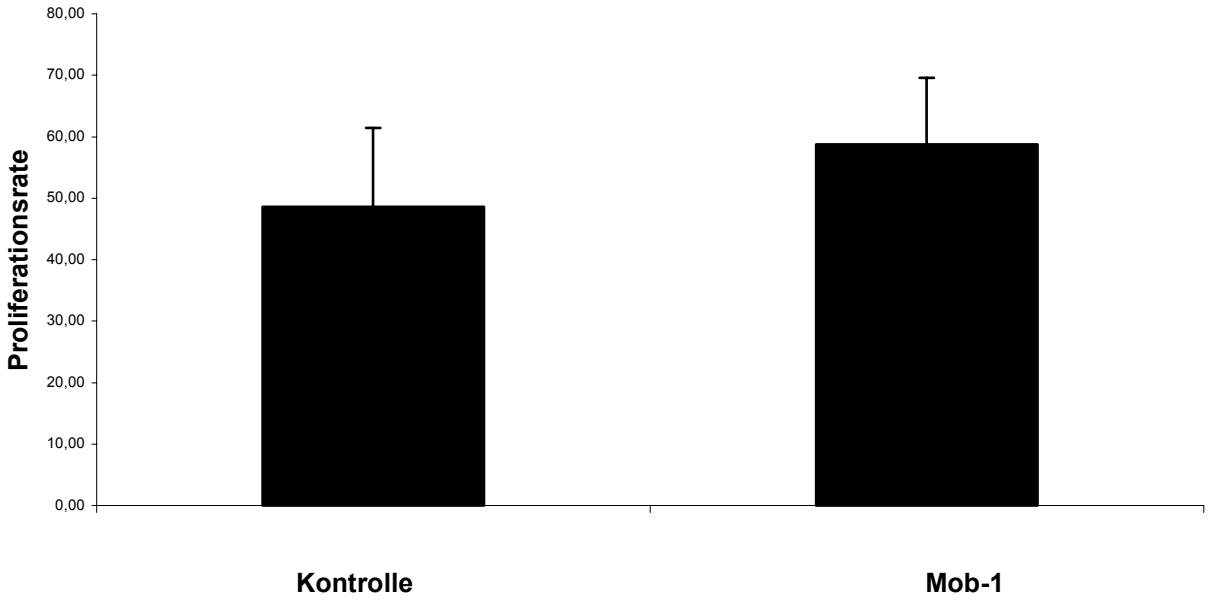


Abb. 9: Mob-1 Proliferationsanalyse

Rattenschwannzellen wurden in Vollmedium mit 10% FCS und 2µM Forskolin kultiviert und 24h lang mit Mob-1 [100ng/ml] stimuliert. Anschließend wurde mit 10µM 5-Brom-2'-deoxyuridin (BrdU) für 24h inkubiert und die Anzahl der proliferierenden Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop bestimmt. Für die stimulierten Zellen wurde eine Proliferationsrate von 58,76% ermittelt, was eine Zunahme der Proliferation gegenüber den unstimulierten Zellen (48,55%) von 10,21% bedeutet.

3.1.4 Proliferationsanalyse nach Stimulation mit SDF-1α

Ein weiteres Zielgen von Mash2 ist der Chemokinrezeptor CXCR4, der durch Mash2 hochreguliert wird. Seine Liganden sind die Chemokine SDF-1α, β und γ. Für SDF-1 sind zwar proapoptotische Funktionen beschrieben worden [Hesselgesser *et al*., 1998], über den Einfluss des Chemokins auf Proliferation von Schwannzellen ist jedoch wenig bekannt. Daher war es interessant, diesen Aspekt zu untersuchen, wobei SDF-1α als Stimulus verwendet wurde, da mit dieser Isoform des Chemokins die größte Erfahrung besteht und sie in der Literatur hinreichend beschrieben ist.
Dazu wurden Schwannzellen, die in einer Dichte von 15´000 pro 1cm^2 Fläche auf mit PDL beschichteten Labtek Kulturgefässen ausplattiert und 24h in Vollmedium (inklusive 10% FCS und 2µM Fsk) kultiviert worden sind, mit SDF-1α in den Arbeitskonzentrationen 10 ng/ml und 100ng/ml für 24h stimuliert [Hesselgesser *et al*., 1998]. Darauf folgte die Inkubation mit 10µM 5-Brom-2'-deoxyuridin (BrdU). Die Fixation erfolgte nach einer Inkubationsdauer von 8h, 24h und 48h. Anschließend wurde die Proliferationsaktivität der stimulierten und unstimulierten Zellen am Fluoreszenzmikroskop bestimmt. Aus den Ergebnissen von drei unabhängigen Experimenten konnte der Schluss gezogen werden, dass SDF-1α keinen Einfluss auf die Proliferationsaktivität von Schwannzellen besitzt [Abb.10]. Die Proliferationsraten der stimulierten Zellen entsprechen denen der unstimulierten Zellen. Somit dient auch SDF-1α nicht als Mediator des antiproliferativen Effektes von Mash2.

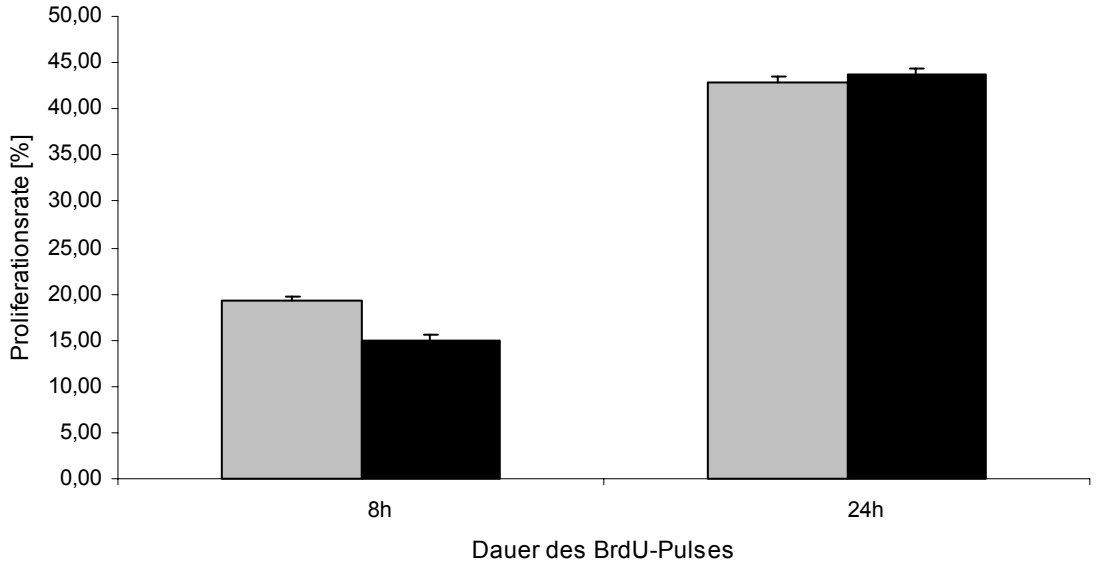


Abb. 10: Proliferationsanalyse SDF-1α

Rattenschwannzellen wurden in Vollmedium mit 10% FCS und 2µM Forskolin kultiviert und 24h mit SDF-1α [100ng/ml] stimuliert. Anschließend wurde mit 10µM 5-Brom-2'-deoxyuridin (BrdU) für 8h und 24h inkubiert und die Anzahl der proliferierenden Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop bestimmt. Für die stimulierten Zellen wurde nach 8h bzw. 24h eine Proliferationsrate von 14,95 bzw. 43,78%, für die unstimulierten Zellen von 19,30% bzw. 42,90% ermittelt. Somit entsteht durch Stimulation mit SDF-1α kein signifikanter Unterschied in der Proliferationsaktivität. Eines von drei voneinander unabhängigen Experimenten. Kontrolle=grau, SDF-1α=schwarz.

3.2 Apoptoseanalysen

3.2.1 Apoptoseanalyse unstimulierter Schwannzellen

Neben den Effekten von Mash2 und seinen Zielgenen auf die Proliferation war es wichtig, den Einfluss auf die Apoptose von Schwannzellen zu untersuchen. Die Apoptose ist eine wichtige Regulationsfunktion im Leben der einzelnen Zelle. Der programmierte Zelltod trägt durch Elimination von gealterten Zellen zur Gesunderhaltung von physiologischem Gewebe bei. Andererseits ist sein Ausfall mindestens ebenso bedeutsam für die Tumorzellproliferation.

Um den Einfluss von Mash2 und seinen Zielgenen zu charakterisieren, war es zunächst notwendig, das normale Apoptoseverhalten von untransfizierten

Schwannzellen zu untersuchen. Dazu wurden Schwannzellen in unterschiedlichen Dichten (2´000, 5´000, 10´000 und 15´000 rSC/1cm^2 Fläche) auf Labtek ausplattiert und für 24h bzw. 48h in Kultur gehalten. Dann wurden die Schwannzellen mit 2% Paraformaldehyd fixiert und anschließend wurden die DNA-Doppelstrangbrüche nach dem TUNEL-Protokoll (2.6) angefärbt. Die Untersuchung der Schwannzellen bezüglich ihrer Apoptose erfolgte am Fluoreszenzmikroskop. Zur Auswertung wurde die Zahl der apoptotischen Zellen mit der Gesamtzellzahl in Beziehung gesetzt.
Es zeigte sich, dass Schwannzellen unter physiologischen Bedingungen so selten Apoptose einleiteten, dass die Zahl der TUNEL-positiven und somit die Zahl der apoptotischen Zellen nur 0-4% der Gesamtzellzahl betrug. Die Zelldichte scheint großen Einfluss auf die Apoptoserate zu nehmen: werden die Schwannzellen so dünn ausgesät, dass sie keine Zell-Zell-Kontakte mehr haben (2´000 bis 5´000 rSC/Feld), leiten sie die Apoptose ein. Das gleiche Phänomen kann man bei dichter ausplattierten Kulturen (10´000 bis 15´000 rSC/Feld) am Rand eines Feldes beobachten. In der Mitte jedoch, wo die Schwannzellen untereinander zahlreiche Kontakte und Verknüpfungen aufbauen können, lässt sich kaum Apoptose beobachten. Daher wurde bei der Auswertung immer auf eine gleichmäßige Betrachtung von Rand- und Mittelbereich geachtet. Die Apoptoseraten variierten auch zwischen einzelnen Zellchargen, abhängig von der jeweiligen Präparation und der Kultivierungsdauer. Um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, war es also wichtig, auf eine gleichmäßige, ausreichend hohe Plattierungsdichte (10´000 bis 15´000 rSC/Feld) zu achten und jeweils nur Zellchargen aus einer Präparation zu verwenden.

3.2.2 Apoptoseinduktion durch Staurosporin

Um die Apoptose von Schwannzellen besser quantifizieren zu können und Untersuchungen mit transfizierten Genen durchzuführen, wurde es notwendig, die geringe natürliche Apoptosebereitschaft von Schwannzellen mittels verschiedener Stimulanzien zu steigern. Die Apoptoseinduktoren wurden jeweils an untransfizierten Schwannzellen ausgetestet.
Zunächst bot sich Staurosporin an, das Gift des Pilzes *Streptomyces* sp., welches ein breites Spektrum an Proteinkinasen, wie z.B. die CaM Kinase, die Myosin

Leichtketten Kinase und die Proteinkinasen A, C und G, hemmt und so zur Apoptoseinduktion führt.

Zur Apoptoseinduktion wurde dem Schwannzellmedium für 24h bzw. 48h 5, 10 und 20nM Staurosporin zugesetzt, das weitere Vorgehen erfolgte analog des oben beschriebenen Protokolls. Die Zahl der apoptotischen Zellen stieg daraufhin deutlich an [Abb. 11]. Als optimale Arbeitskonzentration erwies sich 10nM Staurosporin. Zur Inkubationsdauer ließ sich sagen, dass nach 48h Inkubation die Zahl der apoptotischen Zellen gegenüber 24-stündiger Inkubation leicht anstieg.

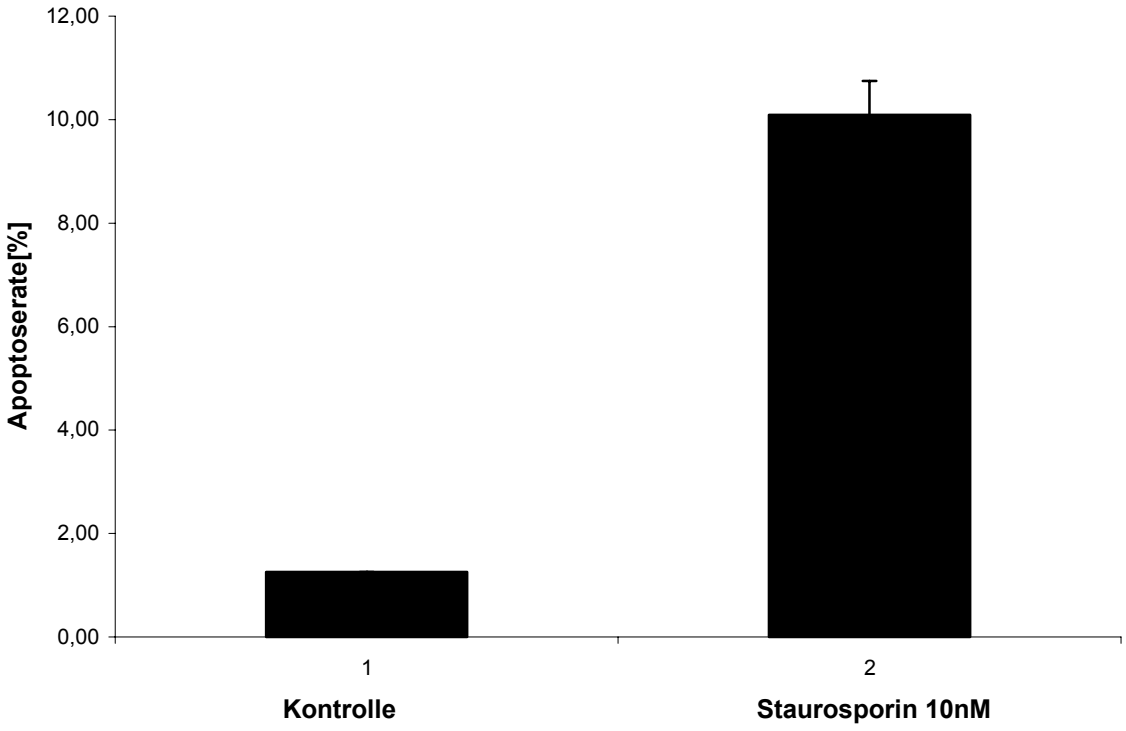


Abb. 11: Apoptoseanalyse nach Stimulation mit Staurosporin

Schwannzellen wurden auf Labtek ausplattiert (15´000/Feld) und für 24h mit Staurosporin in der Konzentration 10nM inkubiert. Das Diagramm zeigt das Ergebnis der TUNEL-Auswertung.

3.2.3 Apoptoseinduktion mittels TNFα

Mit Hilfe von Staurosporin konnte die Apoptoseaktivität von Schwannzellen deutlich gesteigert werden. Allerdings ist Staurosporin als Pilzgift kein physiologischer Apoptoseinduktor, unter natürlichen Bedingungen kommt es in der Schwannzelle

nicht vor. Daher stellte sich die Frage nach einem physiologischen Apoptosestimulanz. Vom Tumornekrosefaktor α ist bekannt, dass sein Vorkommen in vielen Zellen, u.a. in Neuronen, *in vitro* und *in vivo* Apoptose auslösen kann. Von dieser Funktion wird mittlerweile auch in der Tumortherapie Gebrauch gemacht.
Zur Apoptoseinduktion setzten wir TNFα in der Konzentration 40ng/ml ein und stimulierten die Schwannzellen damit für 24h bzw. 48h. Leider zeigte sich auch nach mehrfacher Wiederholung dieses Experiments und Einsetzen verschiedener Konzentrationen an TNFα kein Unterschied zwischen unstimulierten Kontrollzellen und den Zellen, die mit TNFα behandelt worden waren (Daten nicht gezeigt). Daraus war zu folgern, dass TNFα zwar in vielen Zellen Apoptose induzieren kann, diese Funktion in Schwannzellen jedoch nicht ausübt.

3.2.4 Apoptoseinduktion mit TNFα in Kombination mit TGFβ

Skoff *et al.* (1998) kamen ebenfalls zu dem Ergebnis, dass TNFα in Schwannzellen keine Apoptose induziert. Sie fanden weiterhin heraus, dass aber die Kombination des Tumornekrosefaktors TNFα mit dem transformierenden Wachstumsfaktor TGFβ zur Apoptoseinduktion verwendet werden kann. Daher führten wir weitere Apoptoseanalysen mit dieser Zytokinkombination durch.
TNFα (40 ng/ml) wurde gemeinsam mit TGFβ (10ng/ml bzw. 40ng/ml) für 24h bzw. 48h dem Kulturmedium zugesetzt. Als Negativkontrolle dienten unstimulierte Zellen, als Positivkontrolle wurde Staurosporin eingesetzt. In der TUNEL-Färbung zeigte sich für die TNFα/TGFβ stimulierten Zellen eine Steigerung der Apoptoserate, die etwa zwischen der Rate der unstimulierten und der mit Staurosporin stimulierten Zellen lag. Die deutlichsten Ergebnisse zeigten sich nach Inkubation mit 40 ng/ml TNFα und 40 ng/ml TGFβ [Abb. 12].

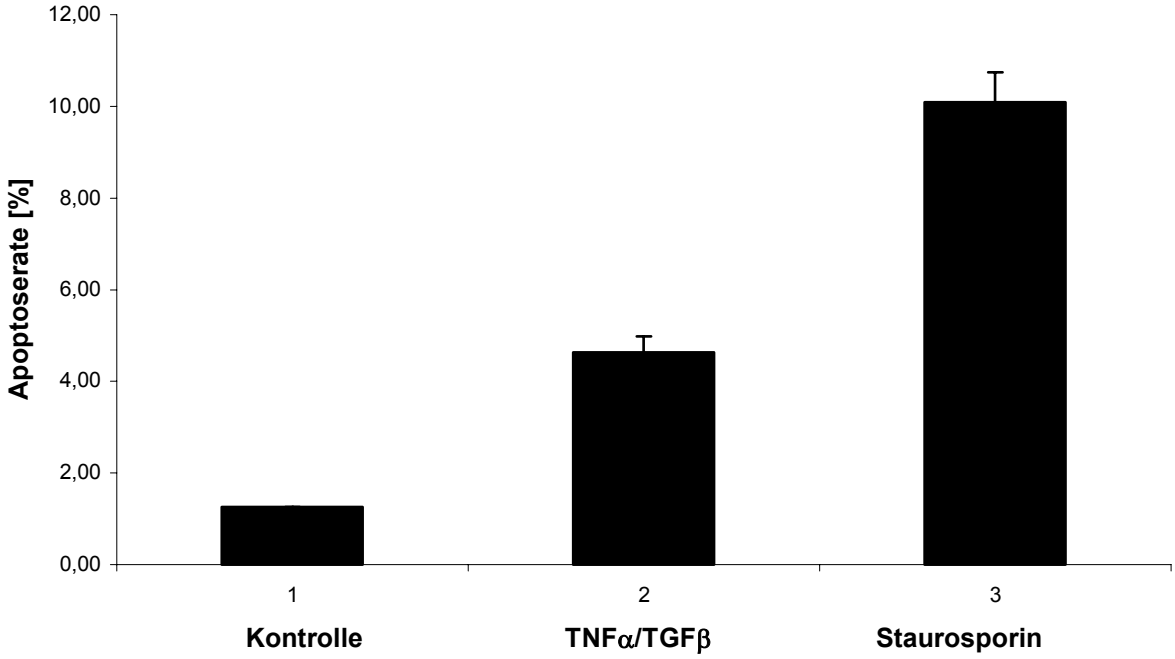


Abb. 12: Apoptoseanalyse nach Stimulation mit TNFα und TGFβ

Schwannzellen wurden auf Labtek ausplattiert (15´000/Feld) und 24h in Vollmedium kultiviert. Dann wurde dem Medium für weitere 24h eine Kombination aus TNFα (40ng/ml) und TGFβ (40ng/ml) zugesetzt. Als Positivkontrolle dienen mit Staurosporin stimulierte Schwannzellen, als Negativkontrolle unstimulierte Schwannzellen.

3.2.5 Apotoseinduktion mit SDF-1α

Über den aus Stromazellen freigesetzten Faktor 1α (SDF-1α) ist bekannt, dass er *in vitro* die Apoptose von hNT Neuronen induzieren kann [Hesselgesser *et al*., 1998]. Somit rückt auch SDF-1α in den Mittelpunkt des Interesses auf der Suche nach Apoptoseinduktoren in Schwannzellen. Die Tatsache, dass SDF-1α als spezifischer Ligand an den CXCR4-Rezeptor bindet, dessen Expression durch Mash2 hochreguliert wird, macht die Untersuchung des Einflusses von SDF-1α auf die Apoptose von Schwannzellen besonders interessant.

Schwannzellen wurden mit SDF-1α in den Konzentrationen 10ng/ml und 100ng/ml für 24h bzw. 48h stimuliert. Die anschließende Ermittlung der Apoptosedaten zeigte eine Zunahme der Zahl an apoptotischen Zellen für die SDF-1α stimulierten

Schwannzellen, die etwa mit dem Effekt der Kombination von TNFα/TGFβ vergleichbar ist. Außerdem wurde untersucht, ob eine Erhöhung des Forskolinanteils von 2µm auf 20µM einen Einfluss auf dieses Ergebnis hat, da eine Zunahme des cAMP-Agonisten zu einer verstärkten CXCR4-Expression führt [Küry *et al.*, 2002] und eine darauf folgende Zunahme der Rezeptordichte möglicherweise in einem Anstieg der SDF-1α-Wirkung resultiert. Dieser Anstieg zeigte sich nicht, wobei man aber beachten muss, dass bei einer Forskolinkonzentration von 20µM eventuell eine größere Menge an bereits abgestorbenen Zellen resultiert, die mit der Kernfärbung schon gar nicht mehr angefärbt werden können. Das Ergebnis der Apoptoseanalysen nach Stimulation mit SDF-1α zeigen Abb. 13 und 14.

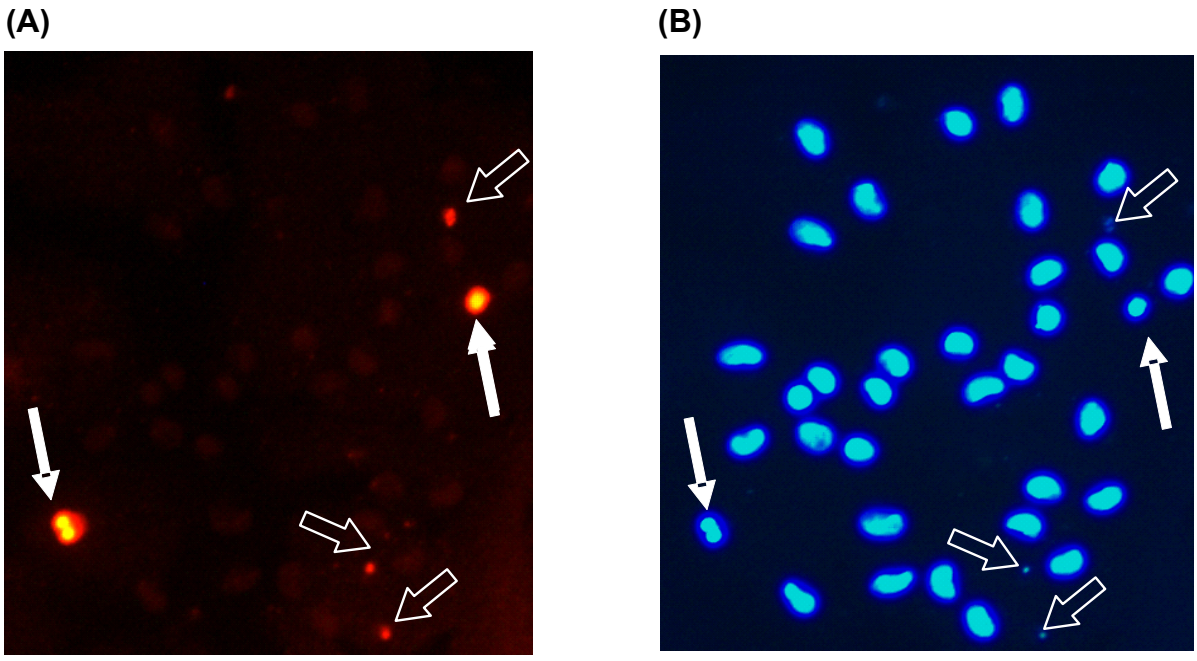


Abb. 13 TUNEL-Färbung nach Stimulation mit SDF-1α

Abbildung (A) zeigt die mit der TUNEL-Methode markierten apoptotischen Schwannzellen nach Inkubation mit 100ng/ml SDF-1α für 24h; Abbildung (B) zeigt die entsprechende Kernfärbung mit Hoechst 33342. Die weißen Pfeile markieren apoptotische Zellkörper, die offenen Pfeile markieren tote Zellen, die mit der Kernfärbung schon nicht mehr erfasst werden und auch nicht in die Auswertung eingingen. Vergrößerung 40fach.

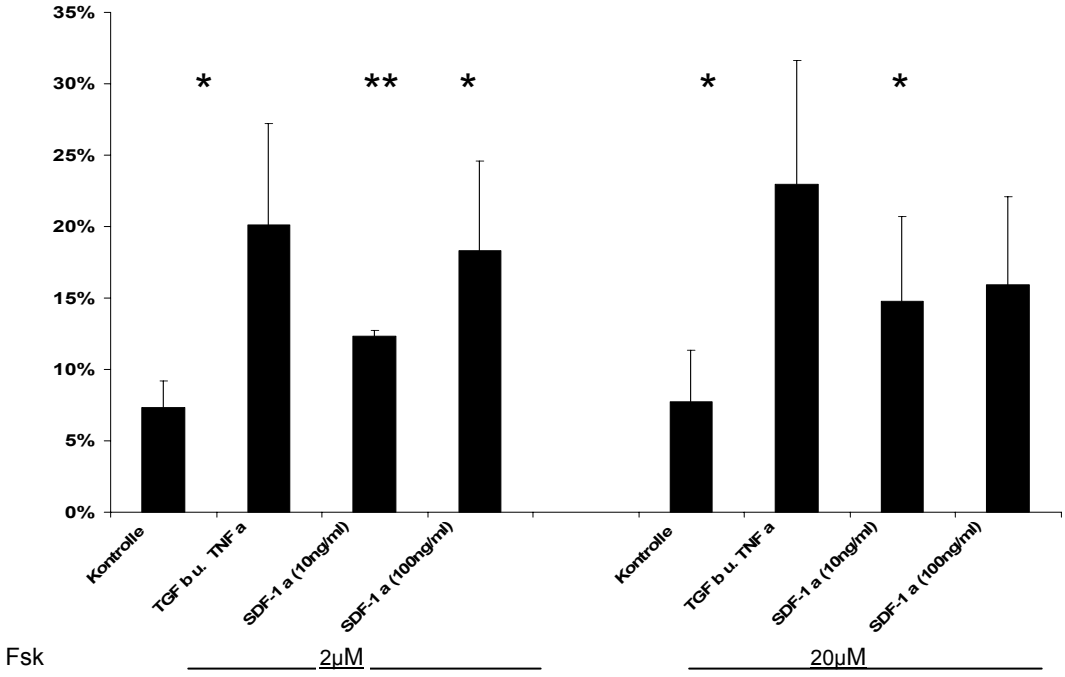


Abb. 14: Apoptoseanalyse nach Stimulation mit SDF-1α

Schwannzellen wurden auf Labtek ausplattiert (15´000/Feld) und 24h in Vollmedium kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit SDF-1α (10ng/ml und 100ng/ml), sowie mit einer Kombination aus TNFα (40ng/ml) und TGFβ (40ng/ml) stimuliert. Als Kontrolle dienten unstimulierte Zellen. Das Diagramm zeigt das Ergebnis nach Auswertung am Fluoreszenzmikroskop. Anschließend wurde ein T-Test zur Signifikanzanalyse durchgeführt, für den die Ergebnisse aus vier unabhängigen Experimenten miteinander verrechnet worden sind. (* $p<0.05$; ** $p<0.01$)

3.2.6 Apoptoseanalyse nach Stimulation mit Mob-1

Als Zielgen von Mash2 sollte auch für das Chemokin Mob-1 getestet werden, ob es Einfluss auf die Apoptose von Schwannzellen nimmt. Analog der Stimulation mit SDF-1α wurden Schwannzellen mit Mob-1 in der Konzentration 100ng/ml für 24h stimuliert. Anschließend wurde die Zahl der apoptotischen Zellen bestimmt. Dabei zeigte sich in drei voneinander unabhängigen Experimenten kein Unterschied zwischen stimulierten und unbehandelten Zellen [Abb. 15]. Mob-1 beeinflusst die Apoptoseneigung von Schwannzellen also nicht.

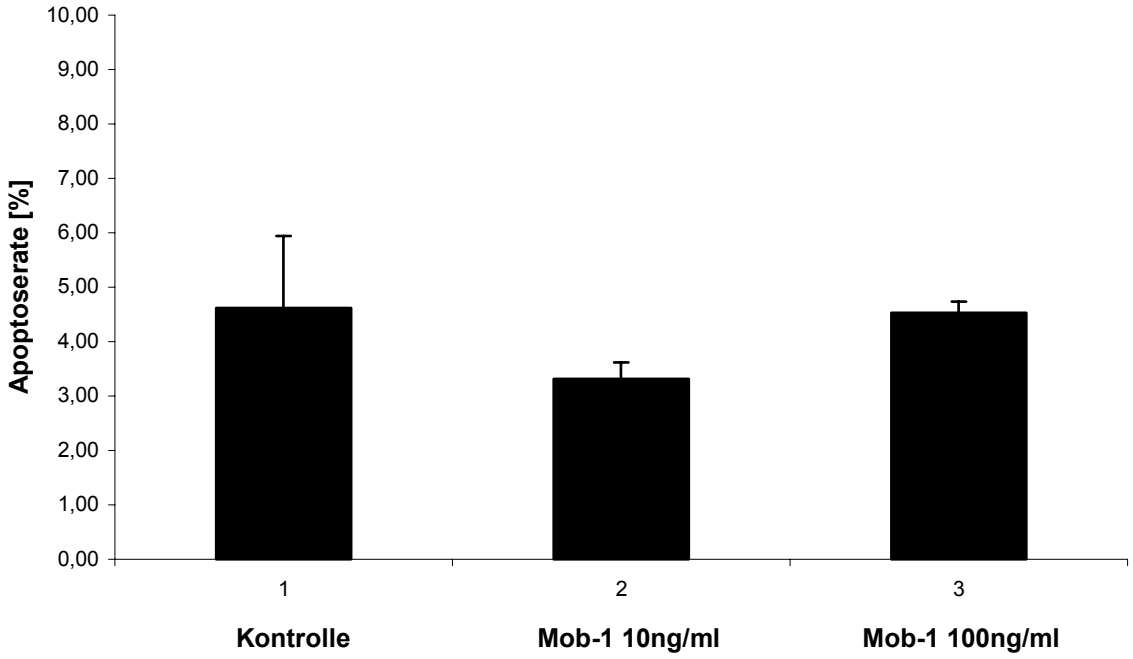


Abb. 15: Apoptoseanalyse nach Stimulation mit Mob-1

Schwannzellen wurden auf Labtek ausplattiert (15´000/Feld) und 24h in Vollmedium kultiviert. Dann wurden die Zellen für weitere 24h mit Mob-1 in den Konzentrationen 10 und 100ng/ml stimuliert. Als Kontrolle dienten unstimulierte Schwannzellen. Die Abbildung zeigt das Ergebnis der TUNEL-Auswertung.

3.2.7 Apoptoseanalyse nach Überexpression von Mash2 an unstimulierten Schwannzellen und nach Apoptoseinduktion durch Staurosporin, TNFα in Kombination mit TGFβ und SDF-1α

Um die Rolle von Mash2 auf die Regulation von Schwannzellen näher zu charakterisieren, war es interessant, neben den Auswirkungen auf die Proliferation auch seinen Einfluss auf die Apoptose zu untersuchen.

Wie schon zur Analyse der Proliferation wurden Rattenschwannzellen mit den Konstrukten pMash2-IRES2EGFP [Küry *et al*., 2002] und dem Kontrollvektor pIRES2EGFP transfiziert. Gleichzeitig fand jeweils eine Kotransfektion mit dem Plasmid pMACS 14.1 statt, so dass die transfizierten Zellen mittels magnetischen Zellsortierens selektioniert werden konnten. (Zu Transfektion und MACS siehe 2.3 und 2.4). Die transfizierten Zellen wurden zu 15´000 rSC/1cm^2 Fläche auf Labtek

ausplattiert und für 24h bzw. 48h in Kultur gehalten und anschließend mittels TUNEL-Reaktion gefärbt. Die Untersuchung der Schwannzellen bezüglich ihrer Apoptose erfolgte wiederum am Fluoreszenzmikroskop. Zur Auswertung wurde die Zahl der apoptotischen Zellen mit der Gesamtzellzahl in Beziehung gesetzt. Als Kontrolle dienten erstens die pIRES2EGFP transfizierten Schwannzellen, sowie zweitens untransfizierte und nicht selektierte Schwannzellen.

Wie schon oben beschreiben, leiten sowohl untransfizierte als auch transfizierte Schwannzellen nur selten den apoptotischen Zelltod ein, so dass jeweils nur sehr geringe Apoptoseraten ermittelt werden konnten. Die physiologische Apoptoserate für untransfizierte Schwannzellen erhöhte sich bei den transfizierten und durch das magnetisches Zellsortieren selektierten und damit zusätzlich gestressten Schwannzellen. Dementsprechend stieg die Apoptoserate der mit pIRES2EGFP transfizierten Zellen nach dem magnetischen Zellsortieren auf 12.47% an. Die Zellen, die Mash2 überexprimierten, zeigten gegenüber den nur mit dem Kontrollvektor transfizierten Zellen eine deutlich erniedrigte Apoptoserate mit 4.88% [Abb.16]. Mash2 wirkt auf Rattenschwannzellen also nicht nur antiproliferativ, sondern auch antiapoptotisch.

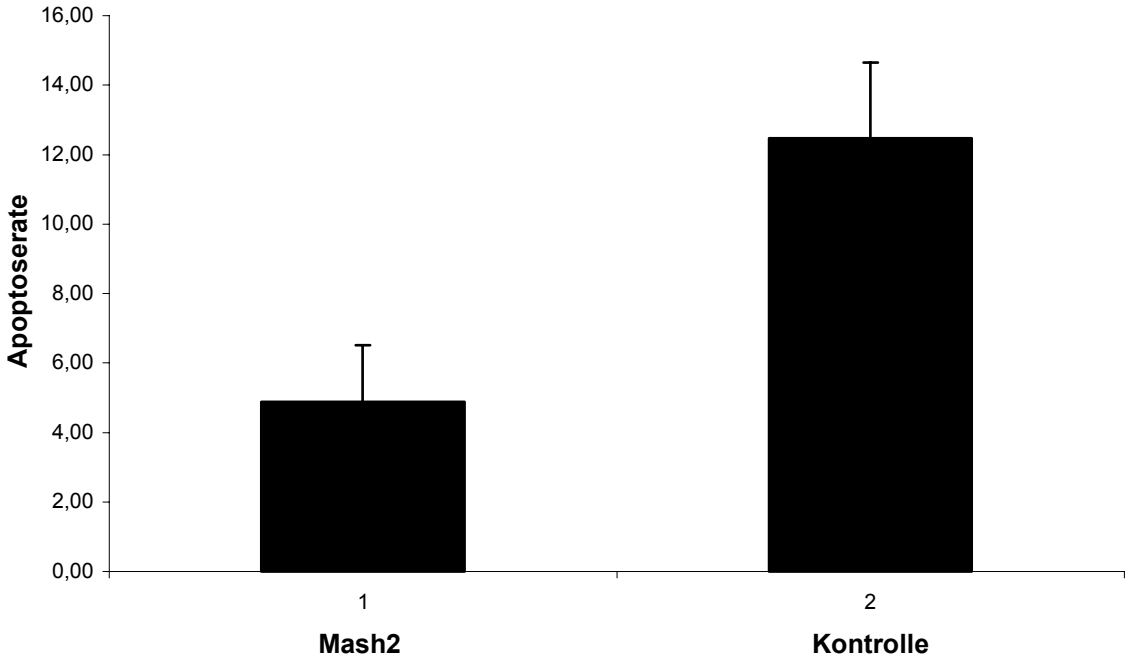


Abb. 16: Apoptoseanalyse von Mash2 überexprimierenden Zellen

Nach Transfektion mit pMash2-IRES2EGFP und Kultivierung in Vollmedium mit 10% FCS und 2µM Forskolin zeigt sich nach 24h eine signifikante Reduktion der Apoptoserate im Vergleich zu den Kontrollzellen (pIRES2EGFP). 15´000 rSC/Labtekfeld. Eins von drei unabhängigen Experimenten.

Um das Ergebnis bezüglich seiner Signifikanz besser einordnen zu können, wurde die Wirkung von Apoptoseinduktoren auch auf transfizierten Zellen getestet.
Dazu wurden transfizierte Schwannzellen nach dem magnetischen Zellsortieren und nach 24stündiger Kultivierung auf Labtek mit 10nM Staurosporin für weitere 24h zur Apoptoseinduktion stimuliert. Dann wurden, wie oben beschrieben, die Apoptoseraten für die Mash2- und Kontroll-transfizierten Zellen ermittelt [Abb.17].
Mit Staurosporin konnte die Apoptose auch in transfizierten Schwannzellen deutlich gesteigert werden, und der antiapoptotische Effekt von Mash2 stellte sich nun verstärkt dar. In dem präsentierten Experiment zeigten 17.49% der Mash2 transfizierten Zellen Apoptose, im Vergleich zu 44.91% der Kontroll-transfizierten Zellen.

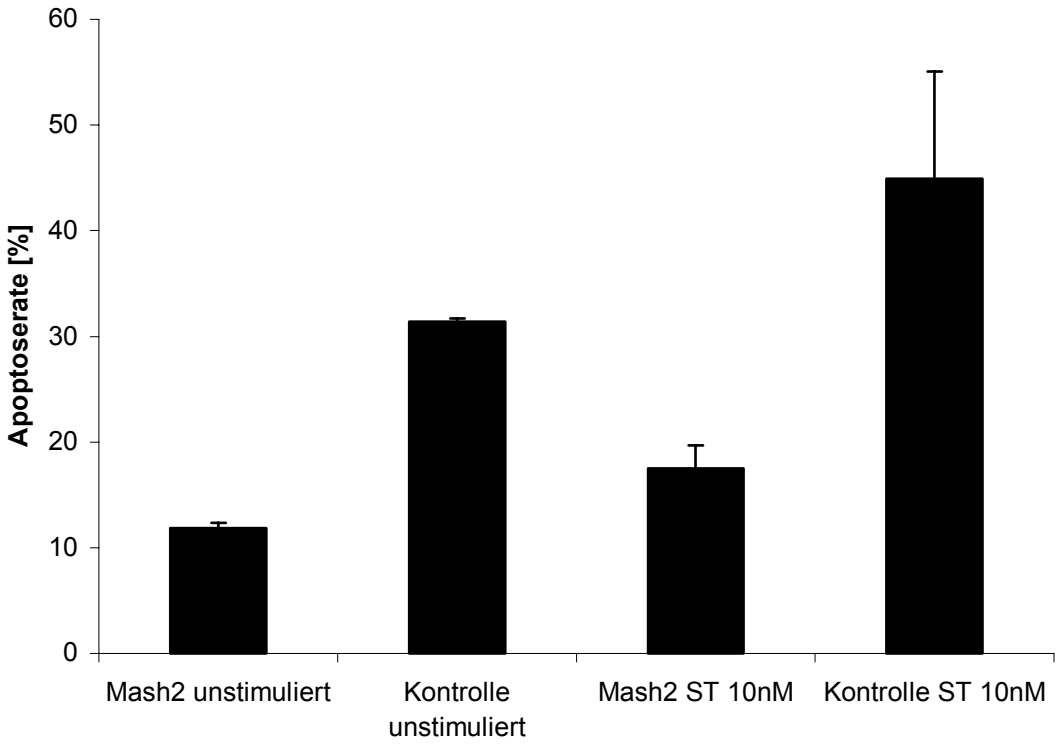


Abb. 17: Apoptoseinduktion mittels Staurosporin in Mash2 transfizierten Schwannzellen

Nach Zusatz von 10nM Staurosporin zum Kulturmedium für 24h kam es zu einem signifikanten Anstieg der Apoptoserate von Rattenschwannzellen, die mit Mash2 und pIRES2EGFP transfiziert worden waren. Mash2 überexprimierende SC zeigen signifikant niedrigere Apoptoseraten. ST=Staurosporin. Zelldichte: 15´000/Labtekfeld. Eins von zehn unabhängigen Experimenten.

Da Staurosporin kein physiologischer Apoptoseinduktor ist, der natürlicherweise seine Funktion in Schwannzellen ausübt, wurde die Apoptose der Mash2 überexprimierenden Zellen auch nach Stimulation mit der Kombination aus TNFα und TGFβ gemessen. So konnte man Ergebnisse gewinnen, die mit *in vivo* vorherrschenden Verhältnissen eher vergleichbar sind. Dabei wurde TNFα (40ng/ml), wie schon für die untransfizierten Zellen beschrieben, gemeinsam mit TGFβ (40ng/ml) für 24h dem Kulturmedium zugesetzt.

Auch in diesem Experiment trat eine Steigerung der Apoptoserate sowohl der Mash2 als auch der Kontroll-transfizierten Zellen auf. Unter den Kontrollzellen waren deutlich mehr apoptotische Zellen (33.88%) zu finden als unter denjenigen, die Mash2 überexprimierten (18.49%) [Abb. 18]. Der antiapoptotische Effekt von Mash2 tritt also auch bei physiologischer Apoptoseinduktion in Erscheinung.

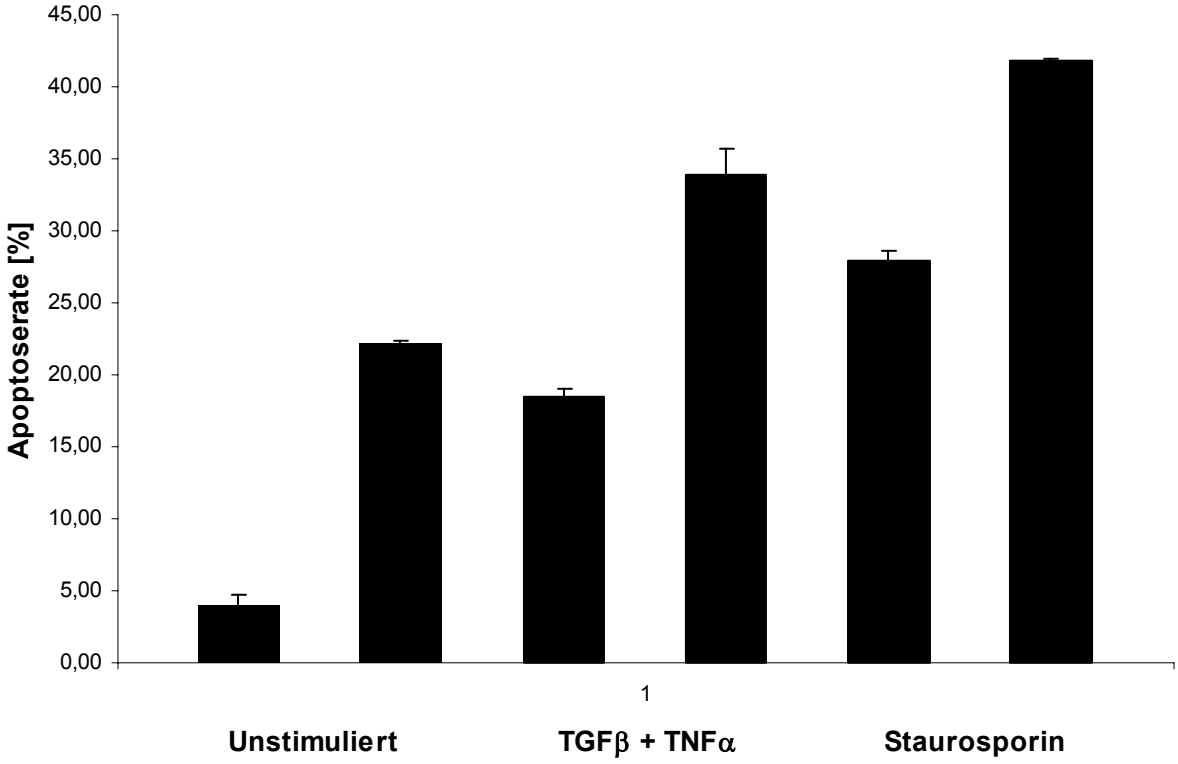


Abb. 18: Apoptoseinduktion mit TNFα in Kombination mit TGFβ in Mash2 und pIRES2EGFP transfizierten Schwannzellen

Schwannzellen wurden mit Mash2 und dem Kontrollvektor transfiziert, mittels magnetischen Zellsortierens selektiert, auf Labtek ausplattiert (15´000/Feld) und 24h in Vollmedium kultiviert. Dann wurde dem Medium für weitere 24h eine Kombination aus TNFα (40ng/ml) und TGFβ (40ng/ml) zugesetzt. Als Positivkontrolle dienten mit Staurosporin 10nM stimulierte, als Negativkontrolle unstimulierte, transfizierte Schwannzellen. Der erste Balken stellt jeweils die Mash2-transfizierten Zellen dar, der zweite Balken jeweils die Kontrollzellen.

Für das Chemokin SDF-1α sind proapoptotische Funktionen an Zellen des Nervensystems beschrieben worden und die vorangegangenen Experimente bewiesen einen positiven Einfluss auf die Apoptose von Schwannzellen. Da SDF-1α an den CXCR4-Rezeptor bindet, dessen Expression durch Mash2 hochreguliert wird, wurde natürlich auch die Reaktionen der Mash2 überexprimierenden Schwannzellen auf die Stimulation mit dem Chemokin untersucht. Dazu wurden transfizierte Schwannzellen nach dem magnetischen Zellsortieren und nach 24stündiger Kultivierung auf Labtek mit 10ng/ml und 100 ng/ml SDF-1α für weitere 24h zur Apoptoseinduktion stimuliert.

Die Auswertung zeigte, dass sich die Apoptosebereitschaft von transfizierten Schwannzellen auch durch Stimulation mit SDF-1α steigern ließ, und zwar in einem vergleichbaren Ausmaß zur Apoptoseinduktion durch die Kombination aus TNFα und TGFβ. Auch unter Stimulation mit SDF-1α trat der antiapoptotische Effekt von Mash2 deutlich hervor: von den Mash2 überexprimierende Schwannzellen waren 19.80% apoptotisch, von den mit dem Kontrollvektor transfizierten Zellen waren es 30.69% [Abb. 19].

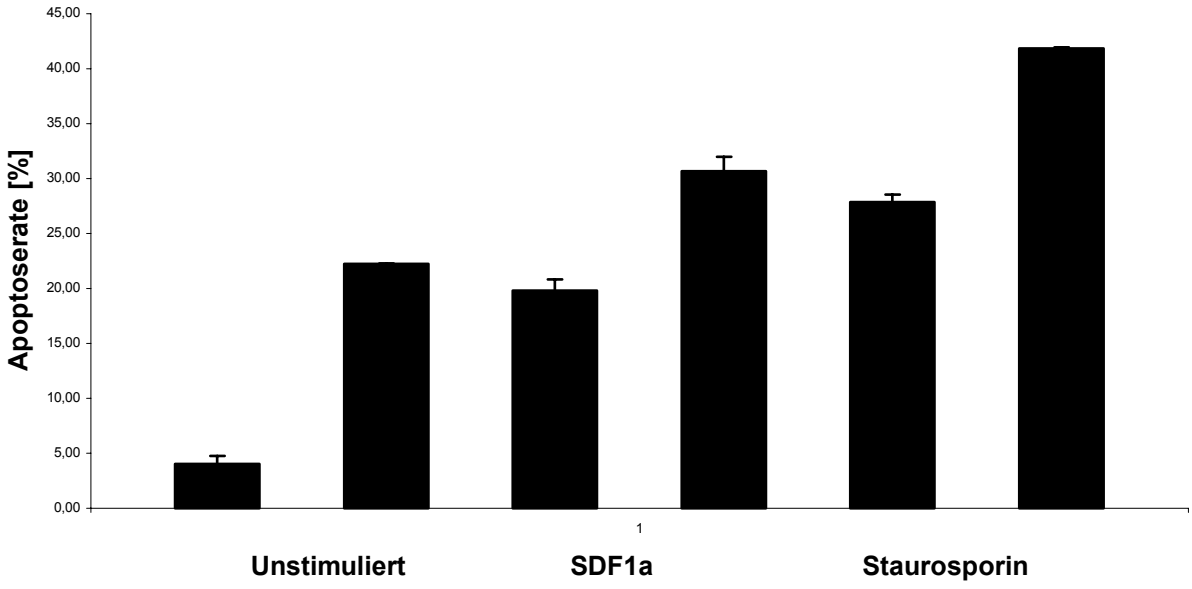


Abb. 19: Apoptoseinduktion mit SDF-1α in Mash2 und pIRES2EGFP transfizierten Schwannzellen

Schwannzellen wurden mit Mash2 und pIRES2EGFP transfiziert, mittels magnetischen Zellsortierens selektiert, auf Labtek ausplattiert (15´000/Feld) und 24h in Vollmedium kultiviert. Dann wurde dem Medium für weitere 24h 100ng/ml SDF-1α zugesetzt. Als Positivkontrolle dienten mit Staurosporin 10nM stimulierte SZ, als Negativkontrolle unstimulierte SZ. Der erste Balken zeigt die mit Mash2 trasnfizierten Zellen, der zweite die mit dem Kontrollvektor pIRES2EGFP transfizierten Zellen. Eines von drei unabhängigen Experimenten.

3.3 p57kip2

3.3.1 Klonierung und Sequenzierung von p57kip2

p57kip2 hat als Inhibitor der Cyclin-abhängigen Kinasen A und E einen direkten Einfluss auf den Zellzyklus und stellt daher eines der interessantesten Zielgene des Transkriptionsfaktors Mash2 dar, während die Expression weiterer nah verwandter Kinaseinhibitoren (p21cip2, p27kip1) durch Mash2 unbeeinflusst bleibt, so dass man von einer sehr spezifischen Regulation ausgehen kann [Küry *et al*., 2002]. Von p57kip2 war bisher aber nur die Gensequenz von Mensch und Maus bekannt, nicht aber die Rattensequenz. Zur Überexpression von p57kip2 in Rattenschwannzellen und anschließender Untersuchung des Einflusses auf Proliferation und Apoptose der Rattenschwannzellen war es aber notwendig, die Rattensequenz zu kennen, um die entsprechende cDNA klonieren zu können. Von der Rattensequenz waren bisher nur Fragmente des 3´Endes bekannt, Mittelstück und 5´Ende waren noch unbekannt. Nach Abgleich der bekannten Sequenzen von Maus und Ratte wurden mehrere Primer synthetisiert, die 3´Ende, Mittelstück und 5´Ende abdeckten. Dann wurde RNA aus Rattenschwannzellen isoliert und in einer Reversen Transkription in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Mit dieser cDNA und den synthetisierten p57kip2 Primern wurde eine PCR durchgeführt. Die amplifizierte kodierende Region des p57kip2 Gens hatte eine Länge von 1040 bp, was einer vorhergesagten Proteingröße von ca. 40kDa entspricht. Das PCR-Produkt wurde zur vollständigen Sequenzierung mit Hilfe des TOPO Klonierungssystems (Invitrogen) nach den Herstellerangaben in den pCR-Vektor einkloniert. Das Ligationsprodukt wurde in kompetente *E. coli* Bakterien (TOP 10) transformiert, die auf LB-Platten mit Ampicillin oder Kanamyzin ausgestrichen und über die im Vektor enthaltenen Resistenzgene selektioniert wurden. Die entstandenen Klone wurden isoliert und vermehrt. Anschließend wurde die DNA mittels Mini- oder Maxi-Präparation isoliert, mit EcoRI geschnitten und mit der Shrimp Alkali Phosphatase (SAP) dephosphoryliert [Abb. 20].

Danach wurden vier unabhängige Klone durch verschiedene Primer (Kip1up, kip3up, kip2up, kip2fwd, kip4up, kip5up, kip6up, kip10up, ratkip2frag1, ratkip2frag) mehrfach überlappend sequenziert. Abb. 21 zeigt die gesamte kodierende Region des p57kip2 der Ratte.

Um Rattenschwannzellen mit der gewonnenen cDNA transfizieren zu können, wurde das gesuchte DNA-Fragment in einen pIRES2EGFP-Vektor (Clontech) mit Hilfe des T4 Rapid Ligation Kit umkloniert [Abb. 22] und das Ligationsprodukt wiederum in *E.coli* Bakterien transformiert. Die aus den Bakterien präparierte DNA konnte nun zur Überexpression von p57kip2 in Rattenschwannzellen mittels Transfektion eingesetzt werden.

Der gewonnene p57kip2-Expressionsvektor wurde nun zur Transfektion von Schwannzellen verwendet, um das Verhalten p57kip2 überexprimierender Zellen zu analysieren.

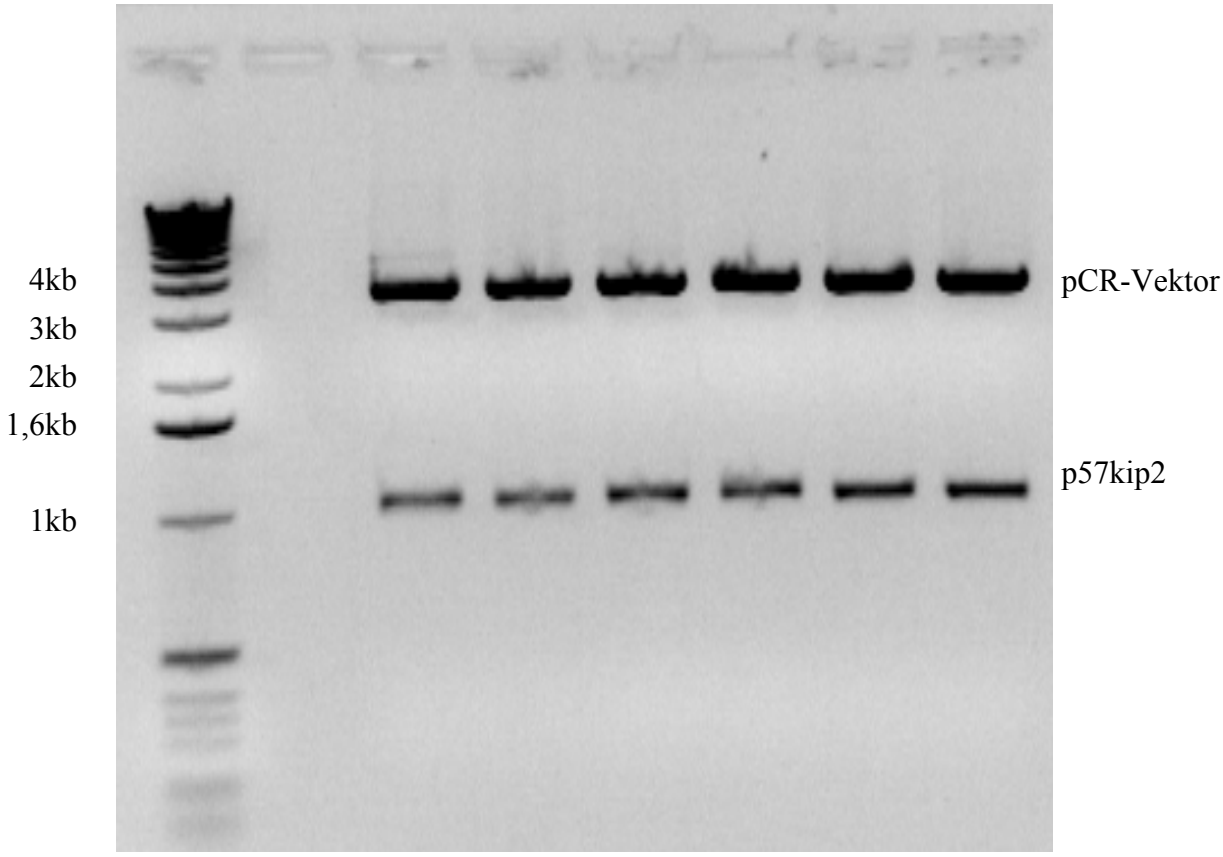
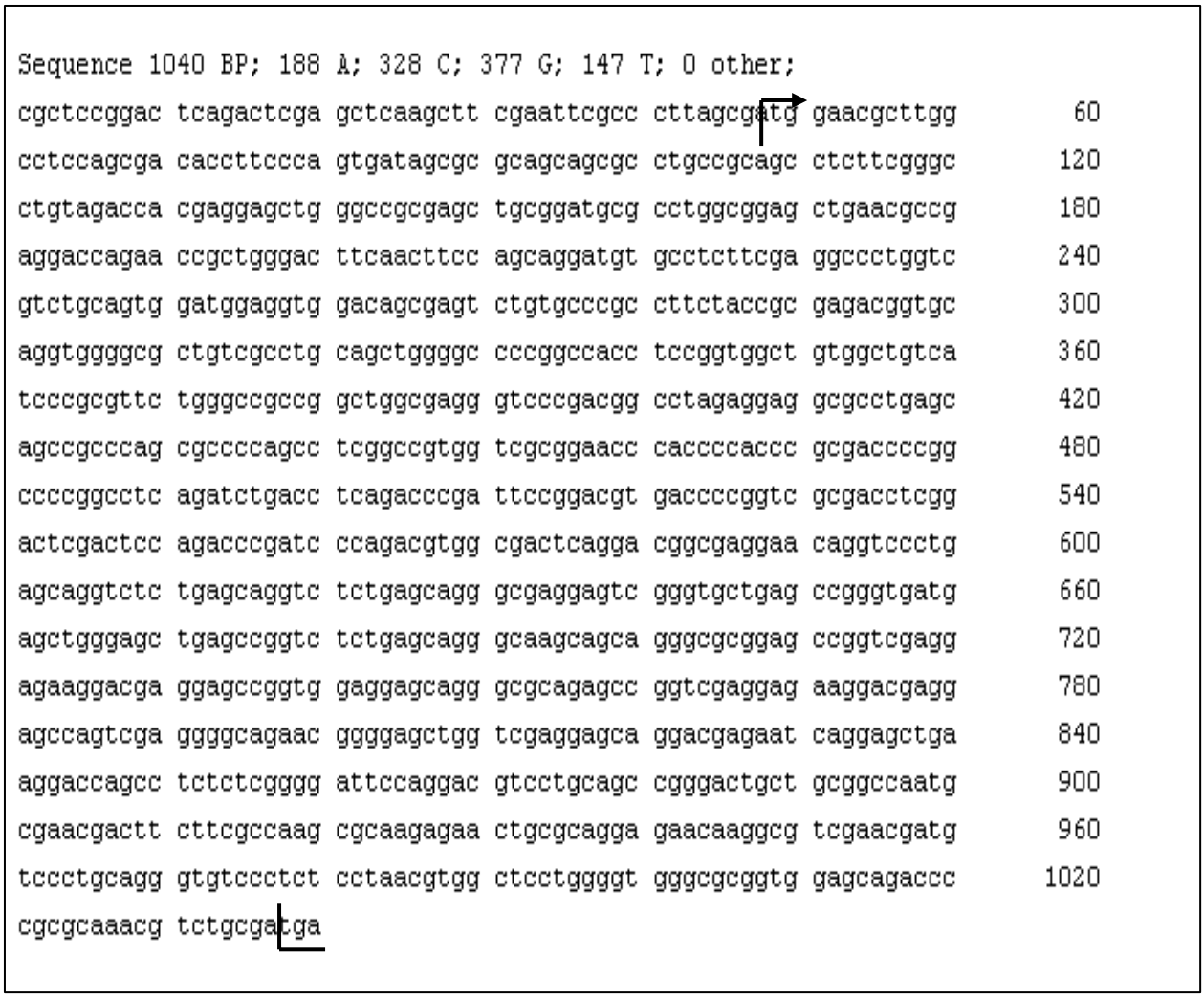


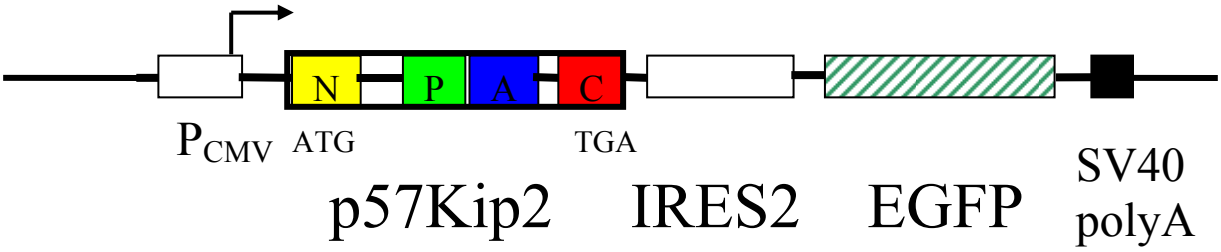
Abb. 20: Die Abbildung zeigt die gelelektrophoretische Auftrennung von aus sechs verschiedenen Klonen gewonnener DNA, nachdem sie mit EcoRI geschnitten und mittels SAP dephosphoryliert worden war. Das p57kip2-Fragment erscheint bei 1040bp, der Vektor bei 3,9kb. Als Marker dient eine 1kb-Leiter.



```
Sequence 1040 BP; 188 A; 328 C; 377 G; 147 T; 0 other;
cgctccggac tcagactcga gctcaagctt cgaattcgcc cttagcgatg gaacgcttgg        60
cctccagcga caccttccca gtgatagcgc gcagcagcgc ctgccgcagc ctcttcgggc       120
ctgtagacca cgaggagctg ggccgcgagc tgcggatgcg cctggcggag ctgaacgccg       180
aggaccagaa ccgctgggac ttcaacttcc agcaggatgt gcctcttcga ggccctggtc       240
gtctgcagtg gatggaggtg gacagcgagt ctgtgcccgc cttctaccgc gagacggtgc       300
aggtggggcg ctgtcgcctg cagctggggc cccggccacc tccggtggct gtggctgtca       360
tcccgcgttc tgggccgccg gctggcgagg gtcccgacgg cctagaggag gcgcctgagc       420
agccgcccag cgccccagcc tcggccgtgg tcgcggaacc caccccaccc gcgaccccgg       480
ccccggcctc agatctgacc tcagacccga ttccggacgt gaccccggtc gcgacctcgg       540
actcgactcc agacccgatc ccagacgtgg cgactcagga cggcgaggaa caggtccctg       600
agcaggtctc tgagcaggtc tctgagcagg gcgaggagtc gggtgctgag ccgggtgatg       660
agctgggagc tgagccggtc tctgagcagg gcaagcagca gggcgcggag ccggtcgagg       720
agaaggacga ggagccggtg gaggagcagg gcgcagagcc ggtcgaggag aaggacgagg       780
agccagtcga ggggcagaac ggggagctgg tcgaggagca ggacgagaat caggagctga       840
aggaccagcc tctctcgggg attccaggac gtcctgcagc cgggactgct gcggccaatg       900
cgaacgactt cttcgccaag cgcaagagaa ctgcgcagga gaacaaggcg tcgaacgatg       960
tccctgcagg gtgtccctct cctaacgtgg ctcctggggt gggcgcggtg gagcagaccc      1020
cgcgcaaacg tctgcgatga
```

Abb. 21: cDNA Sequenz des p57kip2 der Ratte

Die cDNA-Sequenz hat eine Gesamtlänge von 1040 Basenpaaren, der Start (ATG) befindet sich bei 48 bp, das Ende (TGA) bei 1038 bp.



N-Terminus: CDK-Cyclin-Komplex-binding and inhibition
C-Terminus: Nuclear localization signal
P: Prolin-rich domain
A: Acidic-repeat domain

Abb. 22: Expressionsvektor p57kip2

Die Abbildung zeigt die Sequenz des Expressionsvektors p57kip2, zur Erstellung dieses Konstruktes wurde p57kip2 in einen pIRES2EGFP-Vektor einkloniert. N- und C-Terminus stellen konservierte Domänen dar, P-und A-Domäne repräsentieren die Abweichungen zwischen Ratten- und Maussequenz.

3.3.2 Analyse der p57kip2-transfizierten Zellen mittels quantitativer RT-PCR

Zur Analyse des Genexpressionsprofils von Schwannzellen, die mit der neu synthetisierten p57kip2-DNA transfiziert wurden, kam es zum Einsatz von quantitativer RT-PCR. Zunächst wurden die Schwannzellen mit p57kip2-IRES2EGFP und Mash2-IRES2EGFP und als Kontrolle mit pIRES2EGFP transfiziert und mittels magnetischen Zellsortierens selektioniert. Anschließend wurde die RNA isoliert, in einer reversen Transkription in cDNA umgeschrieben und mittels quantitativer RT-PCR vermessen. Als Referenzgene dienten Glyzeraldehyd 3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH) und Ornithin-Decarboxylase (ODC). Als Primer wurden p57kip2forward, p57kip2reverse, Mash2_2forward und Mash2_2reverse verwendet. Damit wurde quantitativ die Anzahl der Transkripte von p57kip2 und Mash2 ermittelt. Es zeigte sich beim Einsatz der p57kip2-Primer ein deutlicher Anstieg der p57kip2-Expression in p57kip2-transfizierten Zellen, sowie eine moderate aber signifikante Induktion von p57kip2 durch Mash2 (siehe auch Küry *et al.*, 2002) [Abb. 24]. In Analogie zu den Daten von Küry *et al.*, 2002, führt die Transfektion von pMash2-IRES2EGFP zu einer starken Mash2-Überexpression. Interessanterweise führt aber auch die Transfektion von p57kip2 zu einer Mash2-Induktion [Abb. 23]. Somit konnte bewiesen werden, dass die klonierte p57kip2-DNA tatsächlich in Schwannzellen

überexprimiert wird, gleichzeitig konnte bestätigt werden, dass p57kip2 durch Mash2 induziert wird [Küry *et al*., 2002].

.

Abb. 23

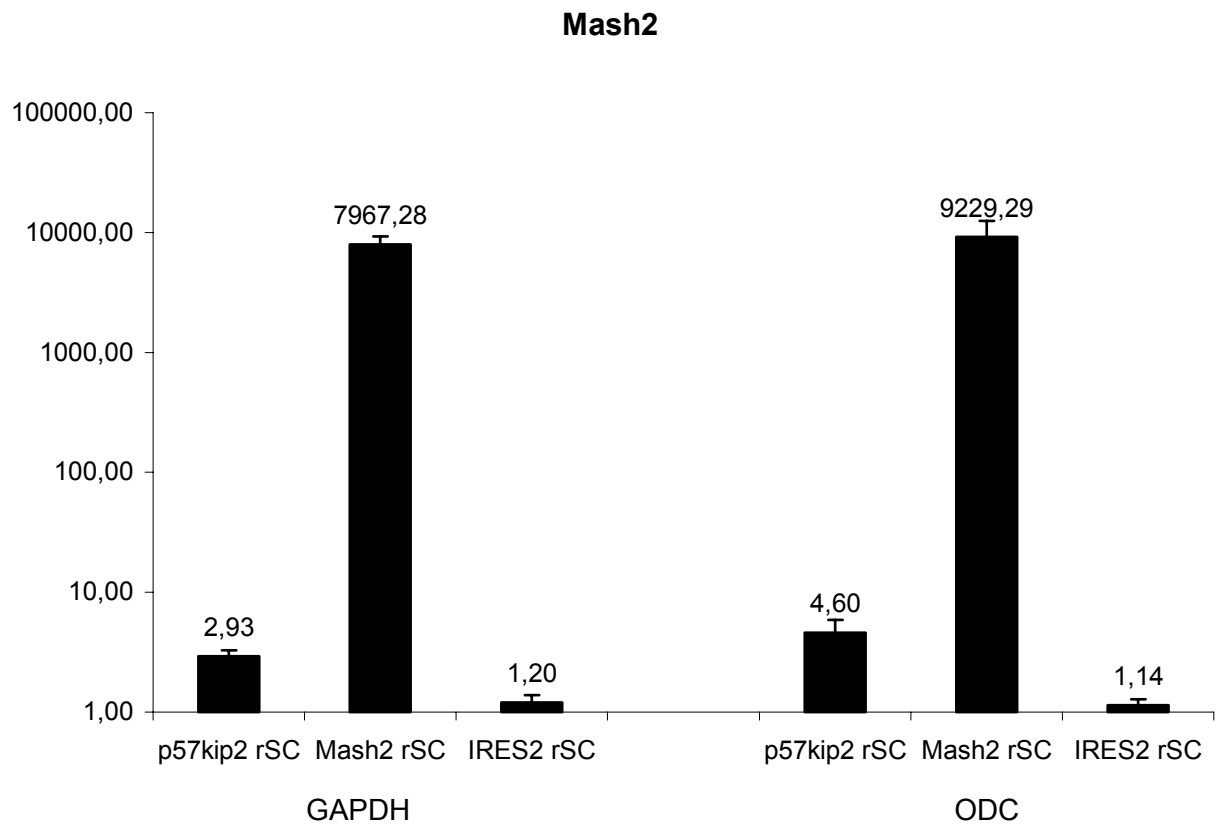


Abb. 23: Quantitative RT-PCR Analyse der Mash2-Expression

Schwannzellen wurden mit p57kip2-IRES2EGFP, Mash2-IRES2EGFP und pIRES2EGFP transfiziert, anschließend mittels magnetischen Zellsortierens selektioniert und ausplattiert. Danach wurde die RNA extrahiert, in cDNA umgeschrieben und die Mash2-Expression mittels quantitativer PCR analysiert. Als Primer wurden p57kip2forward, p57kip2reverse, Mash2_2forward und Mash2_2reverse eingesetzt, als Referenzgene dienten jeweils GAPDH und ODC. Ein repräsentatives Ergebnis von drei wird gezeigt.

Abb. 24

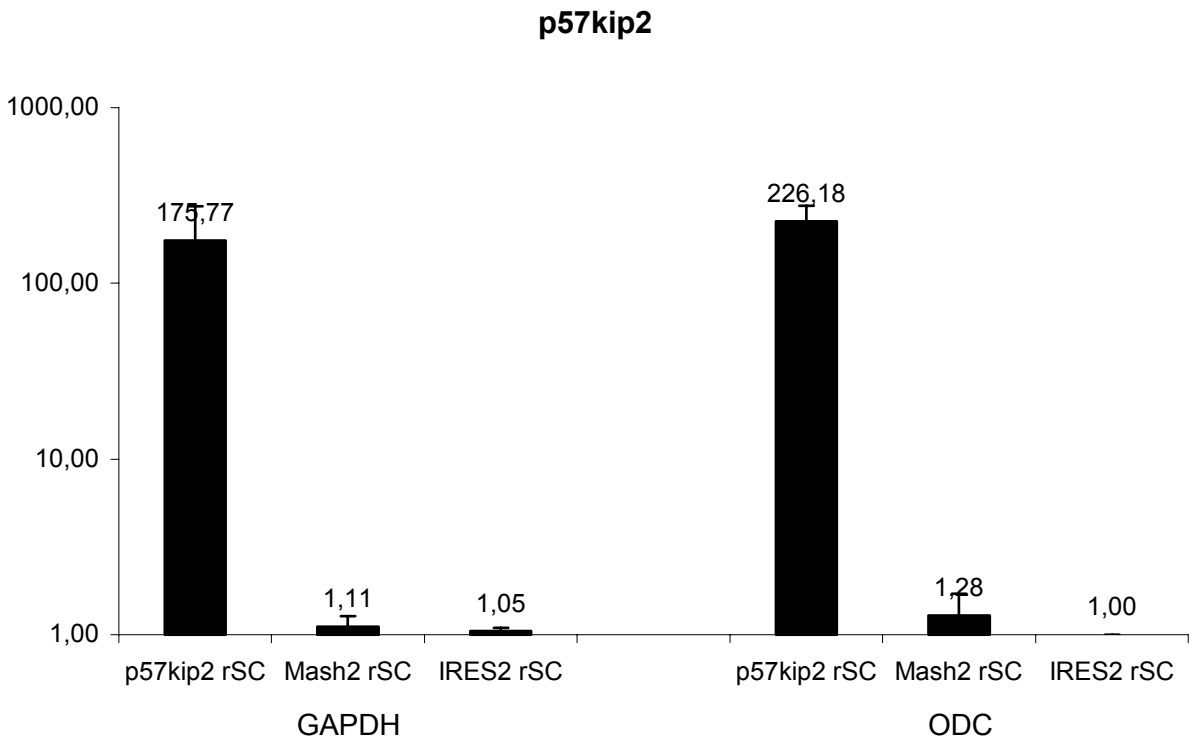


Abb. 24: Quantitative RT-PCR Analyse der p57kip2-Expression

Schwannzellen wurden mit p57kip2-IRES2EGFP, Mash2-IRES2EGFP und pIRES2EGFP transfiziert, anschließend mittels magnetischen Zellsortierens selektioniert und ausplattiert. Danach wurde die RNA extrahiert, in cDNA umgeschrieben und die Expression von p57kip2 mittels quantitativer PCR analysiert. Als Primer wurden p57kip2forward, p57kip2reverse, Mash2_2forward und Mash2_2reverse eingesetzt, als Referenzgene dienten jeweils GAPDH und ODC. Ein repräsentatives Ergebnis von drei wird gezeigt.

3.3.3 Apoptoseanalyse nach Überexpression von p57kip2

p57kip2, ein Inhibitor der Cyclin-abhängigen Kinasen A und E und somit beteiligt an der Inhibition des Zellzyklus, wird durch Mash2 hochreguliert und scheint den antiproliferativen Effekt von Mash2 auf Schwannzellen zu übermitteln [Küry *et al*., 2002]. Um dies zu testen, wurden p57kip2 überexprimierende Schwannzellen bezüglich ihrer Proliferationsrate untersucht. Zudem stellt sich die Frage, ob p57kip2 eventuell auch als Mediator des antiapoptotischen Effektes agiert.

Um seinen Einfluss auf die Apoptose von Schwannzellen zu bestimmen, wurden diese mit p57kip2-IRES2EGFP und pIRES2EGFP als Kontrollvektor transfiziert.

Gleichzeitig fand eine Kotransfektion mit dem CD14-Expressionsvektor pMACS-14.1 statt. Die transfizierten Zellen wurden durch magnetisches Zellsortieren von den untransfizierten getrennt und in einer Dichte von 15´000/Feld auf Labtek ausgesät. Nach 24-stündiger Kultivierung wurde das Schwannzellmedium zur Apoptoseinduktion mit SDF-1α (100ng/ml), TNFα (40ng/ml) in Kombination mit TGFβ (40ng/ml) oder Staurosporin (10nM) versetzt und die Zellen damit weitere 24h stimuliert. Daran schlossen sich Fixation, TUNEL-Färbung und Auswertung am Fluoreszenzmikroskop an.

Folgendes Ergebnis konnte ermittelt werden: p57kip2 hemmt ebenso wie Mash2 die Apoptose von Schwannzellen. Abb. 25 zeigt eines von drei repräsentativen Experimenten. Schon bei den unstimulierten Kontrollzellen zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Apoptoseraten der p57kip2- und der pIRES2EGFP transfizierten Schwannzellen; nur 4.4% der p57kip2 überexprimierenden Zellen waren apoptotisch im Vergleich zu 22.22% der mit dem Kontrollvektor pIRES2EGFP transfizierten Zellen. Dieser Effekt verdeutlichte sich durch Induktion der Apoptose mit verschiedenen Stimulanzien. So zeigten bei Stimulation mit SDF-1α (100ng/ml) 6.76% der p57kip2 überexprimierenden Schwannzellen Apoptose, während SDF-1α bei 30.69% der Kontroll-transfizierten Zellen Apoptose auslöste. Apoptoseinduktion mit TNFα (40ng/ml) in Kombination mit TGFβ (40ng/ml) stellte sich ähnlich dar: 13.74% TUNEL-positive p57kip2 überexprimierende Schwannzellen im Vergleich zu 33.88% apoptotischen Kontroll-transfizierten Zellen. Staurosporin (10nM) diente als Positivkontrolle für die Apoptoseinduktion. Auch in diesem Versuch zeigte sich eine deutliche Differenz zwischen den p57kip2 überexprimierenden Schwannzellen, von denen nur 23.89% Apoptose eingeleitet hatten, und den mit dem Kontrollvektor pIRES2EGFP transfizierten Zellen, bei denen 41,84% apoptotisch waren. Da diese Ergebnisse denen entsprechen, die bei der Apoptoseanalyse von Schwannzellen nach Überexpression von Mash2 ermittelt werden konnten, ist anzunehmen, dass p57kip2 nicht nur als Mediator des antiproliferativen Effektes agiert, sondern auch für die Übermittlung der antiapoptotischen Funktion verantwortlich ist.

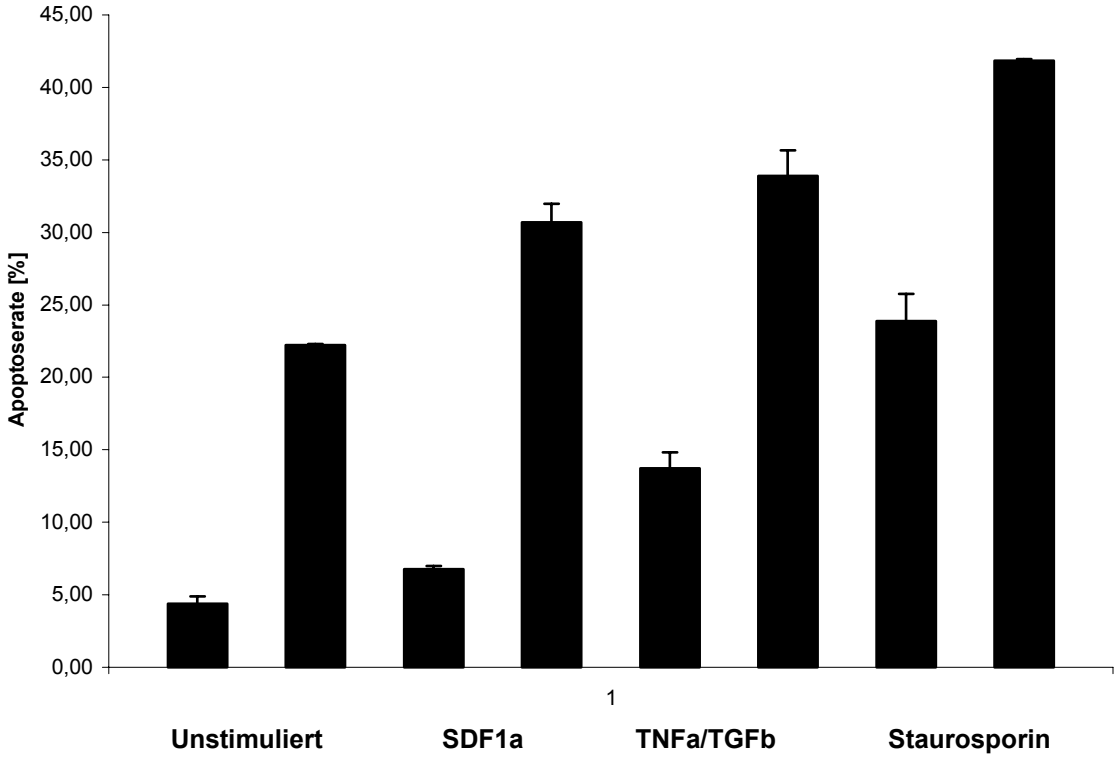


Abb. 25: Apoptoseanalyse von p57kip2 überexprimierenden Schwannzellen und Apoptoseinduktion mit SDF-1α, TNFα in Kombination mit TGFβ und Staurosporin

Schwannzellen wurden mit p57kip2-IRES2EGFP und pIRES2EGFP transfiziert, mittels magnetischen Zellsortierens selektiert, auf Labtek ausplattiert (15´000/Feld) und 24h in Vollmedium kultiviert. Dann wurde dem Medium für weitere 24h 100ng/ml SDF-1α, eine Kombination aus TNFα (40ng/ml) und TGFβ (40ng/ml) oder Staurosporin (10nM) zugesetzt. Als Kontrolle dienten unstimulierte Schwannzellen. Der erste Balken stellt jeweils die mit p57kip2-IRES2EGFP transfizierten Zellen, der zweite Balken die mit pIRES2EGFP transfizierten Zellen dar. Eines von drei unabhängigen Experimenten.

4. Diskussion

Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollte die Rolle und Bedeutung des Transkriptionsfaktors Mash2 im peripheren Nervensystem untersucht werden. Dabei sollten auch die Funktionen der von ihm regulierten Zielgene, zu denen der Transkriptionsfaktor Krox-24, das Chemokin Mob-1, der Chemokinrezeptor CXCR4 und der Inhibitor Cyclin-abhängiger Kinasen p57kip2 gehören, näher analysiert werden. In dieser Arbeit wurde in verschiedenen *in vitro* Experimenten das Proliferations- und Apoptoseverhalten von Schwannzellen untersucht und der Einfluss von Mash2 und seiner Zielgene auf diese bedeutsamen Zellfunktionen dargestellt.

4.1 Mash2 und seine Zielgene

Über die Funktionen des bHLH-Transkriptionsfaktors Mammalian Achaete Scute Homolog 2 (Mash2) ist bisher wenig bekannt. Neben seiner Rolle in der Entwicklung des Spongiotrophoblasten der Plazenta in der frühen Phase der Embryogenese waren bisher keine weiteren Funktionen in der Literatur beschrieben worden. Der Befund, dass dieser Transkriptionsfaktor auch von Rattenschwannzellen des peripheren Nervensystems exprimiert wird, war deshalb überraschend und von großem Interesse [Küry *et al*., 2002]. Über Rolle und Bedeutung von Mash2 für die Schwannzellen können aber nur die Gene Auskunft geben, deren Expression unter der Regulation des Transkriptionsfaktors Mash2 steht. Als spezifische Zielgene von Mash2 konnten der Transkriptionsfaktor Krox-24, das Chemokin Mob-1, der Chemokinrezeptor CXCR4 und der Inhibitor Cyclin-abhängiger Kinasen p57kip2 identifiziert werden. Die Expression von Krox-24 und Mob-1 wird durch Mash2 supprimiert, von CXCR4 und p57kip2 dagegen induziert. Mit Hilfe der spezifischen Zielgene soll die Funktion der übergeordneten regulierenden Einheit, die Mash2 als Transkriptionsfaktor verkörpert, näher charakterisiert werden.

Eines der spezifischen Zielgene von Mash2 ist der Transkriptionsfaktor Krox-24, dessen Transkription durch Mash2 gehemmt wird. Krox-24 kodiert ein 54 Kilodalton Protein mit drei „Zink-Fingern“, d.h. drei DNA-Bindungsdomänen aus 28-30 Aminosäuren mit koordinierten Zinkionen. Es gehört damit wie das nah verwandte Krox-20 zur

Gruppe der „Zinkfinger“-Transkriptionsfaktoren [Milbrandt, 1987; Lemaire *et al*., 1988]. Krox-20 und Krox-24 binden *in vitro* an identische DNA-Bindungsdomänen [Lemaire *et a*l., 1988]. Krox-24 wird wie eine Reihe von anderen Genen in Zellkultur durch Serumwachstumsfaktoren aktiviert, es zählt dabei zu den Genen mit einer sehr frühen Serumantwort [Christy *et al*., 1988]. Es gibt eine Reihe von Synonymen für Krox-24: zif/268 (nach dem cDNA Klon, den Christy *et al*. 1988 identifizierten), NGFI-A (nach Milbrandt, 1987, der publizierte, dass dieser Faktor durch den Nervenwachstumsfaktor NGF induziert wurde), egr-1, TIS-8 oder zenk. Während der Embryogenese wird Krox-24 von Schwannzellvorläuferzellen exprimiert, Krox-20 kann zu diesem Zeitpunkt nicht nachgewiesen werden. Erst ab dem 15.5 Tag post conceptionem steigt unter Neuregulinkontrolle die Zahl der Krox-20-Transkripte, während Krox-24 gleichzeitig supprimiert wird, korrespondierend dazu findet die Umwandlung der Vorläuferzellen in Embryonale Schwannzellen statt. Zum Zeitpunkt der Geburt sind beide Faktoren dann ko-exprimiert, später aber kann Krox-24 nur in nicht-myelinisierenden Schwannzellen des adulten Nerven nachgewiesen werden. Krox-20 dagegen findet sich unter Einfluss axonaler Signale in der myelinisierenden Schwannzellreihe, so dass die Vermutung entstand, dass Krox-20 und Krox-24 bezüglich der Kontrolle der Myelinisierung von Schwannzellen antagonistische Funktionen einnehmen [Topilko *et al*., 1997]. Eine gegensätzliche Regulation von Krox-20 und Krox-24 zeigt sich auch im Rahmen der Waller´schen Degeneration: nach einer Nervenläsion kommt es sowohl im distalen als auch im proximalen Anteil des Nervens zu einer starken Induktion von Krox-24, während Krox-20 supprimiert wird [Topilko *et al*., 1997]. Während der Waller´schen Degeneration kommt es zur Demyelinisierung und Proliferation von Schwannzellen. Durch Wiedererlangen eines Entwicklungsstatus geringerer Reife wird so das erneute Auswachsen des Axons ermöglicht. Die auf die Degeneration folgende Axonregeneration ist durch hohe Proliferationsraten der Schwannzellen und eine persistierend starke Krox-24 Expression gekennzeichnet. Allerdings kommt es zu einem Wechsel seiner Lokalisation: während Krox-24 in reifen, nicht myelinisierenden Schwannzellen im Zytoplasma zu finden ist, erscheint es während der Regeneration im Zellkern [Topilko *et al*., 1997]. Aus diesen Ergebnissen kann jedoch nicht die Schlussfolgerung gezogen werden, dass Myelinisierung bzw. Nicht-Myelinisierung in einem direkten Zusammenhang zur Expression von Krox-24 stehen. Möglicherweise besteht auch ein Zusammenhang mit der für nichtmyelinisierende Schwannzellen typischen hohen Proliferationsrate [Pelligrino *et al*., 1986; Trapp *et*

a., 1988], dazu passt auch, dass Krox-24 direkt den „low-affinity“ p75-Nervenwachstumsfaktorrezeptor LNGFRp75 aktiviert, der nach einer Nervenläsion von proliferierenden Schwannzellen hochreguliert wird [Nikam et al., 1995]. Allerdings zeigte sich gegensätzlich dazu in Experimenten von Küry *et al*., 2002, dass sich die Expression von LNGFRp75 in Schwannzellen, in denen Krox-24 durch Überexpression von Mash2 supprimiert wurde, nicht veränderte. Die Vermutung von Topilko *et al*., 1997, dass sich Krox-20 und Krox-24 gegenseitig supprimieren, konnte von Nagarajan *et al.,* 2001, widerlegt werden. In DNA-Array Experimenten zur Identifizierung der Zielgene von Krox-20 zeigte sich, dass auch Krox-24 zu den Genen gehört, die durch Krox-20 induziert werden. Somit bleibt Mash2 der einzige bisher bekannte Repressor von Krox-24 [Küry et al., 2002]. Mash2 findet sich nur in myelinisierenden Schwannzellen und die Kolokalisationsexperimente mit Krox-24 zeigten, dass dieses sich, wenn auch in niedrigen Konzentrationen, ebenfalls in den Zellkernen myelinisierter Schwannzellen befindet, somit also nicht spezifisch für die nicht myelinbildende Zellpopulation ist [Küry *et al*., 2002]. Die Rolle von Krox-24 scheint somit eher im Reifungsprozess von Schwannzellen zu liegen und nicht notwendigerweise in der Myelinisierung.
Via Krox-24 könnte Mash2 somit entscheidenden Einfluss auf die Differenzierung und Ausreifung von Schwannzellen nehmen, inwieweit an diesem Prozess aber auch andere, bisher nicht bekannte Faktoren beteiligt sind, bleibt offen.

Das vom Rattengen Mob-1 kodierte sekretorische Polypeptid zählt zur Familie der proimflammatorischen α- Chemokine, die nach einer anderen Klassifikation auch als CXC-Gruppe bezeichnet wird. Die Einteilung der Chemokine erfolgt nach Vorhandensein und Position von Cysteinresten in vier Untergruppen, CXC (α), CC (β), C (γ) und CXC_3 [Lindley *et al*., 1993]. Chemokine sind kleine chemotaktische Zytokine. Sezerniert wird Mob-1 von aktivierten T-Zellen, Monozyten, Endothelzellen und Keratinozyten [Taub *et al*., 1993]. Mob-1 besitzt wie fast alle Chemokine eine Größe von 8 kDa und wurde erstmals in *ras*-transformierten Tumorzellen identifiziert [Liang *et al*., 1994]. Es besteht eine weitgehende Homologie der Proteinsequenz von Mob-1 und dem humanen Interferon-γ inducible Protein 10 (IP-10) bzw. CXCL10 [Luster *et al*, 1985, Luster und Ravetch, 1987] und dem Cytokine-Responsive-Gene-2 (Crg-2) der Maus [Vanguri und Farber, 1990]. IP-10 (Mob-1/ Crg-2, aufgrund der Vielzahl der Veröffentlichungen zu diesem Thema wird im folgenden nur IP-10 als Synonym ge-

braucht) bindet neben den allotopen Interferon-γ induced Monokine (Mig) und Interferon-γ inducible T-cell α-Chemoattractant (iTAC) an den CXCR3-Rezeptor, abhängig vom jeweiligen Rezeptorstatus [Huang *et al.*, 2000; Cox *et al*., 2001; Booth *et al*., 2002]. Interessanterweise können alle drei Liganden auch an den CCR3-Rezeptor binden und fungieren hier als natürliche Antagonisten [Loetscher *et al*., 2001]. Der CXCR3-Rezeptor, der bevorzugt auf aktivierten T-Lymphozyten exprimiert wird [Farber, 1997; Luster und Leder, 1993], besteht aus 7 transmembranen Strukturen, die an G-Proteine gekoppelt sind und bei Aktivierung eine intrazelluläre Calciummobilisation auslösen [Loetscher *et al.,* 1996, Ari und Charo, 1996, Murphy, 1994].

Die primäre Funktion von Chemokinen ist die Chemotaxis, d.h. das Anlocken von Zellen entlang eines Konzentrationsgradienten. Dabei kommt es einerseits durch Aktivierung von Lymphozyten zur Produktion von zellulärer oder humoraler Immunität, andererseits aber auch zur direkten Migration von Entzündungszellen ins Gewebe. IP-10 fungiert als Mediator der zellulären Immunantwort (T-Zell-Immunantwort) nach Entzündungen und Verletzungen von Gewebe [Rossi und Zlotnik, 2000]. Als chemoattraktiver Botenstoff lockt es aktivierte T-Lymphozyten und Monozyten ins entzündete Gewebe [Taub *et al*., 1993, Farber, 1997], nachdem seine Bildung durch γ-Interferon, Tumor-Nekrose-Factor-α (TNF-α) oder Lipopolysaccharide induziert wurde [Luster und Ravetch, 1987; Villagomez *et al*., 2004; Ohmori und Hamilton, 1990]. Als Chemokin spielt IP-10 eine wichtige Rolle bei akuten und chronischen bakteriellen und viralen Infektionskrankheiten, vor allem des Respirationstraktes, z.B. durch Pneumokokken, Mycobakterium tuberculosis, Sarkoidose oder Influenza A, [Fillion *et al*., 2001; Agostini *et al*., 1998; Wareing *et al*., 2004], aber auch bei Hepatitis C und Helicobacter pylori Gastritis [Harvey *et al*., 2003; Eck *et al*., 2000]. Weiterhin ist eine Beteiligung an der Pathogenese zahlreicher Autoimmunerkrankungen wie z.B. atopischer Dermatitis, Systemischer Lupus erythematodes, Psoriasis, Colitis ulcerosa und Diabetes mellitus Typ 1 bekannt [Villagomez *et al*., 2004; Eriksson *et al*., 2003; Gottlieb *et al*., 1988; Shimada *et al*., 2001]. IP-10 ist auch involviert bei Migration und Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen, die einen wichtigen Platz in der Pathogenese von Arteriosklerose und Gefäßstenosen einnehmen [Wang *et al*., 1996]. Im Gefäßsystem ist es außerdem stark exprimiert nach Gefäßverschlüssen und darauffolgender Ischämie am Herzen und im Gehirn [Wang *et al*., 1998, Kawamura *et al*, 2003; Li *et al*., 2001]. Bei der Untersuchung von Malignomen zeigte sich, dass IP-10 einen Angiogeneseinhibitor verkörpert und damit einen geeigneten und effizienten

Kandidaten zur Gentherapie von Tumoren darstellt. Ein weiterer in der Tumortherapie eingesetzter Effekt ist die Aktivierung der körpereigenen Abwehr gegen die Tumorzellen durch IP-10 [Pertl *et al*., 2001; Keyser *et al.,* 2004; Huang und Xiang, 2004; Chada *et al*., 2003].

Auch im zentralen und peripheren Nervensystem spielt IP-10 eine wichtige Rolle, so u.a. bei Meningitiden verschiedener Ätiologien [Lahrtz *et al*., 1998], bei der Chorea minor Sydenham [Teixeira *et al*., 2004] und bei der Entstehung von Alzheimer [Xia und Hyman, 1999; Xia *et al*., 2000]. Eine bedeutsame Funktion nimmt IP-10 bei der Pathogenese der Multiplen Sklerose ein [Simpson *et al*., 2000; Sorensen *et al*., 1999; Franciotta, 2001] des Guillan-Barré-Syndroms und der Chronischen Inflammatorischen Demyelinisierenden Polyradikuloneuropathie ein [Kieseier *et al*., 2002]. Diese Eigenschaften von IP-10 waren bereits in Tiermodellen wie der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) und der Experimentellen Autoimmunen Neuritis (EAN) nachgewiesen worden [Karpus und Ransohoff, 1998; Ransohoff, 1993; Waksman und Adams, 1955; Kieseier *et al*., 2000], bevor sie auch an Patienten verifiziert werden konnten. Auch HIV-assoziierte neurologische Erkrankungen wie die HIV-assoziierte Enzephalopatie und die HIV-assoziierte Demenz stehen in Zusammenhang mit IP-10 Expression [Sanders *et al*., 1998]. Bemerkenswerterweise zeigte sich, dass IP-10 T-Zellen und Makrophagen im Rahmen der HIV-assoziierten Enzephalopathie zum Übertritt in den Liquor lockt und so die Immunreaktion gegen das Virus verstärkt, aber gleichzeitig auch die HIV-1 Replikation in Makrophagen und Lymphozyten des peripheren Blutes stimuliert. Die Blockade des CXCR3-Rezeptors dagegen reduziert die HIV-1 Replikation und stellt so ein neues therapeutisches Angriffsziel dar [Lane *et al*., 2003]. HIV-1 führt via gp120 interferonunabhängig zur Induktion von IP-10 in Astrozyten mit nachfolgender Rekrutierung von Leukozyten ins zentrale Nervensystem [Asensio *et al*., 2001]. Im ZNS wird IP-10 vor allem von Astrozyten exprimiert und sezerniert [Majumder *et al*., 1996], im peripheren Nervensystem übernehmen Schwannzellen diese Rolle [Küry *et al*., 2002]. Es zeigte sich, dass Mob-1 nach peripheren Nervenläsionen gegenläufig zu Mash2 hochreguliert wird und damit in den Beginn des Degenerationprozesses involviert ist, bei dem es zur Einwanderung von Makrophagen und Lymphozyten in den verletzen Nervenstumpf und zur Elimination der Zelltrümmer und Myelinreste durch diese Zelltypen kommt [Küry *et al*., 2002; Stoll *et al*., 1989; Moalem *et al*., 1999]. Mash2 und sein von

ihm supprimiertes Zielgen Mob-1 scheinen daher schwannzellspezifische Mediatoren der verletzungsbedingten Immunantwort sein.

Als weiteres Zielgen von Mash2 konnte der Chemokinrezeptor CXCR4 identifiziert werden, der wie die meisten Rezeptoren, die Chemokine als Liganden binden, eine G-Protein-gekoppelte 7-Transmembranstruktur aufweist. Entdeckt wurde der Rezeptor als pre-B-cell-derived-chemokine-receptor (PB-CKR) aus dem Klon DW34 einer Prä-B-Zelllinie der Maus. Die Aminosäurensequenz des PB-CKR-Rezeptors ist zu 90% identisch mit *fusin,* einem Korezeptor bei der Infektion mit dem Humanen Immundefizienz Virus-1 (HIV-1) und stellt somit das Homolog zum menschlichen Rezeptor dar [Nagasawa *et al*., 1996]. Nachdem das CXC(α)-Chemokin Stromal-derived factor 1 (SDF-1) als Ligand von *fusin* identifiziert wurde, erhielt der Rezeptor nach Nomenklatur der Chemokine die Bezeichnung CXCR4. Durch Bindung von SDF-1 wird der Rezeptor aktiviert, seine Wirkung wird über die nachfolgende intrazelluläre Calciummobilisation vermittelt [Bleul *et al*., 1996]. SDF-1-Transkripte kodieren drei verschiedene sezernierte Proteine, die sich durch variables „Splicing“, Anzahl der Exone und damit Länge der Aminosäurensequenz unterscheiden. Drei verschiedene Splicingformen von SDF-1 konnten nachgewiesen werden. Es handelt sich hierbei um die zwei fast identischen Peptide SDF-1α (89 Aminosäuren) und SDF-1β (93 AS), sowie um SDF-1γ (119AS), welches zusätzlich einen 30 Aminosäuren langen C-Terminus besitzt. Erstmals geklont wurden SDF-1α und SDF-1β aus einer Zelllinie aus Knochenmarkstromazellen der Maus, später wurde SDF-1γ in zahlreichen Geweben des zentralen und peripheren Nervensystems gemeinsam mit den anderen SDF-Varianten identifiziert [Tashiro *et al*., 1993; Gleichmann *et al.*, 2000]. Für die Bindung an den CXCR4-Rezeptor sind die ersten 17 AS notwendig, deren Sequenz in allen drei Varianten identisch ist, die Unterschiede in den Proteinsequenzen erklären möglicherweise die unterschiedlichen Expressionsmuster von SDF-1α , SDF-1β und SDF-1γ während Embryogenese, Reifung und Regeneration nach Läsionen des Nervensystems [Loetscher *et al*., 1998; Doranz *et al*., 1999]. Transkripte von SDF-1 und CXCR4 werden in Neuronen, Astrozyten, Oligodendrozyten, aber auch in Schwannzellen vorgefunden.

Für CXCR4 sind eine Reihe von biologischen und pathologischen Funktionen bekannt, die weit über die chemokintypische Rolle in Entzündungs- und Immunabwehrprozessen hinausgehen. So dient er in Interaktion mit SDF-1 zwar der Chemoattrak-

tion von T-Lymphozten [Aiuti *et al*., 1997], aber auch der Reifung und Differenzierung von B-Lymphozyten [Nagasawa *et al*., 1994] und ist in der Lage, in hNT-Zellen, einer humanen neuronalen Zellline aus unreifen cholinergen Neuronen, Apoptose zu induzieren [Hesselgesser *et al*., 1998]. In Untersuchungen mit Mausmutanten, die eine Deletion des CXCR4-Gens erfahren hatten, kam es zu embryonalem oder perinatalem Tod der Mäuse, weitere Analysen zeigten eine reduzierte Produktion von B-Lymphozyten und Störungen der Hämotopoese, Ventrikelseptumdefekte im Herzen, Malformationen der gastrointestinalen Blutgefässe und Abnormitäten in der Architektur des Cerebellums, entstanden aufgrund fehlerhafter Zellmigration [Tachibana *et al*., 1998; Zou *et al*., 1998]. Ein fast identischer Phänotyp zeigte sich in SDF-1 Knockout-Mäusen [Nagasawa *et al*., 1996; Ma *et al*., 1998]. Unter Einbeziehung dieser Ergebnisse und der Expressionsmuster von SDF-1 und CXCR4 [Horuk *et al.,* 1997; Tanabe *et al*., 1997; McGrath *et al*., 1999; Gleichmann *et al*., 2000; Tham *et al*., 2001] ist anzunehmen, dass die Interaktion zwischen Ligand und Rezeptor maßgeblich an der Entwicklung, Erhaltung und Pathophysiologie des Nervensystems beteiligt ist. Darüber hinaus dient CXCR4 auf T-Lymphozyten als Korezeptor der HIV-1 Glykoprotein gp120 vermittelten Infektion, indem er den Eintritt von IIIB gp120 Ketten, die der spezifischen Infizierung von T-Zellen dienen, mediiert [Lapham *et al*., 1996; Berson *et al*., 1996; Feng *et al*., 1996]. HIV gp120 kann, ebenso wie SDF-1, auch in Abwesenheit von CD4-Zellen, via CXCR4 neuronale Apoptose induzieren und führt über diesen Mechanismus unter anderem zur HIV-assozierten Demenz [Hesselgesser *et al.*, 1998]. SDF-1 vermag die T-Zell-tropische CXCR4-abhängige HIV-Infektion von CD4-Zellen und Monocyten des peripheren Blutes zu hemmen, nicht jedoch die Infektion von Makrophagen, die über den CCR5-Rezeptor vermittelt wird [Bleul *et al.*, 1996]. Weitere Funktionen, die mit der Aktivierung von CXCR4 im Nervensytem zusammenhängen, sind Migration, Induktion von Apoptose, HIV-Neuroprotektion, Neuromodulation und Proliferation von Astrozyten, Neuronen und Zellen des Zerebellums [Klein *et al*., 2001; Han *et al*., 2001; Hesselgesser *et al*., 1998; Meucci *et al*., 1998; Limatola *et al*., 2000; Bajetto *et al*., 2001]. Durch Bindung von SDF-1 aktivierte CXCR4-Rezeptoren auf Astrozyten führen TNFα-vermittelt zur Freisetzung von neurotoxischem Glutamat und sind so an neurodegenerativen Prozessen beteiligt [Bezzi *et al*., 2001].

Die Expression des CXCR4-Rezeptors auf Schwannzellen wird durch den Transkriptionsfaktor Mash2 aktiviert. Nach Läsionen an Ischiasnerven von Ratten zeigte sich

ein biphasisches Expressionsmuster mit transienter Herabregulierung des CXCR4-Gens [Küry *et al.*, 2002]. CXCR4 scheint an wichtigen biologischen Prozessen der Schwannzellen und des peripheren Nervensystems, wie Schwannzelldifferenzierung, -proliferation und -überleben, beteiligt zu sein. Da SDF-1β/γ auch von Schwannzellen des adulten Ischiasnervs selber produziert wird, nimmt man autokrine und parakrine Mechanismen zur Aktivierung des CXCR4-Rezeptors an [Gleichmann *et al*., 2000]. Die Rezeptorexpression ist direkt abhängig von der Höhe der Konzentration von intrazellulärem zyklischen Adenosinmonophosphat (cAMP) und wird gehemmt durch den Tumornekrosefaktor α (TNFα). Die Mediation dieser beiden Effekte verläuft möglicherweise über den Transkriptionsfaktor Oct6/SCIP [Küry et al., 2003].

p57kip2 gehört ebenfalls zu den Zielgenen von Mash2, seine Transkription wird durch Mash2 stark induziert. p57kip2 zählt zu der Familie der Inhibitoren der Cyclin-abhängigen Kinasen (CDKI's). Cyclin-abhängige Kinasen (CDK's) sind die Regulatoren der Zellzyklusmaschinerie und stehen unter der engmaschigen Kontrolle sowohl von positiven als auch von negativen Regulatoren [Lee und Yang, 2001]. Der mitotische Zellzyklus und die Rolle der CDKI's dabei wurde ausführlich im Rahmen der Einleitung beschrieben. Die Inhibitoren der Cyclin-abhängigen Kinasen (CDKI's) stellen eine Gruppe von kleinen Polypeptiden dar, die in zwei Familien unterteilt werden: die Ink4-Familie, Inhibitoren der CDK 4/6, zu denen p16Ink4a, p15Ink4b, p18Ink4c und p19Ink4d zählen und die Cip/Kip-Familie, die aus p21cip1, p27kip1 und p57kip2 besteht [Ruas und Peters, 1998; Sherr und Roberts, 1999]. p57kip2 ist ein recht neues Mitglied der Cip/Kip-Familie, welches seinen Namen aufgrund seines Molekulargewichtes und seiner hohen Ähnlichkeit zu p27kip1 erhalten hat. Die komplexe Proteinstruktur des Mausproteins setzt sich aus vier verschiedenen Domänen zusammen: einer p21/p27-verwandten CDK inhibierenden Domäne, einer Prolinreichen Domäne, einer Glutamat und Aspartatreichen Domäne mit einem besonderen repetitiven Aminosäurenmuster und einer Domäne mit einer CDK Phosphorylierungsstelle am carboxyterminalen Ende, die mit p27 konserviert ist, aber keine Ähnlichkeit mit der p21-Sequenz aufweist. Humanes p57kip2 entspricht hinsichtlich der carboxy- und aminoterminalen Domänen der Maussequenz, die inneren Domänen wurden aber gegen Sequenzen mit Prolin-Alanin-Wiederholungen ausgestauscht. Die Sequenz des Rattenproteins konnte erstmals im Rahmen dieser Arbeit analysiert werden. Die kodierende Region des p57kip2Proteins der Ratte umfasst 1040 Basenpaare und

weist im Bereich des N- und des C-Terminus überwiegend eine Homologie zur Maussequenz auf. Trotz einiger Unterschiede zwischen den mittleren Abschnitten der Sequenzen, so umfasst die Rattensequenz eine prolin- sowie eine säurereiche Domäne, besteht im Speziesvergleich insgesamt eine starke Konservierung.
In Säugetierzellen ist p57kip2 im Zellkern gemeinsam mit CDK-Komponenten der G_1-Phase lokalisiert. Überexpression von p57kip2 führt zum kompletten Stillstand des Zellzyklus in der G_1-Phase, es kommt nicht mehr zum Übertritt in die Synthese-Phase [Lee *et al*., 1995; Matsuoka *et al*., 1995]. Während der Embryonalentwicklung findet sich eine starke Expression von p57kip2 in Skelettmuskeln, Herz, Gehirn, Lungen und Augen. Da p57kip2 vor allem von terminal differenzierten Zellen exprimiert wird, scheint es während Entwicklung und Differenzierung am Austritt der gereiften Zellen aus dem Zellzyklus beteiligt zu sein [Lee *et al*., 1995; Matsuoka *et al*., 1995]. An der Entwicklung von Spongiotrophoblast und Labyrinthen der Plazenta wirkt p57kip2 anscheinend über andere Wege mit, ohne die Aktivitäten der CDK's zu beeinflussen [Takahashi *et al*., 2000]. Im Gegensatz zu p21cip1 und p27kip1, die von zahlreichen adulten menschlichen Geweben exprimiert werden, zeigt p57kip2 ein gewebespezifisches Expressionsmuster, so werden verschiedene Isoformen mit variabler Aminoäurensequenzlänge in Plazenta, Herz und Skelettmuskel exprimiert. Außerdem konnte seine Expression in Schwannzellen des peripheren Nervs nachgewiesen werden, mit Herabregulation nach einer Nervenläsion und erneutem Ansteigen der Expression bei Abschluss der Reparaturvorgänge [Küry *et al*., 2002]. Lokalisiert ist das humane p57kip2 wie Mash2 auf Chromosom 11p15.5 [Matsuoka *et al*., 1995]. Wie die meisten Gene dieses Genlocus, gehört es zu den Genen, bei denen ein genomisches „Imprinting" stattfindet, bei p57kip2 wird bevorzugt das maternale Allel bei gleichzeitiger Suppression des paternalen Allels exprimiert [Matsuoka *et al*., 1996]. Da p57kip2 ein Genlocus zugeordnet wurde, der sowohl mit sporadischen Krebserkrankungen als auch mit dem familiären Beckwith-Wiedemann-Syndrom in Verbindung gebracht wird, ist es ein möglicher Kandidat für ein Tumorsuppressorgen [Matsuoka *et al*., 1995; Lee und Yang, 2001]. Studien an p57kip2 Knockout-Mäusen zeigten abnorme Zellproliferation, gesteigerte Apoptose und verspätete Differenzierung. Dieses äußerte sich in Knochen- und Muskeldefekten, Nebennierenhyperplasie, Zytomegalie und Missbildungen des Gastrointestinaltraktes [Yan *et al*., 1997; Zhang *et al*., 1997]. Ein ähnlicher Phenotyp tritt bei Kindern mit Beckwith-Wiedemann-Syndrom (BWS) auf, welches durch Organomegalie,

Makroglossie und Omphalozele und gehäuftes Auftreten von Wilms-Tumoren (Nephroblastom) charakterisiert ist. Tatsächlich konnten bei Patienten mit BWS Mutationen im p57kip2-Gen nachgewiesen werden, die die CDK-inhibitorische Domäne und die carboxyterminale Domäne betreffen [Hatada *et al*., 1996]. An der Entstehung von anderen sporadischen Krebsformen ist p57kip2 nicht direkt durch Genmutationen beteiligt, sondern indirekt durch verminderte Genexpression in Tumorzellen z.B. des Blasen- oder Magenkarzinoms [Oya und Schultz, 2000; Shin *et al*., 2000]. Überexpression von p57kip2 in humanen Astrozytomzellen führt zur Blockade der Tumorzellproliferation und zur Induktion von Zellalterungsprozessen [Tsugu *et al*., 2000]. Eine andere Studie an humanen Epithelzellen von Mammakarzinomen zeigte, dass p57kip2-Expression die Immortalisierung der Tumorzellen verhindert [Nijjar *et al*., 1999]. Somit könnte der Einsatz von p57kip2 in der Gentherapie von Tumorerkrankungen eine mögliche therapeutische Option darstellen [Mainprize *et al*., 2001].
Interessanterweise besitzen Mash2 und p57kip2 eine Reihe von gemeinsamen Eigenschaften: zum einem die Ko-Lokalisierung in einer Gruppe von „imprinted“ Genen auf dem humanen Chromosom 11p15.5 und auf dem distalen Mauschromosom 7 [Guillemot *et al*., 1995; Hatada und Mukai, 1995; Matusuoka *et al*., 1995], zum anderem die Expression in Spongiotrophoblastzellen der Plazenta [Takahashi *et al*., 2000]. Es stellt sich daher die Frage, inwieweit auch Mash2 an der Entstehung von spontanen und familiären Tumorerkrankungen wie dem Beckwith-Wiedemann-Syndrom beteiligt ist und möglicherweise in den Blickpunkt therapeutischer Optionen rückt.

4.2 Schwannzellproliferation

Die Fähigkeit zum Wiedereintritt in den Zellzyklus in Folge einer peripheren Nervenverletzung stellt eine wichtige Eigenschaft der Schwannzellen dar, die essentiell für die Plastizität des peripheren Nervensystems ist. Erst durch Proliferation der Schwannzellen kann es zur Ausbildung einer Leitstruktur kommen, die das erneute Aussprossen eines verletzten Axons zu seinem spezifischen Zielgewebe ermöglicht. Die Fähigkeit zu Proliferation und Differenzierung hat damit entscheidenden Anteil an der Regenerationskapazität des PNS. Die Schwannzellen unterscheiden sich durch

diese einzigartige Fähigkeit von den Oligodendrozyten des ZNS, wo Verletzungen im Bereich relevanter Areale aufgrund mangelnder Fähigkeit zur Proliferation zu bleibenden Funktionseinschränkungen führen können.
Die Möglichkeit zur Proliferation ist jedoch vom Differenzierungsniveau der Schwannzellen abhängig. Schwannzellvorläuferzellen und Embryonale Schwannzellen, die sich auf einer niedrigen Entwicklungs- und Differenzierungsstufe befinden, weisen hohe Proliferationsraten auf. Reife, myelinbildende Schwannzellen proliferieren dagegen kaum, nach einer Nervenläsion müssen sie daher zunächst zu einer phänotypisch den Vorläuferzellen ähnelnden, niedrigeren Reifungsstufe dedifferenzieren, ehe sie in den mitotischen Zellteilungszyklus eintreten und proliferieren können. Es besteht daher ein bedeutsamer Zusammenhang zwischen Regenerationskapazität des PNS und dem Differenzierungsgrad der Schwannzellen [Küry *et al.*, 2001; Reichert, 2000].

In den Proliferationsexperimenten zeigte sich, dass verschiedene Bedingungen zusammentreffen müssen, um eine optimale Proliferation von Schwannzellen zu erreichen. Dazu zählte der Zusatz von fetalem Kälberserum, welches eine Reihe von Wachstumsfaktoren enthält, zum Kulturmedium der Schwannzellkultur. Ebenfalls zur mitogenen Stimuluation erforderlich ist cAMP als Aktivator enzymatischer Reaktionen, welches in Form des cAMP-Agonisten Forskolin in einer Konzentration von 2µM die besten Wachstumsbedingungen erzeugte. Weiterhin bedeutsam für die Proliferation erwies sich die Plattierungsdichte der Schwannzellen. Da sowohl bei niedriger als auch sehr hoher Dichte die Proliferationsraten sanken, kann man davon ausgehen, dass die Proliferation über Zell-Zellkontakte und von den Zellen ausgehende parakrine Signale in Form sezernierter Wachstumsfaktoren gesteuert wird. Die Sezernierung von Wachstumsfaktoren ist jedoch nur durch unreife Schwannzellen, nicht jedoch durch Schwannzellvorläuferzellen möglich [Jessen und Mirsky, 1999]. Bei zu hoher Zelldichte kommt es durch relativen Mangel an nutritiven Faktoren zum Proliferationsstopp, daneben scheint auch ein negativer Feedback-Mechanismus zu bestehen, der über eine hohe Anzahl interzellulärer Kontakte aktiviert wird und zur Kontaktinhibition führt.

Bei der Analyse der Proliferation von Mash2-überexprimierenden Schwannzellen konnte eine signifikante Reduktion der Proliferationsrate bei Mash2-Überexpression

gezeigt werden. Zudem konnte gezeigt werden, dass der Entzug der mitogenen Stimuli Fetales Kälberserum und cAMP aus dem Kulturmedium zur vermehrten Genexpression von Mash2 führt, so dass die Vermutung einer Verknüpfung von Proliferation und Mash2 geäußert wurde [Küry *et al*., 2002]. In dieser Arbeit konnte mittels Markierung der in der S-Phase befindlichen Schwannzellen mit 5-Brom-2'-deoxyuridin [Gratzner *et al.*, 1982] ein direkter negativer Einfluss von Mash2 auf die Proliferation nachgewiesen werden. Trotz voller Stimulation durch fetales Kälberserum und cAMP führte eine erhöhte Mash2-Expression zur Reduktion der Zahl proliferierender Schwannzellen. Die Kapazität der Schwannzellen zur Mitose scheint daher direkt mit der Genexpression von Mash2 zusammen zu hängen. Dieses Ergebnis lässt sich auch einordnen in den Kontext, dass die Expression von Mash2 bisher nur in reifen, myelinisierenden Schwannzellen nachgewiesen werden konnte, nicht aber in Vorläuferzellen oder Embryonalen Schwannzellen. Im Einklang mit postläsionärer Proliferation der Schwannzellen, wird die Expression von Mash2 nach einer Nervenläsion ebenfalls zeitweise herabreguliert, auch wenn das Expressionsprofil hier eher auf eine Verknüpfung mit Waller'scher Degeneration als mit Regenerationsereignissen hinweist [Küry et al., 2002]. Mash2 übt also einen negativen Effekt auf die Proliferation von Schwannzellen aus, den es als Transkriptionsfaktor nur über die An- oder Abschaltung der Expression von spezifischen untergeordneten Genen vermitteln kann. Daher war es interessant, den Einfluss seiner spezifischen Zielgene auf die Proliferation von Schwannzellen zu untersuchen, um so den Mediator des antiproliferativen Effektes von Mash2 zu identifizieren. Auf den Einsatz von Krox-24 in den Proliferationsexperimenten musste aus Verfügbarkeitsgründen verzichtet werden.

Die Proliferationsanalysen an Schwannzellen, die mit dem Rattenchemokin Mob-1 stimuliert wurden, zeigten zwar tendenziell eine Zunahme der Proliferation durch Mob-1-Stimulation, bei hoher Streuung der Werte in den einzelnen Experimenten ist jedoch nicht von einem signifikanten Effekt auszugehen.
Um die Rolle von Mob-1 bezüglich der Proliferation von Schwannzellen näher zu charakterisieren, wurde versucht, den CXCR3-Rezeptor mittels quantitativer RT-PCR auf Schwannzellen nachzuweisen. Dieses gelang jedoch nicht, so dass man davon ausgehen muss, dass die Wirkung des proinflammatorischen Chemokins im peripheren Nervensystem unabhängig von CXCR3 vermittelt wird. Möglicherweise ist der Chemokinrezeptor CCR3 in diesen Prozess involviert, es ist bekannt, dass Mig, iTAC

und IP-10 hier als Antagonisten agieren [Loetscher *et al*., 2001]. Mob-1 wird nach einer Nervenläsion von den Schwannzellen hochreguliert und ist wahrscheinlich an den Degenerationsprozessen beteiligt, indem es chemotaktisch auf Makrophagen und Lymphozyten wirkt, die dann die Abräumung der Zelltrümmer bewerkstelligen [Küry *et al*., 2002]. Neben der Rolle in der verletzungsbedingten Immunantwort und dem Degenerationsprozess scheint Mob-1 jedoch keinen Einfluss auf die Stimulation der Proliferation von Schwannzellen in der Regenerationsphase nach einer Verletzung im peripheren Nervensystem zu haben.

Schwannzellen wurden auch mit SDF-1α, dem Liganden des CXCR4-Rezeptors stimuliert, um den Einfluss auf die Proliferationsraten zu untersuchen. Obwohl CXCR4 durch Mash2 stark induziert wird, ließ sich kein antiproliferativer Effekt durch SDF-1α nachweisen. Der CXCR4-Rezeptor, der vor allem mit apoptotischen Ereignissen in Verbindung gebracht wird, wird während der Entwicklung im Rahmen des Oct-6/SCIP-Reifungprogramms von promyeliniserenden Schwannzellen exprimiert, kann aber auch auf adulten myelin-bildenden Schwannzellen nachgewiesen werden, die bekanntermaßen nicht proliferieren [Arroyo *et al*., 1998; Küry *et al*., 2002; Küry *et al*., 2003]. Als Mediator des antiproliferativen Effektes von Mash2 kommt CXCR4 nicht in Frage, seine Funktionen betreffen vor allem die Apoptose von Schwannzellen und wahrscheinlich auch die entwicklungsbedingte Differenzierung und die Redifferenzierung nach Verletzungen [Küry *et al*., 2003].

Als aussichtsreichster Kandidat der Mash2-Zielgene bleibt damit für die Übermittlung der Proliferationshemmung durch Mash2 das zur Familie der Inhibitoren Cyclin-abhängigen Kinasen (CDKI's) zählende p57kip2. CDKI's verhindern durch Hemmung von Cyclin-Cyclin-abhängige-Kinasen-Komplexen die Progression des Zellzyklus und damit die Zellproliferation [Sherr und Roberts, 1999]. Da Mutationen in den CDKI-Genen zu abnormer Zellproliferation und Entstehung von Tumoren führen, werden sie zu den Tumorsuppressorgenen gezählt [Matsuoka *et al*., 1995; Lee und Yang, 2001]. p57kip2 wirkt also antiproliferativ auf Säugetierzellen. Leider war es labortechnisch und zeitlich nicht möglich, diesen proliferationshemmenden Effekt auch an Rattenschwannzellen nachzuweisen, da die Generierung des p57kip2-Proteins erst gegen Ende dieser Arbeit gelang. p57kip2 zeigt im Gegensatz zu den verwandten CDKI's p21cip1 und p27kip1, die von zahlreichen humanen Geweben exprimiert

werden, ein gewebespezifisches Expressionsmuster. Es lässt sich in verschiedenen Isoformen in Plazenta, Herz und Skelettmuskel, aber auch in Schwannzellen nachweisen [Lee et al., 1995]. Dieser Nachweis gemeinsam mit der Tatsache, dass die Überexpression von Mash2 zu einer starken Induktion von p57kip2 führt, lässt den Schluss zu, dass das Protein den Mediator von Mash2 bezüglich des antiproliferativen Effektes auf Schwannzellen darstellt. Letztendlich können diese Thesen aber nur durch weitere Versuche, bei denen das Proliferationsverhalten von Schwannzellen nach Transfektion mit p57kip2 untersucht wird, bestätigt werden. Dieses gelang in späteren Versuchen, die im Anschluss an diese Arbeit erfolgten, den Vermutungen entsprechend konnte dabei eine antiproliferative Wirkung von p57kip2 nachgewiesen werden [Lt. Küry, Daten bisher nicht publiziert].

Als Kernaussage der Experimente zur Proliferation von Schwannzellen lässt sich formulieren, dass Mash2 die Schwannzellproliferation negativ reguliert, während Mob-1 und CXCR4/SDF-1 keinen Einfluss auf die Regulation nehmen und Krox-24 sowie p57kip2 diesbezüglich nicht untersucht werden konnten. Letztgenanntes Gen scheint jedoch, aufgrund der Zellzyklus-inhibierenden Funktion in Zellen der Retina, des Cerebellums oder der Plazenta, der aussichtsreichste Kandidat zur Übermittlung des proliferationshemmenden Effektes von Mash2 zu sein [Dyer *et al*., 2001; Lee MH *et al*., 1995].
Dass Mash2 als Regulator der Schwannzellproliferation agiert, passt zu der Beobachtung, dass die Expression von Mash2 nach einer Läsion vorübergehend absinkt. Zwei Tage nach der Läsion zeigt sich bereits eine Abnahme der Zahl der Mash2-Transkripte, die am vierten Tag den Tiefstand erreicht und im Verlauf wieder ansteigt, bis sie nach 21 Tagen in einem Expressionsmaximum gipfelt, welches den Ausgangswert überschreitet [Küry *et al*., 2002]. Morphologisch entspricht diesem Expressionsmuster die Waller´sche Degeneration, die mit Dedifferenzierung der Schwannzellen und hohen Proliferationsraten einhergeht, welche dann im Rahmen des Regenerationsprozesses und beginnender Redifferenzierung durch Hochregulation von Mash2 wieder reduziert werden.
Da Mash2 direkt die Expression von p57kip2 induziert und eine hohe Zahl von Mash2-Transkripten somit mit einer hohen Zahl an p57kip2 Transkripten einhergeht, korreliert das oben beschriebene Expressionsmuster auch mit der Vermutung, dass p57kip2 als Mediator des antiproliferativen Effektes von Mash2 agiert.

Mash2 gehört zu der Gruppe der bHLH Proteine, einer Gruppe von gewebespezifischen Transkriptionsaktivatoren, die mithilfe eines basischen Anteils spezifische Regionen auf der DNA, so genannte E-box Promotersequenzen binden können und somit ihre Transkription ermöglichen. Mash2 scheint der bisher fehlende Kandidat der Klasse B bHLH Proteine von Schwannzellen zu sein [Küry *et al*., 2002]. Reguliert wird die Transkriptionsaktivität durch Id's (Inhibitiors of DNA binding/differentation), eine Gruppe von HLH Proteinen, denen aufgrund der fehlenden basischen Region keine DNA-Bindung möglich ist, die aber mit den bHLH Faktoren ein Heterodimer bilden können und so zu deren Inaktivität führen [Benezra *et al*., 1990; Sun *et al*., 1991]. Die Id's spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation der Entwicklung und Differenzierung von bestimmten neuronalen Populationen des Nervensystems und konnten auch in Schwannzellen nachgewiesen werden [Stewart *et al*., 1997]. Insbesondere Id1/Id3 werden von unreifen, undifferenzierten Schwannzellen exprimiert und es wird eine Funktion in der Repression von Myelingenen vermutet [Thatikunta *et al*., 1999]. Nach einer Nervenläsion kommt es zur transienten Hochregulation der Id 1 und 2 in den ersten Tagen [Stewart *et al*., 1997]. Insgesamt ist das Expressionsprofil der Id Proteine in den Schwannzellen gegenläufig zu dem des bHLH Transkriptionsfaktors Mash2, so dass man den beschriebenen Antagonismus zwischen bHLH's und Id's auch auf die Schwannzellen übertragen kann. Zudem stellen die Id's positive Regulatoren des Zellzyklus dar, sofort nach Eintritt der Zelle in die Mitogenese lässt sich einer Hochregulation der Gene nachweisen [Stewart *et al*., 1997]. Somit könnten die Id's als Antagonisten des antiproliferativen Effektes von Mash2 fungieren.

4.3 Schwannzellapoptose

Apoptose oder programmierter Zelltod spielt eine wichtige Rolle bei der Entwicklung des peripheren Nervensystems, die auf dynamischer Interaktion zwischen Axonen und Schwannzellen beruht [Webster *et al*., 1984]. Einem Axon wird während der Entwicklung eine Vielzahl von Schwannzellen zugeordnet, die eine Leitstruktur bilden, an der das Axon zu seinem entsprechenden Innervationsgebiet auswachsen kann. Dazu sind Proliferation und Migration von embryonalen Schwannzellen not-

wendig, insbesondere, wenn die dicken Axone in kleinere Nervenbündel unterteilt werden. Dieser Prozess der Proliferation und Segregation dauert bis zur frühen postnatalen Entwicklungsphase an. Wenn die Axone ihr Zielgewebe erreicht haben, muss die Schwannzellzahl der Zahl der Axone angepasst werden. Die Elimination der überzähligen Zellen führt schließlich zu einem konstanten 1:1-Verhältnis zwischen Schwannzelle und Axon, das das adulte periphere Nervensystem charakterisiert. Jedes myelinisierte Axon wird von einer Reihe aneinandergereihter myelinisierender Schwannzellen umhüllt. Diese Modulation der postnatalen Schwannzellzahl wird durch Induktion von Apoptosemechanismen ermöglicht. Apoptose ist aber nicht nur während der Entwicklung, sondern auch im adulten Nervensystem von großer Bedeutung. Nach verletzungsinduzierter Schwannzellproliferation, die für die Regeneration eines läsionierten Nervs unerlässlich ist, kommt es als Konsequenz nach Abschluss der Reparaturvorgänge zur Apoptose der überzähligen Schwannzellen. Apoptose ist daher ein wichtiger Prozess zur Regulation und Modulation der Schwannzellzahl, von dem die Entwicklung und Erhaltung des Nervensystems abhängt.

Induziert wird der programmierte Zelltod durch Mangel an trophischen Faktoren, zu denen Wachstumsfaktoren und Energielieferanten zählen, oder aber durch das Fehlen von Überlebensfaktoren. Schwannzellapoptose kann über verschiedene Mechanismen reguliert werden. Zum einem durch Produktion autokriner Überlebensfaktoren wie den Leukämie-inhibierenden Faktor [Dowsing *et al*., 1999], den Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktor 1 (IGF-1) [Syroid *et al.*, 1999] und 2 (IGF-2), sowie den von Plättchen-stammenden Wachstumsfaktor (PDGF) und Neurotrophin-3 [Meier *et al*., 1999]. Daneben kann das axonal produzierte und sezernierte Neuregulin-1β (NRG-1β) den apoptotischen Zelltod von Schwannzellen verhindern [Syroid *et al*., 1996]. Als dritter Mechanismus, der an der Modulation der Apoptose beteiligt ist, wurde die aktive Induktion von Apoptose beschrieben. Für die aktive Induktion von Apoptose in reifen Schwannzellen sind bisher nur wenige Faktoren bekannt. Dazu zählen TNFα in Kombination mit TGFβ [Skoff *et al*., 1998], der Nervenwachstumsfaktor NGF [Syroid *et al*., 2000], Interleukin-1β und Interferon-γ [Conti et al., 2002].

Zunächst wurde mit Hilfe der TUNEL-Technik [Gavrieli et al., 1992] versucht, die Bedingungen zu analysieren, bei denen es zur Einleitung von Apoptose unter *in vitro* Verhältnissen kommt. Wie schon bei den Proliferationsversuchen zeigte sich eine

starke Abhängigkeit des Apoptoseverhaltens von der Zelldichte der Kultur. Kultivierte Schwannzellen zeigten kaum Apoptose, lediglich im Randbereich oder bei geringer Zelldichte konnte Apoptose detektiert werden. Daher ist es wahrscheinlich, dass die Schwannzellapoptose durch parakrine und autokrine Mechanismen gesteuert wird, die das Vorhandensein von interzellulären Kontakten erfordern.
Um weitere Apoptoseinduktoren identifizieren zu können, wurden Schwannzellen mit Substanzen verschiedener Stoffklassen stimuliert, die dem Kulturmedium zugesetzt wurden. Zunächst wurde dazu Staurosporin, das Gift des Pilzes *Streptomyces sp.*, verwendet, welches über Hemmung von Proteinkinasen in zahlreichen Säugetierzellen zum programmierten Zelltod führt. Auch in Schwannzellen führte die Staurosporinapplikation zu einer hohen Zahl an apoptotischen Zellen. Da das Pilzgift aber unter physiologischen Bedingungen nicht im Milieu der Schwannzellen vorkommt, sollten weitere natürliche Apoptoseinduktoren identifiziert werden. Fortan dienten die Versuche mit Staurosporin als Positivkontrolle der Apoptoseanalysen.

Um Apoptose unter physiologischen Bedingungen zu induzieren, wurde der Tumornekrosefaktor α (TNFα) eingesetzt, der eine wichtige Rolle in chronischen Entzündungsprozessen spielt und in verschiedenen Säugetierzellen Apoptose einzuleiten vermag. Allein durch Stimulation mit TNFα liessen sich jedoch in Schwannzellen keine Apoptoseereignisse auslösen. Dieses Ergebnis deckt sich mit dem von Skoff *et al*., 1998, die feststellten, dass nur die Kombination von TNFα und TGFβ in Schwannzellen Apoptose auslöst, während beide Chemokine alleine wirkungslos bleiben. Daher wurde auch in dieser Arbeit mit der Kombination von TNFα und TGFβ gearbeitet. Das Ergebnis von Skoff *et al*., 1998, konnte insofern bestätigt werden, dass sich unter Behandlung mit TNFα und TGFβ eine suffiziente Zunahme der Apoptoseraten der Schwannzellen zeigte. Somit stellte diese Chemokinkombination schon eine potente Möglichkeit zur physiologischen Apoptoseinduktion dar.

Eine weitere Versuchsreihe wurde mit dem durch Mash2 regulierten proinflammatorischen Chemokin Mob-1 durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, dass Mob-1 ohne Einfluss auf die Auslösung von Apoptose in Schwannzellen bleibt.

Dahingegen zeigte sich nach Stimulation der Zellkultur mit SDF-1α eine deutliche Zunahme der Zahl apoptotischer Schwannzellen. Das Chemokin SDF-1α aktiviert als

Ligand den CXCR4-Rezeptor, dessen Expression durch Mash2 induziert wird. SDF-1α kann im ZNS in Neuronen und Astrozyten Apoptose auslösen [Hesselgesser *et al*., 1998; Han *et al*., 2001]. Transkripte des Chemokins können aber auch in Schwannzellen des peripheren Nervs nachgewiesen werden [Gleichmann *et al*., 2000]. Die Tatsache, dass der CXCR4-Rezeptor ebenfalls von Schwannzellen exprimiert wird, spricht dafür, dass die Signalgebung durch SDF-1α und damit die Induktion von Apoptose, über einen autokrinen oder parakrinen Mechanismus der Schwannzellen gesteuert wird [Küry *et al*., 2002]. Der durch SDF-1α aktivierte CXCR4-Rezeptor könnte somit an der Modulation des programmierten Zelltodes bzw. der Elimination überzähliger Schwannzellen im Verlauf von Entwicklungs- und Reparaturprozessen beteiligt sein. Allerdings wird der CXCR4-Rezeptor nicht nur auf unreifen Vorläuferzellen, sondern wie Mash2 auch auf reifen myelinisierenden Schwannzellen exprimiert, so dass man über weitere Funktionen des Rezeptors neben den bekannten entwicklungsspezifischen Funktionen spekulieren kann. So ist er möglicherweise auch an der Erhaltung des zellulären Milieus, der Differenzierung und Morphologie der Schwannzellen oder an der interzellulären Kommunikation beteiligt. Interessanterweise wird die Expression des Rezeptors in Schwannzellen durch Stimulation mit TNFα supprimiert [Küry et al., 2003], ein Anhalt dafür, dass TNFα keine proapoptotische Wirkung auf Schwannzellen besitzt, bzw. diese nur in Kombination mit weiteren Faktoren ausüben kann. Ob CXCR4 auch *in vivo* Schwannzellapoptose auslösen kann und ob dieses direkt über SDF-1α geschieht, oder ob noch weitere Chemokine oder Signalwege, wie Oct6/SCIP, cAMP oder TNFα in diesen Prozess involviert sind, muss erst in weiteren Experimenten, wie z.B. der Generierung von Knockout-Mäusen, untersucht werden. Durch Stimulation der Zellkultur mit SDF-1α kam es zwar zu einem Anstieg der apoptotischen Zellen, jedoch sterben durch SDF-1α nicht alle Schwannzellen ab, so dass man von einem selektiven Zelltod ausgehen kann. Noch ungeklärt bleibt, nach welchen Faktoren die Selektion zur Elimination erfolgt, möglicherweise besteht ein Zusammenhang mit SDF-1α oder mit der Kombination weiterer, noch nicht identifizierter Signalstoffe.

Unter den Mash2-überexprimierenden Zellen konnten deutlich weniger TUNEL-markierte Schwannzellen detektiert werden als in der Kontrollgruppe, so dass Mash2 neben seinem antiproliferativen Effekt auch eine antiapoptotische Wirkung auf Schwannzellen ausübt. Durch Stimulation mit Staurosporin, SDF-1α und der Kombi-

nation aus TNFα und TGFβ konnten die Apoptoseraten Mash2-überexprimierender Schwannzellen gesteigert werden, jedoch trat der antiapoptotische Effekt im Vergleich zur mit dem Kontrollvektor transfizierten Kontrollgruppe umso stärker hervor. Obwohl Mash2 als Transkriptionsfaktor direkt die Expression von CXCR4 hochreguliert, induziert es im Gegensatz zum CXCR4-Rezeptor keine Apoptose in Schwannzellen, sondern fördert sogar das Überleben der Zellen, indem es auf bisher unbekannte Weise hemmend auf die Apoptosemechanismen einwirkt. Möglicherweise kommt es dabei zu einer Internalisierung des CXCR4-Rezeptors von der Schwannzelloberfläche. Auch könnte die Mash2-gesteuerte CXCR4-Expression in adulten, reifen Schwannzellen auch weiteren Funktionen wie z.B. der Zelldifferenzierung dienen.

Schwannzellen, die mit dem proliferationshemmenden p57kip2 transfiziert wurden, zeigten ebenfalls gegenüber den Kontrollzellen reduzierte Apoptoseraten. Auch p57kip2 wirkt hemmend auf die Apoptose von Schwannzellen und stellt somit einen möglichen Mediator der Funktion von Mash2 dar. Beide Proteine, der Transkriptionsfaktor und der Inhibitor Cyclin-abhängiger Kinasen, werden von reifen, myelinbildenden Schwannzellen produziert und dienen der Erhaltung dieses Differenzierungszustandes, indem sie sowohl die Proliferation und die damit einhergehende Dedifferenzierung, als auch die Einleitung des apoptotischen Zelltodes der Schwannzellen verhindern. Dadurch fördern sie das Überleben reifer, adulter Schwannzellen *in vitro*. p57kip2 als regulatives Zielgen von Mash2 dient als Übermittler der Rolle von Mash2 bezüglich der Proliferation und Apoptose von Schwannzellen, die zu den wichtigsten Funktionen im Entwicklungs- und Überlebensprozess der Schwannzellen zählen. Ob Mash2 auch an der Regulation der zahlreichen weiteren Funktion von p57kip2, die vor allem seine Rolle in der Tumorgenese betreffen, beteiligt ist, müssen weitere Untersuchungen zeigen. Auch die Übertragbarkeit der Zellkulturexperimente auf die Situation der Schwannzellen *in vivo* bleibt bisher spekulativ. Weitere Erkenntnisse würde die Etablierung einer lebensfähigen Knockout-Maus mit Deletion des Mash2-Gens erbringen, die Mash2-Knockout-Mäuse sterben bisher jeweils als Embryonen. Es bleibt abzuwarten, ob diese Maus phänotypische Ähnlichkeit mit der p57kip2-Knockout-Maus zeigt, die mit angeborenen Malformationen, Organomegalie und dem gehäuften Auftreten von Neoplasien auffällig dem familiären humanen Beckwith-Wiedemann-Syndrom ähnelt [Reik und Maher, 1997].

Die antiapoptotische Wirkung von Mash2 steht in Einklang mit den Expressionsdaten [Küry *et al*., 2002]. Mash2 wird im Entwicklungsprozess der Schwannzelle erst von adulten Schwannzellen exprimiert, die ausgreift sind und eine Endstufe der Differenzierung einnehmen, so dass ein Zustand erreicht ist, in dem Schwannzellen keine Apoptose mehr eingehen. Nach einer Nervenläsion verändert sich jedoch das Expressionsprofil, es kommt im Rahmen der Waller`schen Degeneration initial zu einer Reduktion der Mash2-Transkripte. In dieser Situation gehen Schwannzellen vermehrt Apoptose ein, dies aufgrund fehlender Zell- und Axonkontakte, mangelnder Ernährung und Sauerstoffversorgung durch die Verletzung, und aufgrund der Tatsache, dass die Zahl der Schwannzellen an die Zahl der myelinsierenden Axone angeglichen werden muss. Im weiteren Verlauf des Regenerationsprozesses, nimmt die Zahl der Mash2 Transkripte wieder zu, dieses korreliert mit der Tatsache, dass die Zellen nicht mehr proliferieren und stabile Verbände mit den Axonen eingehen.
Die Expression von p57kip2 nimmt wie die von Mash2 auch ab dem 2. Tag nach einer Nervenläsion transient ab und steigt anschließend entsprechend dem Mash2-Profil innerhalb der nächsten 21 Tage bis zu einem Maximum an, welches deutlich oberhalb des Ausgangswertes liegt. Das sich ähnelnde Expressionsprofil stützt die Vermutung, dass p57kip2 durch Mash2 induziert wird und die antiapoptotische sowie die antiproliferative Wirkung in reifen Schwannzellen vermittelt.
Betrachtet man die Modulation der CXCR4-Expression nach einer Nervenläsion, so fällt auf, dass die Zahl der Transkripte zwar ähnlich wie bei Mash2 und p57kip2 nach zwei Tagen ein Minimum erreicht und anschließend langsam wieder zunimmt, dieser Anstieg jedoch nicht stetig anhaltend ist, sondern nach 3 Wochen wieder ein erniedrigtes Expressionsniveau zu finden ist. Da CXCR4 in Interaktion mit SDF-1α jedoch die Apoptose fördert, kann spekuliert werden, dass initial möglicherweise der Zelltod durch Nekrose dem der Apoptose überwiegt, so dass CXCR4 auch transient herunterreguliert wird. Die Schwankungen des Expressionsprofil im Verlauf lassen vermuten, dass noch weitere, noch nicht identifizierte Regulatoren der Transkription an der Expression dieses Genes im Rahmen der Regenerationsprozesse beteiligt sind oder dass CXCR4 auch von infiltrierenden Immunzellen exprimiert bzw. reguliert wird [Küry *et al*., 2002].

Gegenstand weiterer Untersuchungen sollten auch die Gliazellen des ZNS sein, insbesondere in den den Schwannzellen äquivalenten Oligodendrozyten sollten die Ex-

pressionsmuster von Mash2 und seinen Zielgenen analysiert werden. Ein Nachweis des Vorkommens des Mash2-Gens im zentralen Nervensystem steht bisher aus, auch bleibt ungeklärt, ob die in Schwannzellen identifizierten Zielgene von Mash2 auch im ZNS unter seiner Regulation stehen und wie sie sich bezüglich der Zellfunktionen Proliferation und Apoptose verhalten. Die bisher erlangten Erkenntnisse und die Vielzahl der möglichen Funktionen haben den Transkriptionsfaktor Mash2 zu einem sehr interessanten Untersuchungsobjekt gemacht, das auch in Zukunft Gegenstand experimenteller Forschung in der Neurobiologie sein wird.

6. Literaturverzeichnis

Agostini C, Cassatella M, Zambello R, Trentin L, Gasperini S, Perin A, Piazza F, Siviero M, Facco M, Dziejman M, Chilosi M, Qin S, Luster AD, Semenzato G (1998). Involvement of the IP-10 chemokine in sarcoid granulomatous reactions. *J Immunol*. 161: 6413-6420.

Aiuti A, Webb IJ, Bleul C, Springer T, Gutierrez-Ramos JC (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.

Ari H und Charo IF (1996). Differential regulation of G-protein-mediated signaling by chemokine receptors. *J Biol Chem* 271: 21814-21819.

Arroyo EJ, Bermingham JRJ, Rosenfeld MG, Scherer SS (1998). Promyelinating Schwann cells express Tst-1/SCIP/Oct-6. *J Neurosci*. 18: 7891-7902.

Asensio VC, Maier J, Milner R, Boztug K, Kincaid C, Moulard M, Phillipson C, Lindsley K, Krucker T, Fox HS, Campbell IL (2001). Interferon-independent, Human Immunodeficiency Virus Type 1 gp120- Mediated Induction of CXCL10/IP-10 Gene Expression by Astrocytes In Vivo and In Vitro. *J Virol*. 75: 7067-7077.

Bajetto A, Barbero S, Bonavia R, Piccioli P, Pirani P, Florio T, Schettini G (2001). Stroma cell-derived factor-1alpha induces astrocyte proliferation through the activation of extracellular signal-regulated kinases ½ pathway. *J Neurochem*. 77: 1226-1236.

Benezra R, Davis RL, Lassar A, Tapscott S, Thayer M, Lockshon D, Weintraub H (1990). Id: A negative regulator of helix-loop-helix DNA binding proteins. Control of terminal myogenic differentiation. *Ann NY Acad Sci*. 599: 1-11.

Berson JF, Long D, Doranz BJ, Rucker J, Jirik FR, Doms RW (1996). A seven transmembrane domain receptor involved in fusion and entry of T-cell-tropic human

immunodeficiency virus type 1 strains. *J Virol.* 70: 6288-6295.

Bezzi P, Domercq M, Brambilla L, Galli R, Schols D, De Clercq E, Vescovi A, Bagetta G, Kollias g, Meldolesi J, Volterra A (2001). CXCR4-activated astrocyte glutamat release via TNFalpha: amplification by microglia triggers neurotoxicity. *Nat Neurosci*. 4: 702-710.

Blanchard AD, Sinanan A, Parmantier E, Zwart R, Broos L, Meijer D, Meier C, Jessen KR, 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 CC, Farzan M, Choe H, Parolin C, Clark-Lewis I, Sodroski J, Springer TA (1996). The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature* 382: 829-833.

Booth V, Keizer DW, Kamphuis MB, Clark-Lewis I, Sykes BD (2002). The CXCR3 binding chemokine IP-10/CXCL10: structure and receptor interactions. *Biochemistry* 41: 10418-10425.

Brockes JP, Fields KL, Raff MC (1979 a). Studies on cultured rat Schwann cells. I. Establishment of purified populations from cultures of peripheral nerve. *Brain Res*. 165:105-118.

Brockes JP, Raff MC (1979 b). Studies on cultured rat Schwann cells. II. Comparison with a rat Schwann cell line. *In vitro*. 15: 772-778.

Campuzano S und Modolell J (1992). Patterning of the Drosophila nervous system: the achaete-scute gene complex. *Trends Genet*. 8: 202-208.

Caspary T, Cleary MA, Baker CC, Guan XJ, Tilghman SM (1998). Multiple mechanisms regulate imprinting of the mouse distal chromosome 7 gene cluster. *Mol Cell Biol*. 18: 3466-3474.

Chada S, Ramesh R, Mhashilkar AM (2003). Cytokine- and chemokine-based gene therapy for cancer. *Curr Opin Mol Ther*. 5: 463-474.

Cheng M, Olivier P, Diehl JA, Fero M, Roussel MF, Roberts JM, Sherr CJ (1999). The p21Cip1 and p27Kip1 CDK inhibitors are essential activators of Cyclin-D-dependent kinases in murine fibroblasts. *EMBO J.* 18: 1571-1583.

Chrezzo TL, Godt RE, Leatherbury L, Convay SJ, Kirby ML (1998). Role of cardiac neural crest cells in cardiovascular development. *Annu Rev Physiol*. 60: 267-286.

Christy BA, Lau LF, Nathans D (1988). A gene activated in mouse 3T3 cells by serum growth factors encodes a protein with “zinc finger” sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 7857-7861.

Conti G, De Pol A, Scarpini E, Vaccina F, De Riz M, Baron P, Tiriticco M, Scarlato G (2002). Interleukin-1 beta and interferon-gamma induce proliferation and apoptosis in cultured Schwann cells. *J Neuroimmunol*. 124: 29-35.

Cox MA, Jenh CH, Gonsiorek W, Fine J, Narula SK, Zavodny PJ, Hipkin RW (2001). Human interferon-inducible 10-kDa protein and human interferon-inducible T cell alpha chemoattractant are allotopic ligands for human CXCR3: differential binding to receptor states. *Mol Pharmacol*. 59: 707-715.

Cunningham JJ und Roussel MF (2001). Cyclin-dependent Kinase Inhibitors in the Development of the Central Nervous System. *Cell Growth Differ*. 12: 387-396.

Dell G, Charalambous M, Ward A (2001). In vitro methylation of specific regions in recombinant DNA constructs by excision and religation. *Methods Mol Biol*. 181: 251-258.

Dong Z, Sinanan A, Parkinson D, Parmantier E, Mirsky R, Jessen KR (1999). Schwann cell development in embryonic mouse nerves. *J Neurosci Res*. 56: 334-348.

Doranz BJ, Orsini MJ, Turner JD, Hoffman TL, Berson JF, Hoxie JA, Peiper SC, Brass LF, Doms RW (1999). Identification of CXCR4 domains that support coreceptor and chemokine receptor functions. *J Virol*. 73: 2752-2761.

Dowsing BJ, Morrison WA, Nicola NA, Starkey GP, Bucci T, Kilpatrick TJ (1999).

Leukemia inhibitory factor is an autocrine survival factor for Schwann cells. *J Neurochem*. 73: 96-104.

Dyer MA, Cepko CL (2001). The p57kip2 cyclin kinase inhibitor is expressed by a restricted set of amacrine cells in the rodent retina. *J Comp Neurol*. 429: 601-614.

Eck M, Schmausser B, Scheller K, Toksoy A, Kraus M, Menzel T, Muller-Hermelink HK, Gillitzer R (2000). CXC chemokines Gro (alpha)/Il-8 and IP-10/MIG in Helicobacter pylori gastritis. *Clin Exp Immunol*. 122: 192-199.

Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S (1998). A caspase-activated DNAse that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391: 43-50.

Eriksson C, Eneslatt K, Ivanoff J, Rantapaa-Dahlqvist S, Sundqvist KG (2003). Abnormal expression of chemokine receptors on T-cells from patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 12: 766-774.

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

Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, Berger EA (1996). HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* 272: 872-877.

Fillion I, Ouellet N, Simard M, Bergeron Y, Sato S, Bergeron MG (2001). Role of chemokines and formly peptides in pneumococcal pneumonia- induced monocyte/macrophage recruitment. *J Immunol*. 166: 7353-7361.

Franciotta D, Martino G, Zardini E, Furlan R, Bergamaschi R, Andreoni L, Cosi V (2001). Serum an CSF levels of MCP-1 and IP-10 in multiple sclerosis patients with acute and stable disease and undergoing immunomodulatory therapies. *J Neuroimmunol.* 115: 192-198.

Ghysen A und Dambly-Chaudiere C (1988). From DNA to form: the achaete-scute complex. *Genes Dev*. 2: 495-501.

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

Gottlieb AB, Luster AD, Posnett DN, Carter DM (1988). Detection of gamma interferon-induced protein IP-10 in psoriatic plaques. *J Exp Med*. 168: 941-948.

Gratzner HG (1982). Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication. *Science*. 218: 474-475.

Grinspan JB, Marchionni MA, Reeves M, Coulaloglou M, Scheres SS (1996). Axonal interactions regulate Schwann cell apoptosis in developing peripheral nerve : neuregulin receptors and the role of neuregulins. *J Neurosci*. 16: 6107-6118.

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

Guillemot F, Nagy A, Auerbach A, Rossant J, Joyner A (1994). Essential role of Mash2 in extraembryonic development. *Nature* 371: 333-336.

Hagedorn L, Suter U, Sommer L (2000). P0 and PMP22 mark a multipotent neural crest-derived cell type that displays community effects in response to TGF-beta family. *Development* 126: 3781-3794.

Han Y, He T, Huang DR, Pardo CA; Ransohoff RM (2001). TNF-alpha mediates SDF-1 alpha-induced NF-kappa B activation and cytotoxic effects in primary astrocytes. *J Clin Invest*. 108: 425-435.

Harvey CE, Post JJ, Palladinetti P, Freeman AJ, Ffrench RA, Kumar RK, Marinos G, Lloyd AR (2003). Expression of the chemokine IP-10 (CXCL10) by hepatocytes in chronic hepatitis C virus infection correlates with histological severity and lobular inflammation. *J Leukoc Biol.* 74: 360-369.

Hatada I und Mukai T (1995). Genomic imprinting of p57kip2, a cyclin-dependent

kinase inhibitor, in mouse. *Nat Genet*. 11: 204-206.

Hatada I, Ohashi H, Fukushima Y, Kaneko Y, Inoue M, Komoto Y, Okada A, Ohishi S, Nabetani A, Morisaki H, Nakayama M, Niikawa N, Mukai T (1996). An imprinted gene p57KIP2 is mutated in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Nat Genet*. 14: 171-173.

Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Res*. 6: 986-994.

Hesselgesser J, Taub D, Baskar P, Greenberg M, Hoxie J, Kolson DL, 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.

Horuk R, Martin A, Wang Z, Schweitzer L, Gerassimides A, Guo H, Lu Z, Hesselgesser J, Perez H, Kim J, Parker J, Hadley T, Peiper S (1997). Expression of chemokine receptors by subsets of neurons in the central nervous system. *J Immunol* 158: 2882-2890.

Huang D, Han Y, Rani MR, Glabinski A, Trebst C, Sorensen T, Tani M, Wang J, Chien P, O'Bryan S, Bielecki B, Zhou ZL, Majumder S, Ransohoff RM (2000). Chemokines and chemokine receptors in inflammation of the nervous system: manifold roles and exquisite regulation. *Immunol Rev.* 177: 52-67.

Huang H und Xiang J (2004). Synergistic effect of lymphotactin and interferon gamma-inducible protein-10 transgene expression in T-cell localization and adoptive T-cell therapy of tumors. *Int J Cancer*. 109: 817-825.

Jessen KR, Brennan A, Morgan L, Mirsky R, Kent A, Hashimoto Y, Gavrilovic (1994). The Schwann cell precursor and its fate: a study of cell death and differentiation during gliogenesis in rat embryonic nerves. *Neuron* 12: 509-527.

Jessen KR, Morgan L, Stewart HJ, Mirsky R (1990). Three markers of adult non-myelin-forming Schwann cells, 217c(Ran-1), A5E3 and GFAP: development and regulation by neuron-Schwann cell interactions. *Development* 109: 91-103.

Johnson JE, Birren SJ, Anderson DJ (1990). Two rat homologues of Drosphila achaete-scute specifically expressed in neuronal precursors. *Nature* 346: 858-861.

Johnson JE, Birren SJ, Saito T, Anderson DJ (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 U S A* 89: 3596-3600.

Karpus WJ und Ransohoff RM (1998). Chemokine regulation of experimental autoimmune encephalitis: temporal and spatial expression patterns govern disease pathogenesis. *J Immunol*. 161: 2667-2671.

Kawamura A, Miura S, Fujino M, Nishikawa H, Matsuo Y, Tanigawa H, Tomita S, Tsuchiya Y, Matsuo K, Saku K (2003). CXCR3 chemokine receptor-plasma IP-10 interaction in patients with coronary artery disease. *Circ J.* 67: 851-854.

Kerr JFR, Winterford CM, Harmon BV (1994). Apoptosis: Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 73: 2013-2026.

Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR (1972). Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 26: 239-257.

Keyser J, Schultz J, Ladell K, Elzaouk L, Heinzerling L, Pavlovic J, Moelling K (2004). IP-10-encoding plasmid DNA therapy exhibits anti-tumor and anti-metastatic efficiency. *Exp Dermatol*. 13: 380-390.

Kieseier BC, Krivacic K, Jung S, Pischel H, Toyka KV, Ransohoff RM, Hartung HP (2000). Sequential expression of chemokines in experimental autoimmune neuritis. *J Neuroimmunol.* 110: 121-129.

Kieseier BC, Tani M, Mahad D, Oka N, Ho T, Woodroofe N, Griffin JW, Toyka KV, Ransohoff RM, Hartung HP (2002). Chemokines and chemokine receptors in inflammatory demyelinating neuropathies: a central role for IP-10. *Brain* 125: 823-834.

Klein R, Rubin J, Gibson H, DeHaan E, Alvarez-Hernandez X, Segal R, Luster A

(2002). SDF-1 alpha induces chemotaxis and enhances Sonic hedgehog-induced proliferation of cerebellar granule cells. *Development* 128: 1971-1981.

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

Küry P, Greiner-Petter R, Cornely C, Jürgens T, Müller HW (2002). Mammalian achaete scute homolog 2 is expressed in the adult sciatic nerve and regulates the expression of Krox-24, Mob-1, CXCR4, and p57kip2 in Schwann cells. *J Neurosc.* 22: 7586-7595.

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

LaBaer J, Garrett MD, Stevenson LF, Slingerland JM, Sandhu C, Chou HS, Fattaey A, Harlow E (1997). New functional activities for the p21 family of CDK inhibitors. *Genes Dev*. 11: 847-862.

LaBonne C und Bronner-Fraser M (1999). Molecular mechanisms of neural crest formation. *Annu Rev Dev Biol.* 15: 81-112.

Lahrzt F, Piali L, Spanaus KS, Seebach J, Fontana A (1998). Chemokines and chemotaxis of leukocytes in infectious meningitis. *J Neuroimmunol*. 85: 33-43.

Lane BR, King SR, Bock PJ, Strieter RM, Coffey MJ, Markovitz DM (2003). The C-X-C chemokine IP-10 stimulates HIV-1 replication. *Virology* 307: 122-134.

Lapham CK, Ouyang J, Chandrasekhar B, Nguyen NY, Dimitrov DS, Golding H (1996). Evidence of cell-surface association between fusin and the CD4-gp120 complex in human cell lines. *Science* 274: 602-605.

Lee MH und Yang HY (2001). Contributions in the domain of canacer research: Review. Negative regulators of cyclin-dependent kinases and their roles in cancers. *Cell Mol Life Sci*. 58: 1907-1922.

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

Lee SL, Sadovsky Y, Swirnoff AH, Polish JA, 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.

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 U S A* 85: 4691-4695.

Li HL, Kostulas N, Huang YM, Xiao BG, Kostulas V, Giedraitas V, Link H (2001). IL-17 and IFN-gamma mRNA expression is increased in the brain and systemically after permanent middle cerebral artery occlusion in rat. *J Neuroimmunol*. 116: 5-14.

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

Liem KF, Tremml G, Roelink H, Jessel TM (1995). Dorsal differentiation of neural plate cells induced by BMP-mediated signals from epidermal ectoderm. *Cell* 82: 969-979.

Limatola C, Giovannelli A, Maggi L, Ragozzino D, Castellani L, Ciotti M, Vacca F, Mercanti D, Santoni A, Eusebi F (2000). SDF-1 alpha-mediated modulation of synaptic transmission in rat cerebellum*. Eur J Neurosci.* 12: 2497-2504.

Lindley I, Westwick J, Kunkel S (1993). Nomenclature announcement: the chemokines. *Immunol Today* 14: 24.

Lobsiger CS, Schweitzer B, Taylor V, Suter U (2000). Plateled-derived growth factor-BB supports the survival of cultures rat Schwann cell precursors in synergy with neurotrophin-3. *Glia* 30: 290-300.

Lobsiger CS, Smith PM, Buchstaller J, Schweitzer B, Franklin RJM, Suter U, Taylor V (2001). SpL201: a conditionally-immortalized Schwann cell precursor line that

generates myelin. *Glia* 36: 31-47.

Lobsiger CS, Taylor V, Suter U (2002). The early life of a Schwann cell. Review. *Biol Chem.* 383: 245-253.

Loetscher M, Gerber B, Loetscher P, Jones SA, Piali L, Clark-Lewis I, Baggiolini M, Moser B (1996). Chemokine receptor specific for IP-10 and Mig: structure, function and expression in activated T-lymphocytes. *J Exp Med.* 184: 963-969.

Loetscher P, Gong JH, Dewald B, Baggiolini M, Clark-Lewis I (1998). N-terminal peptides of stroma cell-derived factor-1 with CXC chemokine receptor 4 agonist and antagonist activities. *J Biol Chem*. 273: 22279-22283.

Loetscher P, Pellegrino A, Gong JH, Mattioli I, Loetscher M, Bardi G, Baggiolini M, Clark-Lewis I (2001). The ligands of CXC chemokine receptor 3, iTAC, Mig, and IP-10, are natural antagonists for CCR3. *J Biol Chem*. 276: 2986-2991.

Loetscherv P, Seitz M, Clark-Lewis I, Baggiolini M, Moser B (1996). Activation of NK cells by CC chemokines. Chemotaxis, Ca2+ mobilization, and enzyme release. *J Immunol.* 156: 322-327.

Lubischer JL und Bebinger DM (1999). Regulation of terminal Schwann cell number at the adult neuromuscular junction. *J Neurosci*. 19: RC46, 1-5.

Luster AD und Leder P (1993). IP-10, a C-X-C-chemokine, elicits a potent thymus.dependent antitumor response *in vivo. J Exp Med.* 178: 1057-1065.

Luster AD und Ravetch JV (1987). Biochemical characterization of a gamma interferon-inducible cytokine (IP-10). *J Exp Med*. 166: 1084-1097.

Luster AD und Ravetch JV (1987). Genomic characterzation of a gamma-interferon-inducible gene (IP-10) and identification of an interferon-inducible hypersensitive site. *Mol Cell Biol*. 7: 3723-3731.

Luster AD, Unkless JC, Ravetch JV (1985). *Nature* 315: 672-676. Titel ?

Mainprize TG, Taylor MD, Rutka JT, Dirks PB (2001). Cip/Kip cell-cycle inhibitors: a

neuro-oncological perspective. *J Neurooncol*. 51: 205-218.

Majno G und Joris I (1995). Apoptosis, oncosis and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol*. 146: 3-15.

Majumder S, Zhou LZ, Rnasohoff RM (1996). Transcriptional regulation of chemokine gene expression in astrocytes. *J Neurosci Res.* 45: 758-769.

Matsuoka S, Edwards MC, Bai C, Parker S, Zhang P, Baldini A, Harper JW, Elledge SJ (1995). p57KIP2, a structurally distinct member of the p21CIP1 Cdk inhibitor family, is a candidate tumor suppressor gene. *Genes Dev*. 9: 650-662.

Matsuoka S, Thompson JS, Edwards MC, Barletta JM, Grundy P, Kalikin LM, Harper JW, Elledge SJ, Peinberg AP (1996). Imprinting of the gene encoding a human cyclin-dependent kinase inhibitor, p57KIP2, on chromosome 11p15. *Proc Natl Acad Sci USA.* 93: 3026-3030.

Matusoka S, Edwards MC, Bai C, Parker S, Zhang P, Baldini A, Harper JW, Elledge SJ (1995). p57kip2, a structurally distinct member of the p21cip1 Cdk inhibitor family, is a candidate tumor suppressor gene. *Genes Dev*. 9: 650-662.

McGrath KE, Koniski AD, Maltby KM, McGann JK, Palis J (1999). Embryonic expression and function of the chemokine SDF-1 and its receptor, CXCR4. *Dev Biol*. 213: 442-456.

Meier C, Parmantier E, Brennan A, Mirsky R, Jessen KR (1999). Developing Schwann cells acquire the ability to survive without axons by establishing an autocrine circuit involving insulin-like growth factor, neurotrophin-3 and platelet-derived growth-factor-BB. *J Neurosci*. 19: 3847-3859.

Meucci O, Fatatis A, Simen A, Bushell T, Gray P, Miller R (1998). Chemokines regulate hippocampal neuronal signaling and gp120 neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 95: 14500-14505.

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

Mirsky R und Jessen KR (1999). Review. The neurobiology of Schwann cells. *Brain Pathol*. 9: 293-311.

Mirsky R, Dubois C, Morgan L, Jessen KR (1990). O4 and A007-sulfatide antibodies bind to embryonic Schwann cells prior to the appearance of galactocerebroside; regulation of the antigen by axon-Schwann cell signals and cyclic AMP. *Development* 109: 105-116.

Mirsky R, Jessen KR, Brennan A, Parkinson D, Dong Z, Meier C, Parmantier E, Lawson D (2002). Schwann cells as regulators of nerve development. *J Physiol Paris.* 96: 17-24.

Moalem G, Monsonego A, Shani Y, Cohen IR, Schwartz M (1999). Differential T cell response in central and peripheral nerve injury: connection with immune privilege. *FASEB J*. 13: 1207-1217.

Morrison SJ, Perez SE, Qiao Z, Verdi JM, Hicks C, Weinmaster G, Anderson DJ (2000). Transient Notch activation initiates an irreversible switch from neurogenesis to gliogenesis by neural crest stem cells. *Cell* 101: 499-510.

Murphy PM (1994). The molecular biology of leukocyte chemoattractant receptors. *Annu Rev Immunol*. 12: 593-633.

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, Kikutani T, Kishimoto T (1994). Molecular cloning and structure of a pre-B-cell growth-stimulating factor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 99: 2305-2309.

Nagasawa T, Nakajima T, Tachibana K, Iizasa H, Bleul CC, Yoshie O, Matsushima K, Yoshida N, Springer TA, Kishimoto T (1996). Molecular cloning and characterization of a murine pre-B-cell growth-stimulating factor/ stroma 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.

Nigg EA (1995). Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle. *Bioessays* 17: 471-480.

Nijjar T, Wigington D, Garbe JC, Waha A, Stampfer MR, Yaswen P (1999). p57KIP2 expression and loss of heterozygosity during immortal conversion of cultured human mammary epithelial cells. *Cancer Res*. 59: 5112-5118.

Nikam SS, Tennekoon GI, Christy BA, Yoshino JE, Rutkowski JL (1995). The zinc finger transcription factor Zif268/Egr-1 is essential for Schwann cell expression of the p57NGF receptor. *Mol Cell Neurosci* 6: 337-348.

Nurse P (1994). Ordering phase and phase in the cell cycle. *Cell* 79: 547-550.

Ohmori Y und Hamilton TA (1990). A macrophage LPS-inducible early gene encodes the murine homologue of IP-10. *Biochem Biophys Res Commun*. 168: 1261-1267.

Oya M und Schultz WA (2000). Decreased expression of p57(KIP2) mRNA in human bladder cancer. *Br J Cancer*. 83: 626-631.

Pardee AB (1989). G1 events and regulation of cell proliferation. *Science* 246: 603-608.

Pelligrino RG, Politis MJ, Ritchie JM, Spencer PS (1986). Events in degenerating cat peripheral nerve: Induction of Schwann cell S Phase and its relation to nerve degeneration. *J Neurocytol*. 15: 17-28.

Pertl U, Luster AD, Varki NM, Homann D, Gaedicke G, Reisfeld RA, Lode HN (2001). IFN-gamma-inducible protein-10 is essential for the generation of a protective tumor-specific CD8 T cell response induced by single-chain IL-12 gene therapy. *J Immunol*. 166: 6944-6951.

Petry K, Siebenkotten G, Christine R, Hein K, Radbruch A (1999). An extrachromosomal Switch Recombination Substrate reveals Kinetics and Substrate Requirements of Switch Recombination in Primary Murine B cells. *Int. Immunol*. 11: 753-763.

Ransohoff RM, Hamilton TA, Tani M, Stoler MH, shick HE, Major JA, Estes ML, Thomas DM, Tuohy VK (1993). Astrocyte expression of mRNA encoding cytokines IP-10 and JE/MCP-1 in experimental autoimmune encephalomyelitis. *FASEB J.* 7: 592-600.

Reichert H. Regenerationsprozesse ermöglichen die Neubildung von Axonen und Synapsen. S.212-213 in Neurobiologie, 2.Auflage 2000. Thieme Verlag.

Reik W und Maher ER (1997). Imprinting in cluster: lessons from Beckwith-Wiedemann syndrome. *Trends Genet*. 13:330-334.

Rochon D, Rousse I, Robitaille R (2001). Synapse-glia interactions at the mammalian neuromuscular junction. *J Neurosci*. 21: 3819-3829.

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

Rossi D und Zlotnik A (2000). The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol*. 18: 217-242.

Ruas M und Peters G (1998). The p16INK4a/CDKN2A tumor suppressor and its relatives. *Biochem Biophys Acta*. 1378: 115-177.

Samejima K, Tonè S, Kottke TJ, Enari M, Sakahira H, Cooke CA, Durrieu F, Martins CM, Nagata S, Kaufmann SH, Earnshaw WC (1998). Transition from caspase-dependent to caspase-independent mechanisms at the onset of apoptotic execution. *J Cell Biol*. 143: 225-239.

Sancho S, Young P, Suter U (2001). Regulation of Schwann cell proliferation and apoptosis in PMP22-deficient mice and mouse models of Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Brain* 124: 2177-2187.

Sanders VJ, Pittman CA, White MG, Wang G, Wiley CA, Achim CL (1998). Chemokines and recptors in HIV encephalitis. *AIDS* 12: 1021-1026.

Schiebler TH, Schmidt W, Zilles K. Nerven. S.89-91 in Anatomie, 7. Auflage 1997. Springer Verlag.

Sela-Donenfeld D und Kalcheim C (1999). Regulation of the onset of neural crest migration by coordinated activity of BMP4 and Noggin in the dorsal neural tube. *Development* 126: 4749-4762.

Sela-Donenfeld D und Kalcheim C (2000). Inhibition of noggin expression in the dorsal neural tube by somitogenesis: a mechanism for coordinating the timing of neural crest emigration. *Development* 127: 4845-4854.

Shah NM, Marchionni MA, Isaacs I, sroobant P, Anderson DJ (1994). Glial growth factor restricts mammalian neural crest stem cells to a glial fate. *Cell* 77: 349-360.

Sherr CJ und Roberts JM (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.* 13: 1501-1512.

Shimada A, Morimoto J, Kodama K, Suzuki R, Oikawa Y, Funae O, Kasuga A, Saruta T, Narumi S (2001). Elevated serum IP-10 levels observed in type 1 diabetes. *Diabetes Care* 24: 510-515.

Shin JY, Kim HS, Lee KS, Kim J, Park JB, Won MH, Chae SW, Choi YH, Choi KC, Park YE, Lee JY (2000). Mutation and expression of the p27KIP1 and p57KIP2 genes in human gastric cancer. Exp Mol Med. 32: 79-83.

Simpson JE, Newcombe J, Cuzner ML, Woodroofe MN (2000). Expression of the interferon-gamma-inducible chemokines IP-10 and Mig and their receptor, CXCR3, in multiple sclerosis lesions. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 26: 133-142.

Skoff AM, Lisak RP, Bealmear B, Benjamins JA (1998). TNF-alpha and TGF-beta act synergistically to kill Schwann cells. *J Neurosci Res*. 53: 747-756.

Son YJ und Thompson WJ (1995). Nerve sprouting in muscle is induced and guided by processes extended by Schwann cells. *Neuron* 14: 133-141.

Sorensen TL, Tani M, Jensen J, Pierce V, Lucchinetti C, Folcik VA, Qin S, Rottmann

J, Sellebjerg F, Strieter RM, Frederiksen JL, Ransohoff RM (1999). Expression of specific chemokines and chemokine receptors in the central nervous system of multiple sclerosis patients. *J Clin Invest*. 103: 807-815.

Stewart HJ, Zoidl G, Rossner M, Brennan A, Zoidl C, Nave KA, Mirsky R, Jessen KR (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.

Stoll G, Griffin JW, Li CY, Trapp BD (1989). Wallerian degeneration in the peripheral nervous system: participation of both Schwann cells and macrophages in myelin degradation. *J Neurocytol*. 18: 671-683.

Sun XH, Copeland NG, Jenkins NA, 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.

Syroid DE, Maycox PJ, Burrola PG, Liu N, Wen D, Lee KF, Lemke G, Kilpatrick TJ (1996). Cell death in the Schwann cell lineage and its regulation by neuregulin. Proc *Natl Acad Sci USA*. 93: 9229-9234.

Syroid DE, Maycox PJ, Soilu-Hänninen M, Petratos S, Bucci T, Burrola PG, Murray S, Cheema S, Lee KF, Lemke G, Kilpatrick TJ (2000). Induction of postnatal Schwann cell death by the Low-Affinity Neurotrophin Receptor *in vitro* and after Axotomy. *J Neurosci*. 20: 5741-5747.

Syroid DE, Zorick DS, Arbert-Engels C, Kilpatrick TJ, Eckhart W, Lemke G (1999). A role for insulin-like growth factor-1 in the regulation of Schwann cell survival. *J Neurosci.* 19: 2059-2068.

Tachibana K, Hirota S, Iizana H, Yoshida H, Kawabata K, Kataoka Y, Kitamura Y, Matsushima K, Yoshida N, Nishikawa S, Kishimoto T, Nagasawa T (1998). The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract. *Nature* 393: 524-525.

Takahashi K, Kobayashi T, Kanayama N (2000). p57(Kip2) regulates the proper development of labyrinthine and spongiotrophoblasts. *Mol Hum Reprod*. 6: 1019-1025.

Tanabe S, Heesen M, Yoshizawa I, Berman M, Luo Y, Bleul C, Springer T, Okuda K, Gerad N, Dorf M (1997). Functional expression of the CXC-chemokine receptor-4/ fusin on mouse microglial cells and astrocytes. *J Immunol*. 159: 950-911.

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

Tanaka M, Puchyr M, Gertsenstein M, Harpal K, Jaenisch R, Rossant J, Nagy A (1999). Parental origin-specific expression of Mash2 is established at the time of implantation with its imprinting mechanism highly resistant to genome-wide demethylation. *Mech Dev*. 87: 129-142.

Tashiro K, Tada H, Heilker R, Sherozou M, Nakano T, Honjo T (1993). Signal sequence trap: a cloning strategy for secreted proteins and type I membran proteins. *Science* 261: 600-602.

Taub DD, Lloyd AR, Conlon K, Wang JM, Ortaldo JR, Harada A, Matsushima K, Kelvin DJ, Oppenheim JJ (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.

Teixeira AL Jr, Cardoso F, Souza AL, Teixeira MM (2004). Increased serum concentrations of monokini induced by interferon-gamma/CXCL19 and interferon-gamma-inducible protein 10/CXCL-10 in Sydenham's corea patients. *J Neuroimmunol.* 150: 157-162.

Tham T, Lazarini F, Franceschini I, Lachapelle F, Amara A, Dubois-Dalcq M (2001). Developmental pattern of expression of the alpha chemokine stroma cell-derived factor 1 in the rat central nervous system. *Eur J Neurosci*. 13: 845-856.

Thatikunta P, Qin W, Christy BA, Tennekoon GI, Rutkowski JL (1999). Reciprocal Id expression and myelin gene regulation in Schwann cells. *Mol Cell Neuosci*. 14: 519-

528.

Thornberry NA und Lazebnik Y (1998). Caspases: enemies within. *Science* 28: 1312-1316.

Tischmeyer W und Grimm R (1999). Activation of immediate early genes and memory formation. *Cell Mol Life Sci*. 55: 564-574.

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, Schneider-Maunoury S, Goi G, Trembleau A, Gourdji D, Duáncourt MA, Rao CV, Charnay P (1997). Multiple pituitary and ovarian defects in Krox-24 (NGFI-A, Egr-1) targeted mice. *Mol Endocrinol* 12: 107-122.

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

Trachtenberg JT und Thompson WJ (1996). Schwann cell apoptosis at developing neuromuscular junctions is regulated by glial growth factor. Nature 379: 174-177.

Trapp BD, Hauer P, Lemke G (1988). Axonal regulation of myelin protein mRNA levels in actively myelinating Schwann cells. *J Neurosci*. 8: 3515.

Tsugu A, Sakai K, Dirks PB, Jung S, Weksberg R, Fei YL, Mondal S, Ivanchuk S, Ackerley C, Hamel PA, Rutka JT (2000). Expression of p57(KIP2) potently blocks the growth of human astrocytomas and induces cell senescence. *Am J Pathol*. 157: 919-932.

Vanguri P und Farber JM (1990). Identification of CRG-2. An interferon-inducible mRNA predicted to encode a murine monokine. *J Biol Chem*. 265: 15049-15057.

Villagomez MT, Bae SJ, Ogawa I, Takenaka M, Katayama I (2004). Tumor necrosis factor-alpha but not interferon-gamma is the main inducer of inducible protein-10 in

skin fibroblasts from patients with atopic dermatitis. *Br J Dermatol*. 150: 910-916.

Villares R und Cabrera CV (1987). The achaete-scute gene complex of D. Melanogaster: conserved domains in a subset of genes required for neurogenesis and their homology to myc. *Cell* 50: 415-424.

Wakamatsu Y, Maynard TM, Weston JA (2000). Fate determination of neural crest cells by NOTCH-mediated lateral inhibition and asymmetrical cell division during gangliogenesis. *Development* 127: 2811-2821.

Waksman NH und Adams RD (1955). Allergic neuritis: an experimental disease in rabbits induced by the injection of peripheral nervous tissue and adjuvant. *J Exp Med.* 102: 213-225.

Walton M, Henderson C, Mason-Parker S, Lawlor P, Abraham WC, Bilkey D, Dragunow M (1999). Immediate early gene transcription and synaptic modulation. *J Neurosci Res*. 58: 96-106.

Wang X, Ellison JA, Siren AL, Lysko PG, Yue TL, Barone FC, Shatzman A, Feuerstein GZ (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.

Wang X, Yue TL, Ohlstein EH, Sung CP, Feuerstein GZ (1996). Interferon-inducible protein-10 involves vascular smooth muscle cell migration, proliferation, and inflammatory response. *J Biol Chem*. 271: 24286-24293.

Wareing MD, Lyon AB, Lu B, Gerard C, Sarawar SR (2004). Chemokine expression during the development and resolution of a pulmary leukocyte response to influenza A virus infection in mice. *J Leukoc Biol.* In press.

Wegner M (2000). Transcriptional control in myelinating glia: flavors and spices. *Glia* 31: 1-14.

Wyllie AH (1980). Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 284: 555-556.

Xia MQ und Hyman BT (1999). Chemokines/ chemokine receptors in the central nervous system and Alzheimer's disease. *J Neurovirol*. 5: 32-41.

Xia MQ, Bacskai BJ, Knowles RB, Qin SX, Hyman BT (2000). Expression of the chemokine receptor CXCR3 on neurons and the elevated expression of its ligand IP-10 in reactive astrocytes: in vitro ERK1/2 activation and the role in Alzheimer's disease. *Neuroimmunol.* 108: 227-235.

Yan Y, Frisen J, Lee MH, Massague J, Barbacid M (1997). Ablation of the CDK inhibitor p57Kip2 results in increased apoptosis and delayed differentiation during mouse development. *Genes Dev*. 11: 973-983.

Zhang P, Liegeois NJ, Wong C, Finegold M, Hou H, Thompson JC, Silverman A, Harper JW, DePinho RA, Elledge SJ (1997). Altered cell differentiation and proliferation in mice lacking p57KIP2 indicates a role in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Nature* 387: 151-158.

Zou Y, Kottman A, Kuroda M, Taniuchi I, Littmann D (1998). Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature 393*: 524-525.

7. Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
AS	Aminosäure
bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
cAMP	zyklisches Adenosin-3', 5'-monophosphat
cDNA	komplementäre DNA
ddH_2O^{DEPC}	doppelt-destilliertes Wasser, DEPC behandelt
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAse	Desoxyribonuklease
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FCS	Fetales Kälberserum
h	Stunde
kDa	Kilo-Dalton
kb	Kilo-Basenpaare
LB-Medium	Lauria-Bertani-Medium
min	Minuten
PBS	phopsphat buffered saline, Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDL	poly-D-Lysin
PNS	peripheres Nervensystem
Q-PCR	Quantitative Polymerasekettenreaktion
rSZ	Rattenschwannzelle
RT	Reverse Transkription
RNA	Ribonukleinsäure
SZ	Schwannzelle
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
u.a.	unter anderem
z.B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem

8. Danksagung

In Zusammenhang mit dieser Arbeit danke ich Herrn Prof. Dr. H.-P. Hartung für die Möglichkeit, diese Promotionsarbeit in der Neurologischen Klinik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchführen zu können.
Herrn Privatdozent Dr. Patrick Küry danke ich für die Überlassung des Themas und die hervorragende, intensive Betreuung dieser Arbeit. Durch seine Anregungen, gute Organisation und Verfügbarkeit als ständiger Ansprechpartner wurde das Gelingen dieser Arbeit erst ermöglicht.
Außerdem bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Reifenberger für die Übernahme des Koreferates.
Ich danke Herrn Prof. Dr. H.-W. Müller für die Möglichkeit, diese Arbeit im Labor für molekulare Neurobiologie durchführen zu können, außerdem möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Neurochemischen Labors für die gute Arbeitsatmosphäre und die freundliche Unterstützung in allen wissenschaftlichen Fragen bedanken. Hervorheben möchte ich hier Herrn Dr. Michael Hamacher und Ulrich Pippirs für ihre wertvolle und geduldige Unterstützung im Umgang mit den molekularbiologischen Methoden, Fabian Kruse für seine Hilfe bei vielen Computerprogrammen, sowie Regine Greiner-Petter und Regina Ziegler für ihre wertvollen Ratschläge bezüglich der Zellkultur und vielen weiteren Aspekten des Laboralltages.
Besonderer Dank gebührt auch meinen Eltern für ihre immerwährende Unterstützung, meinen Freunden, die mich während der Zeit des Medizinstudiums begleitet und motiviert haben und Ralf Rulands, der immer für mich da ist.

9. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name:	Christiane Cornely
Geburtsdatum:	21.03.1978
Geburtsort:	Hilden
Anschrift:	Dunantstr. 39, 41468 Neuss
Konfession:	evangelisch

Schulbildung:

1984 - 1988	Wilhelm-Busch-Grundschule Ratingen
1988 - 1997	Theodor-Heuss-Gymnasium Ratingen Schulabschluss: Allgemeine Hochschulreife

Studium:

1997 - 2004	Studium der Humanmedizin an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
August 1999	Ärztliche Vorprüfung
August 2000	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
März 2003	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
Mai 2004	Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Gesamtnote: 2,0)

Famulaturen:

Zwischen 2000 und 2002:	Innere Medizin, Pädiatrie, Rheumatologie und Tropenmedizin, Neurologie

Praktisches Jahr:

I. Tertial:	Innere Medizin, Evangelisches Krankenhaus Düsseldorf
II. Tertial	Chirurgie, Addington Hospital, Durban, Südafrika
III. Tertial	Wahlfach Neurologie, Neurologische Universitätsklinik, Kantonspital Basel, Schweiz

Berufliche Laufbahn:

Seit September 2004	Assistenzärztin der Klinik für Neurologie und Klinische Neurophysiologie des HELIOS-Klinikums Wuppertal, Klinikum der Universität Witten-Herdecke, Direktor: Prof. Dr. J. Jörg

Promotion:

Seit November 2001	Experimentelle Forschung im Institut für molekulare Neurobiologie unter Leitung von PD Dr. Küry, HHU Düsseldorf

Veröffentlichungen:

Sep. 2002	Küry P, Greiner-Petter R, Cornely C, Jürgens T, Müller HW: 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. Journal of Neuroscience; 2002 Sep 1;22(17):7586-95.
Sep. 2003	Küry P, Köller H, Hamacher M, Cornely C, Hasse B, Müller HW: Cyclic AMP and tumor necrosis factor-α regulate CXCR4 gene expression in Schwann cells. Molecular and Cellular Neuroscience 2003 Sep;24(1):1-9.