

Aus der Klinik für Neurologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ. Prof. Dr. med. Hans-Peter Hartung

**Die Rolle des Myelinproteins 2 (P2) bei der Myelinbildung im
peripheren Nervensystem**

Dissertation

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

vorgelegt von
Fabian Klingler
(2019)

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

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. N. Klöcker

Erstgutachterin/Erstgutachter: Prof. B. C. Kieseier

Zweitgutachterin/Zweitgutachter: Prof. S. Weggen

Für meine Großmutter Magdalena Klingler.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Stettner, M., Zenker, J., Klingler, F. et al., (2017), The Role of Peripheral Myelin Protein 2 in Remyelination. *Cellular and Molecular Neurobiology*. 10.1007/s10571-017-0494-0

Zusammenfassung:

In dieser Arbeit wurde die Rolle des Myelinproteins 2 (P2) auf die Myelinbildung im peripheren Nervensystem untersucht. P2 ist ein seit längerem bekanntes Myelinprotein, detektierbar in der peripheren Myelinscheide spezifischer Fasern. Neuste Ergebnisse lassen vermuten, dass P2 neben seiner Funktion als Membranprotein auch als Lipidtransporter Einfluss auf die Zusammensetzung des Myelins nehmen kann. Die dezidierte Rolle von P2 beim Prozess der Myelinbildung und Myelinregeneration ist weitgehend ungeklärt.

Basierend auf dem Vergleich der P2-defizienten Mauslinie mit Wildtyp-Kontrolltieren, wurde in dieser Arbeit *in vivo* die funktionelle Bedeutung von P2 nach experimentellem Nervenschaden durch elektrophysiologische und morphometrische Untersuchungen im Nervenschnitt beleuchtet. Durch die Verwendung des myelinisierenden Hinterstrangganglienmodells wurden *in vitro* Erkenntnisse über P2 bei der initialen Myelinisierung und Remyelinisierung gewonnen. Es kamen Färbemethoden mit fluoreszierenden Fettsäuren, Sudanschwarz und Immunzytochemie zur Anwendung und die Kulturen wurden mikroskopisch untersucht. Mittels *Real-Time-Quantitative* Polymerase-Kettenreaktion wurde die RNA-Expression quantifiziert und durch die Technik der Zymographie die Aktivität der Matrix-Metalloproteasen im Kulturmedium beurteilt.

Morphologie und Myelinmenge der P2-defizienten Kulturen zeigten keinen signifikanten Unterschied zu den Kontrollen. Internodal- und Nodallänge ergaben für P2-defiziente Kulturen verbreiterte Ranvier'sche Schnürringe, insbesondere nach experimenteller *ex vivo* Demyelinisierung. Immunzytochemisch konnte gezeigt werden, dass P2 auch in Fasern vorkommt, die sich für Myelin-Basisches Protein negativ zeigten. *In vivo* zeigten die P2-defizienten Mäuse verstärkt klinische Einschränkungen nach experimentellem Nervenschaden, die Messung der Nervenleitgeschwindigkeit der Versuchstiere zeigte für P2-defiziente Mäuse eine signifikant verlangsamte Nervenleitgeschwindigkeit 14 Tage nach der Nervenläsion. Die Analyse der Enzymaktivität wies auf eine abweichende Aktivität der Matrix-Metalloproteasen hin.

Diese Ergebnisse schreiben P2 eine besondere Bedeutung im Rahmen von Regenerations- und Remyelinisierungsvorgängen nach Nervenschädigungen im PNS zu.

Abstract:

This study examined the role of Myelin Protein 2 (P2) on Myelin production in the peripheral nervous system. P2 is known as a myelin protein detectable in the peripheral myelin sheath of specific fibres. Additional to its structural role as membrane protein, recent studies indicate P2 to be involved in the lipid homeostasis in the peripheral neural system. However its precise role during myelin production and regeneration has yet to be elucidated.

Based on a comparison of P2-deficient mice with corresponding wild-type animals we assessed *in vivo* the functional importance of P2 after experimental nerve crush injury using electrophysiology and morphometric measurement of semithin sections. Using a myelinating culture model with dorsal root ganglia the role of P2 in initial myelination and remyelination *in vitro* was examined. The cultures underwent immunocytochemistry, sudan black staining and fluorescent acid staining and were assessed with an upright microscope. RNA-Expression was quantified using Real-Time Polymerase Chain Reaction and using Zymography the activity of Matrix Metalloproteinases in the culture medium was evaluated.

Morphology and total amount of Myelin in P2-deficient cultures showed no significant alteration compared to the control group. Measurement of internodal and nodal length showed whider Nodes of Ranvier in P2-deficient cultures particularly after experimental demyelination. Immunocytochemistry proved the presence of P2 in fibres without Myelin Basic Protein. *In vivo* experiments showed increased clinical impairment in P2-deficient mice after experimental nerve crush and electrophysiology resulted in decreased nerve conduction velocity in P2-deficient mice 14 days after nerve crush. Analysis of enzyme activity showed no significant alteration in Matrix Metalloproteinase activity.

These data indicate that P2 may play a role in nerval regeneration and remyelination in the injured peripheral nervous system, presumably by affecting the nodal and internodal configuration.

Abkürzungsverzeichnis:

CIDP	Chronisch inflammatorische demyelinisierende Polyradikuloneuropathie	P2	Myelinprotein 2
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol	PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium	PEB	Bovines Hypophysenextrakt (<i>pituitary extract bovine</i>)
DRG	Spinalganglien (<i>dorsal root ganglia</i>)	PFA	Paraformaldehyd
E14	14 Tage alter Embryo	PLP	Proteolipid-Protein
EAN	Experimentelle autoimmune Neuritis	PMP-22	Peripheres Myelinprotein 22
FABP	Fettsäurebindende Proteine (<i>Fatty acid binding proteins</i>)	PNS	Peripheres Nervensystem
G-ratio	relative Myelinscheidendicke	RNA	Ribonukleinsäure
GBS	Guillain-Barré-Syndrom	RT-Q-PCR	<i>Real-Time-Quantitative</i> Polymerase-Kettenreaktion
HS	Pferdeserum (<i>horse serum</i>)	SCIP	<i>suppressed cAMP-inducible POU</i>
KG	Körpergewicht	SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-gelelektrophorese
MAG	Myelin-assoziiertes Glykoprotein	ZNS	Zentrales Nervensystem
MBP	basisches Myelinprotein		
MEM	Minimum Essential Medium		
MMP	Matrix-Metalloprotease		
NF155	Neurofascin 155		
NGF	Nervenwachstumsfaktor (<i>nerve growth factor</i>)		
NGS	Ziegenserum (<i>normal goat serum</i>)		
P0	Protein Null		

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	4
1.1 Das periphere Nervensystem	4
1.1.1 Einführung.....	4
1.1.2 Organisation des Peripheren Nervensystems.....	4
1.1.3 Die Schwann'schen Zellen	6
1.1.4 Die Erregungsleitung	7
1.1.5 Nervenschädigung- und Regeneration.....	7
1.2. Die Myelinschicht.....	8
1.2.1 Zusammensetzung und Homöostase.....	8
1.2.2 Der Ranvier'sche Schnürring	9
1.2.3 Die Lipide des Myelins.....	11
1.2.4 Die Proteine des Myelins	12
1.3 Das Myelinprotein 2.....	14
1.3.1 Das P2-Gen.....	14
1.3.2 Struktur und Vorkommen von P2	15
1.3.3 Theorien zur Funktion von P2	16
1.3.4 P2 im Kontext demyelinisierender Neuropathien.....	17
2 Fragestellung	18
3 Material und Methoden	19
3.1 Generierung der transgenen Linie.....	19
3.2 Myelinisierende DRG-Schwannzell-Co-Kulturen.....	20
3.1.1 Grundlagen	20
3.1.2 Präparation.....	20
3.2.3 Anlegen der Zellkulturen	21
3.2.4 Kultivieren der DRG-Kulturen	22
3.2.5 De- und Remyelinisierung.....	22
3.3 Fluoreszierende Fettsäuren	23
3.4 Sudanschwarzfärbung.....	23
3.5 Immunzytochemie.....	24

3.6 Polymerase-Kettenreaktion.....	25
3.7 Zymographie.....	26
3.8 Nervenquetschung.....	28
3.8.1 Operatives Vorgehen zur Erzeugung der Nervenläsion	28
3.8.2 Evaluation der klinischen Beeinträchtigung	28
3.8.3 Messung der Nervenleitgeschwindigkeit.....	29
3.8.4 Histologie und Auswertung	30
3.9 Statistische Auswertung.....	31
4 Ergebnisse	32
4.1 Die P2-MBP-Co-Expression in der Immunzytochemie	32
4.2 Die Expression von Caspr in P2-positiven Nervenfasern.....	33
4.3 Bestimmung der Myelinmenge von P2-defizienten DRG-Kulturen	34
4.4. Die Morphologie myelinisierter Fasern in P2-defizienten DRG-Kulturen	37
4.5 Internodal- und Nodallänge myelinisierter Fasern in P2-defizienten DRG- Kulturen	39
4.6 Die RNA-Expression relevanter Myelinguene in P2-defizienten DRG-Kulturen .	43
4.7 Die Proteinase-Aktivität im Mediumüberstand P2-defizienter DRG-Kulturen	43
4.8 Die klinische Beeinträchtigung P2-defizienter Tiere nach Crush-Läsion	45
4.9 Einfluss der P2-Defizienz auf die Nervenleitgeschwindigkeit nach Crush- Läsion.....	45
4.10 Morphologische Untersuchung der Nerven nach Crush-Läsion	47
5 Diskussion	48
5.1 Die Myelinmenge in P2-defizienten DRG-Kulturen	48
5.2 P2-MBP-Coexpression in der Immunzytochemie	49
5.3 Caspr in P2-positiven Nervenfasern	50
5.4 Die Internodallänge und der Ranvier'sche Schnürring	51
5.5 P2-Defizienz und mögliche Kompensationsmechanismen im Kontext der Myelinhomöostase	53
5.6 Nerve Crush.....	56

6 Schlussfolgerungen.....	58
7 Literatur- und Quellenverzeichnis	59

1 Einleitung

1.1 Das periphere Nervensystem

1.1.1 Einführung

Das periphere Nervensystem (PNS) umfasst alle nervalen Strukturen außer Gehirn und Rückenmark. Als Bindeglied zwischen dem zentralen Nervensystem (ZNS) und der Peripherie leitet und verarbeitet es sowohl eingehende Informationen, die sogenannten Afferenzen, als auch ausgehende Informationen, die Efferenzen (Sedava 2011).

Die Perikaryen der sensorischen Neurone liegen in den Spinalganglien und leiten die afferenten Informationen an das ZNS weiter. Die efferenten Nervenfasern hingegen nehmen ihren Ursprung von Neuronen in Gehirn und Rückenmark. Ihre Zellfortsätze, die Axone, verlassen das ZNS und setzen sich gebündelt in peripheren Nerven fort.

Der Informationsfluss in den Nervenfasern ist dabei unidirektional festgelegt. Von afferenten Zellfortsätzen, den Dendriten, erfolgt die Erregungsleitung zum Perikaryon hin, dem den Zellkern enthaltenden Zentrum des Neurons. Den efferenten Schenkel bildet das Axon, ein Zellfortsatz, der in einer synaptischen Auftreibung endet. An diesen Synapsen kann die Erregung über die Ausschüttung von Transmitterstoffen an eine nachgeschaltete Zelle weitergegeben werden. Die Dendriten der sensorischen Neurone ähneln strukturell stark den Axonen und werden daher auch dendritische Axone genannt (Sedava 2011).

1.1.2 Organisation des Peripheren Nervensystems

Die (dendritischen) Axone werden von Gliazellen ummantelt und von bindegewebigen Hüllstrukturen zu Bündeln gefasst – so liegen sie als periphere Nerven im Gewebe.

Ein peripherer Nerv wird von einem Mantel aus lockerem kollagenem Bindegewebe umschlossen, dem Epineurium. Innerhalb dieses Bindegewebsschlauchs liegen Arteriolen, Venolen, und Nervenfaserbündel. Diese werden durch das Perineurium getrennt, ein zellreiches Bindegewebe, das sich in mehreren Schichten um die jeweiligen Strukturen legt (Cragg und Thomas 1957, Campbell et al. 2013). Einzelne Nervenfasern werden wiederum durch retikuläres Bindegewebe, das sog. Endoneurium, umschlossen. Innerhalb einer solchen Endoneuralscheide liegen ein Axon und seine

Gliazellen (Abb. 1). Die sogenannten Schwannzellen, als Gliazellen des PNS, übernehmen neben strukturierenden und stützenden Funktionen eine maßgebliche Funktion bei Transportvorgängen und der Homöostase der Nervenzellen (Maurel et al. 2007). Sie umgeben je nach Differenzierung stützend die Somata der sensorischen Neurone in den Ganglien oder bilden eine isolierende Myelinscheide um die axonalen Fasern (Jessen und Mirsky 2005).

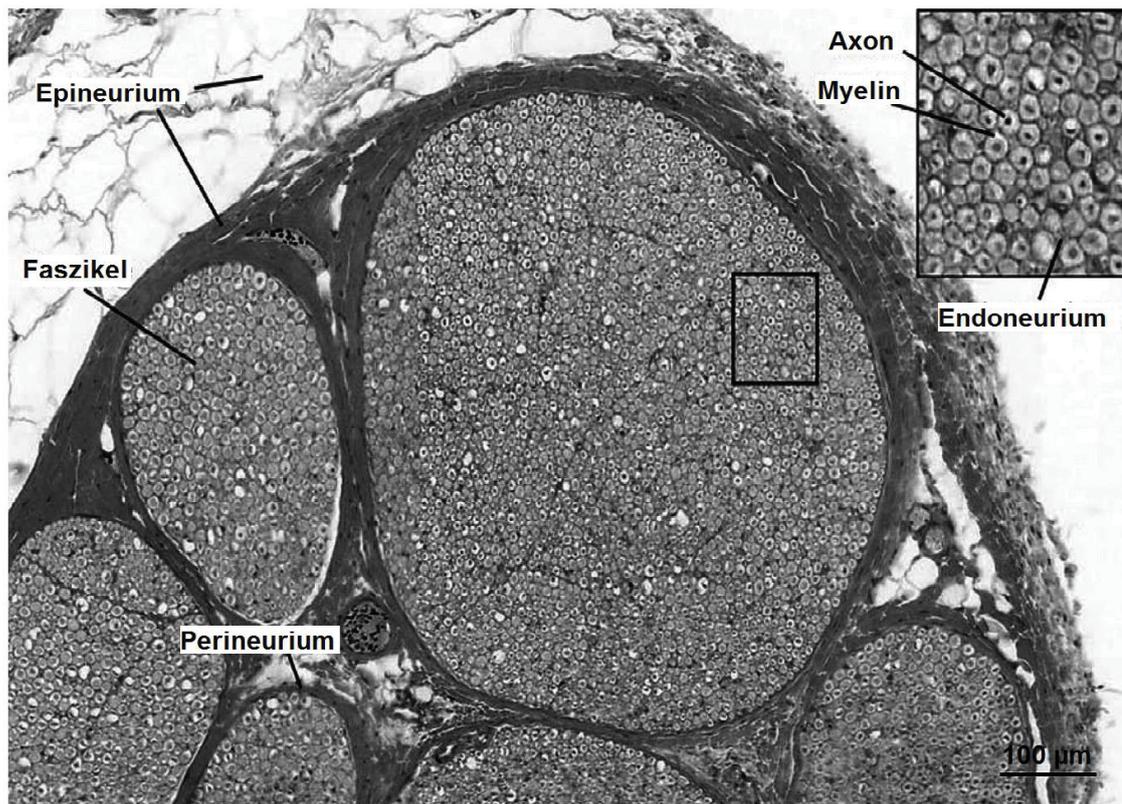


Abb. 1 Die Organisation des peripheren Nerven

Die Abbildung zeigt den Querschnitt eines peripheren Nerven. Die Nervenfasern werden vom Endoneurium umgeben, vom Perineurium zu Faszikeln organisiert und diese durch das Epineurium als Nerv zusammengefasst. Ein Ausschnitt wurde zur Detailansicht vergrößert. Abbildung übersetzt und modifiziert aus Campbell et al. 2013.

1.1.3 Die Schwann'schen Zellen

Die Schwannzellen, benannt nach ihrem Entdecker Theodor Schwann (1810-1882), umhüllen die Nervenzellfortsätze im PNS, was unter anderem der elektrischen Isolierung und der Homöostaseregulation dient (Hassan und Lieberman 1988, Sonig et al. 2014). Die Einheit aus Axon und zugehörigen Schwannzellen wird Nervenfasern genannt.

Eine Schwannzelle kann ein Axon einfach umgeben (marklose Faser) oder multilamellär umwickelt eine sogenannte Myelinscheide bilden (markhaltige Faser). In nicht-myelinisierenden Nervenfasern können mehrere parallel verlaufende Axonabschnitte durch eine Schwannzelle umhüllt werden, wohingegen sich die Schwannzellen einer markhaltigen Faser immer nur um ein Axon legen (Kidd et al. 2013). Nach postpartaler Induktion der Myelinisierung legt sich eine Schwannzelle um den Axonabschnitt (Jessen und Mirsky 2005). An jener Stelle an der sich ihre Vorwölbungen nach dem Umschließen des Axons treffen, entsteht das sogenannte Mesaxon, das sich anschließend um das Axon wickelt. Es entstehen bis zu 100 Schichten Zellmembran, die das Axon eng umschließen. Dabei wird das Zytoplasma zwischen den Membranschichten auf schmale Zytoplasmabrücken reduziert, die mikroskopisch als Schmidt-Lantermann-Einkerbungen imponieren. Über diese Zytoplasmabrücken steht die Myelinschicht weiterhin in Verbindung mit dem Zellkern, so dass Stoffaustausch- und Regenerationsvorgänge über zytoplasmatische Transportvorgänge möglich sind (Buchthal et al. 1987).

Eine Schwannzelle umhüllt ein Axon auf einer Strecke von 0,2 bis 1,5 mm, so dass eine Nervenfasern entlang ihrem Verlauf von zahlreichen aneinandergereihten Zellen umgeben wird (Dekker et al. 2014). Die Unterbrechung der Myelinscheide zwischen zwei angrenzenden Schwannzellen wird Nodium oder auch Ranvier'scher Schnürring genannt (Caldwell et al. 2000). Der Faserabschnitt einer Schwannzelle wird durch zwei Nodien begrenzt und daher Internodium genannt.

1.1.4 Die Erregungsleitung

Bei Erregung einer myelinisierten Nervenfaser ist diese durch die Membranschichten der Schwannzellen entlang des Internodiums elektrisch isoliert. An den Nodien kommt es dagegen zum Einstrom von Natrium, so dass sich die Depolarisation über das angrenzende Internodium bis zum nächsten Ranvier'schen Schnürring ausbreitet (Sedava 2011). Diese sprunghafte Weiterleitung des Aktionspotenzials von Schnürring zu Schnürring wird saltatorische Erregungsleitung genannt und ist um ein vielfaches schneller als eine kontinuierliche Erregungsleitung ohne Myelinschicht (Cragg und Thomas 1957). Weitere beschleunigende Faktoren für die Nervenleitgeschwindigkeit sind ein großer Faserdurchmesser und lange Internodien (Sanders und Whitteridge 1946). Folglich ist für eine effektive Reizweiterleitung der Aufbau der Myelinschicht von höchster physiologischer Relevanz.

1.1.5 Nervenschädigung- und -regeneration

Durch mechanische, thermische oder chemisch-toxische Schädigung kann es zur Durchtrennung eines Axons oder eines ganzen Nerven kommen. Eine Schädigung unterbricht die elektrophysiologische Weiterleitung. Im Gegensatz zum ZNS hat das PNS allerdings das Potential zur Regeneration. Für die Einteilung der Schädigungen peripherer Nerven unterscheidet man nach Seddon (1943) drei Typen. Die komplette Durchtrennung des Nerven (Neurotmesis), die isolierte Durchtrennung der Nervenfasern mit Erhalt der Hüllstrukturen (Axonotmesis) und die unvollständige Schädigung mit Erhalt des Axons (Neurapraxie). Die Neurotmesis zieht eine Reaktion mit Degeneration des distalen Axons und seiner Myelinschicht nach sich, die sogenannte Waller'sche Degeneration (Abercrombie und Johnson 1946). Eine Regeneration des Nerven ist auf Erhalt oder Wiederherstellung der Kontinuität des Epineuriums angewiesen und oft unvollständig. Nach Axonotmesis erfolgt ebenfalls die Waller'sche Degeneration der distalen Axone, doch das proximale Axon kann entlang der bestehenden Hüllstrukturen erneut nach distal auswachsen. Meist ist eine vollständige Regeneration möglich. Bei der Neurapraxie bleibt das Axon unbeschädigt. Die Regeneration der beschädigten Myelinscheiden erfolgt rasch und in der Regel vollständig (Sunderland 1951).

1.2. Die Myelinschicht

1.2.1 Zusammensetzung und Homöostase

Die Myelinschicht besteht aus Schichten von Zellmembran. Der Grundbaustein dieser Zellmembranen ist die Lipiddoppelschicht mit darin verankerten Proteinen (Sedava 2011). Die beiden Komponenten bilden in ihrer Mehrfachsichtung als Myelin eine hoch spezialisierte Einheit für die Struktur und Homöostase der Myelinschicht. Der Aufbau der Myelinschicht wird dabei durch verschiedenste Faktoren beeinflusst. Die Interaktion zwischen Axon und Schwannzelle scheint eine besondere Rolle in der Differenzierung der Schwannzellen einzunehmen (Maurel et al. 2007). Der direkte Kontakt zwischen Axon und Schwannzelle entlang des Internodiums ist von großer Bedeutung, wie Untersuchungen mit Adhäsionsmolekülen nahelegen (Maurel et al. 2007). Vertreter der Familie der Nektin-ähnlichen Proteine werden jeweils von Axon und Schwannzelle gebildet und stellen im periaxonalen Raum Kontakt her. Ihre Abwesenheit hingegen hemmt die Schwannzellendifferenzierung und damit die Myelinbildung (Koticha et al. 2006). Ein weiterer Beleg für die Wichtigkeit der Wechselbeziehung von Axon und Schwannzelle zeigt ein Blick auf die Expression von Transkriptionsfaktoren. Durchtrennt man das Axon einer myelinisierten Faser, verändert sich auch das Expressionsmuster der umhüllenden Schwannzellen maßgeblich. So werden Transkriptionsfaktoren wie *suppressed cAMP-inducible POU* (SCIP) nach Axonotomie stark vermindert nachgewiesen (Scherer et al. 1994). Die experimentelle Demyelinisierung von Axonen resultierte dagegen in einer Abnahme des Axondurchmessers, was auf eine trophische Rolle der Schwannzellen bezüglich des Axon hinweist (Smith et al. 2013). Dieses sich wechselseitig beeinflussende System steht seinerseits wiederum im Kontakt mit dem umgebenden Bindegewebe und den Komponenten der Immunabwehr.

Matrix-Metalloproteasen (MMPs), insbesondere MMP-2 und MMP-9 werden als inaktive Proenzyme synthetisiert und in den Extrazellulärraum sezerniert. Dort werden diese Proenzyme zu funktionsfähigen Proteasen aktiviert. Folglich ist die MMP-Aktivität auch von den Gewebsproteasen abhängig, die MMPs zu aktiven Enzymen umwandeln (Schoser und Blottner 1999). MMP-2 und MMP-9 bilden innerhalb der MMPs die Gruppe der Gelatinasen. Die Besonderheit der Gelatinasen stellt eine

fibronektinähnliche Domäne dar, die zur Bindung und Spaltung von Kollagen, Gelatin und Elastin dient (Lindberg et al. 2001). Bekanntermaßen spielen MMP-2 und MMP-9 bei inflammatorischen, demyelinisierenden Erkrankungen des peripheren Nervensystems eine Rolle (Kieseier et al. 1998, Kieseier et al. 1999).

Eine Hemmung von MMPs führt zu einer Steigerung der Mitoserate von Schwannzellen bei Remyelinisierungsprozessen (Liu et al. 2010). Nach chemischer Inhibition der MMPs *in vitro* ließen sich verminderte Internodallängen und eine erhöhte Variabilität der Myelindicke nachweisen (Lehmann et al. 2009). Die Aktivität der MMPs ist demnach an der Regulation von Differenzierungsprozessen der Schwannzellen und der Aufbau der Myelinschicht beteiligt (Kim et al. 2012).

1.2.2 Der Ranvier'sche Schnürring

Die Ranvier'sche Schnürringe sind hochspezialisierte Bereiche mit spezifischen Kanal- und Verankerungsproteinen, die sich in ihrem Aufbau grundlegend von den myelinisierten Internodien unterscheiden (Abb. 2). Das Nodium verfügt über eine hohe Dichte an Natriumkanälen mit der genauen Bezeichnung Nav1.6 (Caldwell et al. 2000, Amor et al. 2014). Diese sind durch ankyrinG in der Axonmembran verankert (Kordeli et al. 1995). Die äußerste Schicht der angrenzenden Myelinschicht reicht mit ihren Membranausstülpungen, den Mikrovilli, bis auf das Nodium, ohne dies jedoch elektrisch zu isolieren (Trapp et al. 1989). Der angrenzende Bereich entlang des Axons wird als Paranodium bezeichnet. Hier legen sich die seitlichen Enden der Myelinschichten auf das Axon und sind mit diesem verankert. Für diese Verankerung werden zwei Proteine verantwortlich gemacht. Das Protein Caspr durchspannt als Transmembranprotein die axonale Membran und steht mit dem axonalen Zytoskelett in Verbindung (Einheber et al. 1997). Als Heterodimer bildet es mit Contactin eine funktionelle Einheit zur Verankerung von Schwannzellmembran und Axon (Rios et al. 2000). Auf Seite der Schwannzellen sind die paranodalen Membranschleifen mit Neurofascin 155 (NF155) ausgestattet, das vermutlich mit Contactin interagiert. Caspr moduliert diese Verbindung (Gollan et al. 2003). An das Paranodium angrenzend ist das Axon wiederum mit speziellen Kanälen und Verankerungsproteinen versehen. Dieser Bereich wird als Juxtaparanodium bezeichnet. Die Untereinheiten der Kaliumkanäle

Kv1.1 und Kv1.2 und ihre Untereinheit Kvbeta2 fügen sich hier in verschiedenen Konfigurationen als Tetramere zu den funktionellen Kanälen zusammen (Hopkins et al. 1994). Dabei werden sie von Caspr2 stabilisiert, ein Verankerungsprotein, das dem paranodalen Caspr sehr ähnlich ist (Poliak et al. 1999).

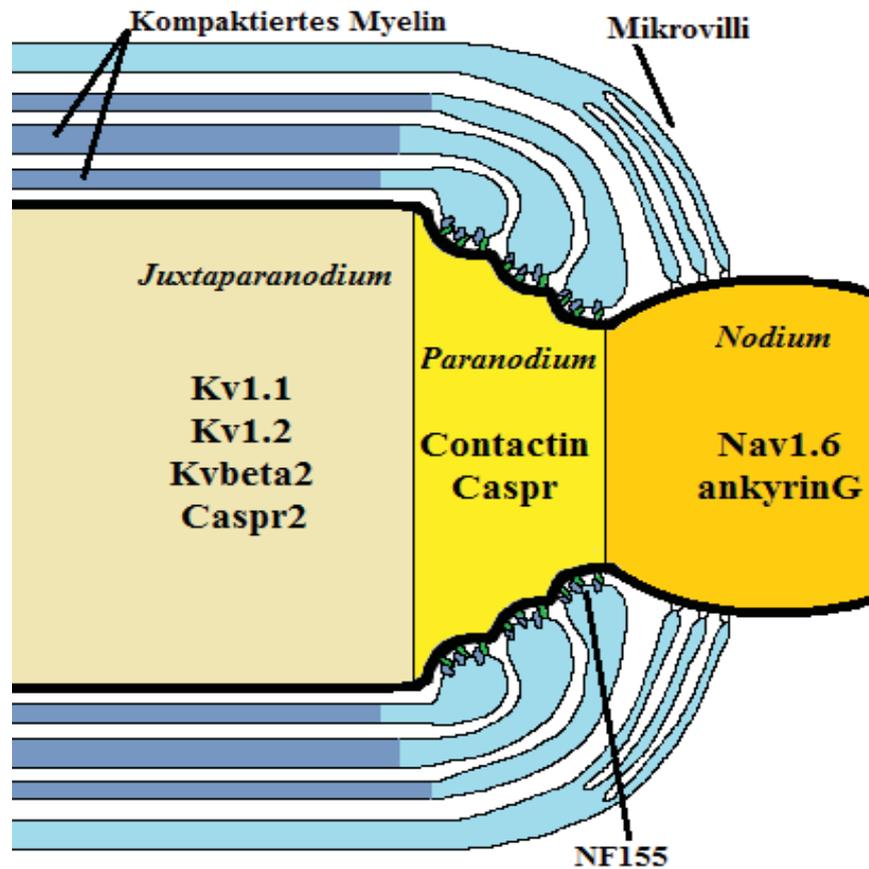


Abb. 2 Aufbau und Unterteilung des Ranvier'schen Schnürrings

Dargestellt ist der Übergang des Internodium zum Nodium. Die Einteilung in Nodium, Paranodium und Juxtaparanodium ist farblich hervorgehoben. Im jeweiligen Abschnitt sind die wichtigsten Struktur- oder Kanalproteine aufgelistet. Grafik modifiziert nach Scherer und Arroyo 2002.

1.2.3 Die Lipide des Myelins

Der Lipidanteil des peripheren Myelins ist mit etwa 70%, im Vergleich zu anderen Biomembranen des Körpers, außergewöhnlich hoch (Chrast et al. 2011). Die Schwannzellmembran der Myelinschicht zeichnet sich durch einen hohen Anteil an Galacto-, Sphingo- und Glycolipiden, Plasmalogenen und gesättigten langkettigen Fettsäuren aus. Der hohe Lipidanteil liegt auch in der Anwesenheit eines Membranproteins, des basischen Myelinproteins (MBP), begründet. Eine Ursache für den hohen Lipidanteil der Myelinmembranen liegt in der Funktion des MBP. Das Membranprotein verhindert im Sinne einer abschirmenden Filterfunktion den Einbau von Proteinen mit langen zytoplasmatischen Domänen in die Myelinmembran, wodurch sich unter dieser Abschirmung vermehrt lipidreiche Felder organisieren (Aggarwal et al. 2011). Darüber hinaus ist, im Vergleich zu anderen Biomembranen, speziell der Anteil an Cholesterin innerhalb der Lipidkomponente des Myelins deutlich erhöht (Rawlins et al. 1972).

Cholesterin spielt bei einer Reihe von Mechanismen im Zusammenhang der Myelinisierung von Nervenfasern eine grundlegende Rolle. Während der Myelinsynthese müssen große Mengen von Cholesterin synthetisiert werden und in die wachsende Membranschicht eingebaut werden. So richtet sich der Aufbau der Myelinschicht in seiner Geschwindigkeit nach dem Cholesterineinbau. Dieser Prozess scheint als „Nadelöhr“ den Ablauf der Myelinsynthese zu limitieren (Saher et al. 2005). Des Weiteren ist bekannt, dass Cholesterin die Membranfluidität beeinflusst (Cooper 1978). Als Bestandteil in sogenannten *lipid rafts* scheint es für Signaltransduktion und Membraninteraktionen funktionelle Bedeutung zu haben (Vinson et al. 2003). Diese Inseln innerhalb der Membran weisen eine spezialisierte Lipidzusammensetzung auf und verfügen über einen erhöhten Cholesterinanteil. Im Zusammenhang mit Erkrankungen des Nervensystems wird den *lipid rafts* und damit auch der Lipidzusammensetzung des Myelins eine herausragende Rolle zugeschrieben (Asakura et al. 2015). Auch für das Ausschleusen des Myelinproteins Null (P0) aus dem Endoplasmatischen Retikulum ist Cholesterin von Nöten (Saher et al. 2009).

1.2.4 Die Proteine des Myelins

Die Proteinkomponente des peripheren Myelins macht etwa 30 % aus. Die Proteinzusammensetzung für das PNS ist spezifisch und unterscheidet sich von der des ZNS in Bestandteilen und Mengenverhältnissen (Greenfield et al. 1973). In die Lipidschicht der Membran eingebettet übernehmen die Myelinproteine spezialisierte Funktionen für den Aufbau und die Funktionalität des Myelins.

Im Folgenden soll auf die Hauptmyelinproteine P0, MBP, Myelin-assoziiertes Glykoprotein (MAG), Peripheres Myelinprotein 22 (PMP-22), Proteolipid-Protein (PLP) und Myelinprotein 2 (P2) eingegangen werden (Abb. 3).

Das quantitativ dominierende Protein im PNS ist P0 (Roomi et al. 1978, Lemke und Axel 1985). Als Transmembranprotein bildet es Tetramere und interagiert mit den benachbarten Membranen. Hierbei unterstützt P0 die Adhäsion der beiden zytoplasmatischen Seiten einer Myelinlamelle, wie auch deren Kontakt mit der darüber oder darunterliegenden Myelinlamelle. So nimmt es Einfluss auf die Dichte der Membranschichten des Myelins und die Formation der Schmidt-Lantermann-Einkerbungen (Lemke und Axel 1985, Yin et al. 2015).

Auch MBP spielt eine wesentliche Rolle bei der Myelinkompaktierung. Durch seine Position auf der zytosolischen Seite und eine starke Bindungsaffinität zur Membran, verdichtet es die beiden zytoplasmatischen Membranblätter, also die *major dense line* (Martini et al. 1995). Diese Linie markiert die anliegenden zytoplasmatischen Seiten der Schwannzellmembran. Es wird angenommen, dass hier Prozesse der posttranslationalen Modifizierung stattfinden - gerade MBP wird hier eine modulierende Rolle auf eine Vielzahl von Signalwegen zugeschrieben (Harauz et al. 2009).

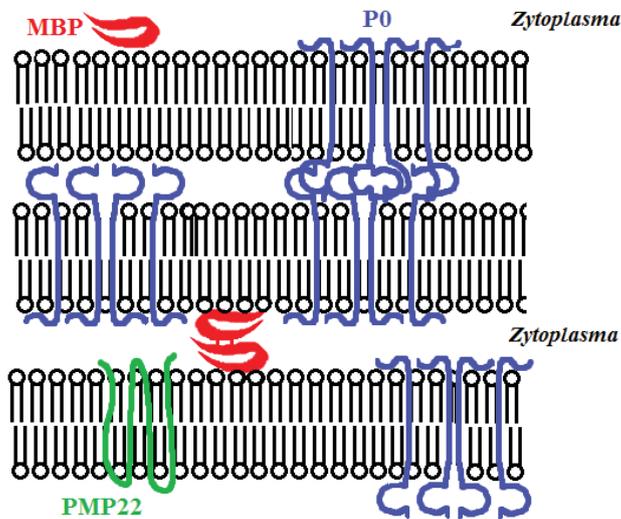
MAG findet sich besonders auf der innersten, adaxonalen Schwannzellmembran. Es wird angenommen, dass MAG im direkten Kontakt mit dem Axon steht und dessen zytoskelettalen Aufbau unterstützt. Untersuchungen an MAG-defizienten Nervenpräparaten der Maus haben gezeigt, dass die MAG-Defizienz mit kleineren Axondurchmessern und einem erhöhten Anteil an degenerativ verändertem Myelin einhergeht (Yin et al. 1998).

PMP-22 spielt als Myelinprotein im PNS eine Rolle im Zusammenhang mit *tight junctions*-Zellkontakten der Myelinschicht, unter anderem am Paranodium (Snipes et al.

1992). Durch Ausschalten des PMP-22-Gens reduzierte sich im Mausmodell die Kontaktfähigkeit der *tight junctions*, infolgedessen ließ sich eine reduzierte Nervenleitgeschwindigkeit nachweisen (Guo et al. 2014). Über die Kompaktierung des Myelins, insbesondere in der Paranodalregion, unterstützt PMP-22 somit die Reizweiterleitung.

PLP ersetzt im ZNS weitgehend das Myelinprotein P0, so dass eine ähnliche Funktionalität vermutet werden kann (Yin et al. 2015). Im PNS liegt PLP vermehrt als Isoform DM-20 vor (Pham-Dinh et al. 1991), die genaue Funktion ist noch nicht abschließend geklärt. Patienten mit der Pelizaeus-Melzbacher-Erkrankung fehlt PLP, auf Grund einer missensen Mutation. Die führende Symptomatik dieser Patienten ist eine verlangsamte psychomotorische Entwicklung, ein Nystagmus, eine Optikusatrophie sowie Ataxie und Spastik aufgrund eines zentralen Myelinisierungsschadens (Hodes et al. 1993). Bei einer milderer Sonderform der Erkrankung, bei der die PLP/DM-20-Defizienz auf eine Punktmutation zurückzuführen ist, konnte darüber hinaus eine periphere demyelinisierende Neuropathie nachgewiesen werden, welche die Bedeutung von PLP im peripheren Myelin unterstreicht (Garbern et al. 1997).

Kompaktiertes Myelin



Unkompaktiertes Myelin

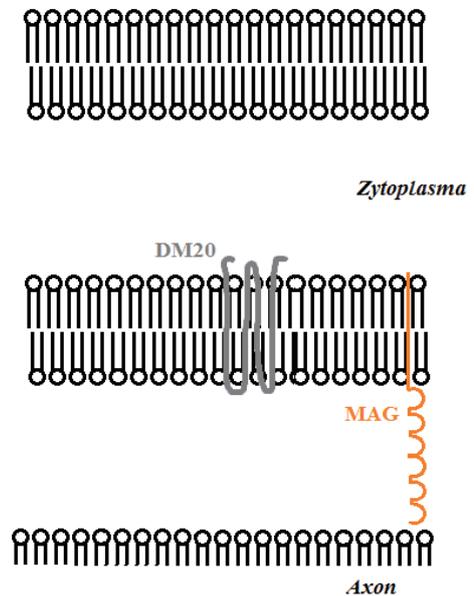


Abb. 3 Die Myelinproteine in kompaktiertem und unkompaktiertem Myelin

Die Abbildung zeigt die Lokalisation der Myelinproteine zu den Membranschichten in kompaktiertem und unkompaktiertem Myelin des peripheren Nervensystems. Protein Null (P0), basisches Myelinprotein (MBP), Peripheres Myelinprotein 22 (PMP-22), Myelin-assoziiertes Glykoprotein (MAG), Isoform des Proteolipid-Protein (PLP) DM-20. Abbildung modifiziert nach Scherer und Arroyo 2002.

1.3 Das Myelinprotein 2

1.3.1 Das P2-Gen

Das menschliche P2-Gen liegt auf Chromosom 8q21.3-q22.1 und hat eine Länge von etwa 8000 Basenpaaren (Hayasaka et al. 1993). 4 Exons kodieren für die 131 Aminosäuren des Proteins und werden durch 3 Introns unterschiedlicher Länge unterbrochen (Narayanan et al. 1991). Das P2-Gen unterscheidet sich in seinem Aufbau von den Genen der anderen Myelinproteine und ist hinsichtlich der Sequenzanalogie eher der Gruppe der fettsäurebindenden Proteine (*fatty acid binding proteins* – FABPs) zuzuordnen (Bharucha et al. 1993). In der 5'-Region finden sich mehrere positiv- wie auch negativ-regulatorische Abschnitte. Darunter eine TATA-Box, CAAT-Box, cAMP-Induktionssequenz und zwei AP-1 Bindungsstellen (Abb. 4).

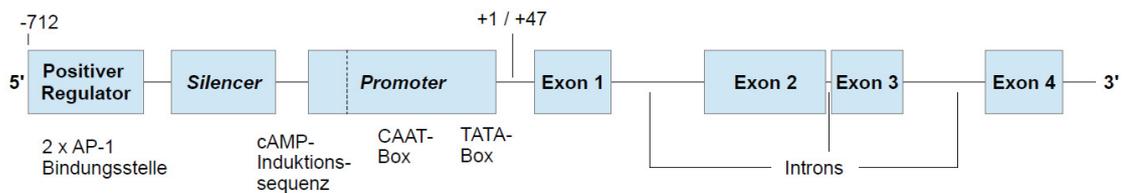


Abb. 4 Das P2-Gen und seine regulatorischen Abschnitte

Die Abbildung zeigt schematisch die Unterteilung des P2-Gens in regulatorische Abschnitte, Exons und Introns. Die Position der Sequenz zum Beginn des P2-Gens ist oberhalb angegeben. Unterhalb der Darstellung sind die jeweiligen Sequenzen der Regionen beschrieben. Abbildung nach Bharucha et al. 1993.

1.3.2 Struktur und Vorkommen von P2

Das humane P2 ist ein basisches Protein bestehend aus 131 Aminosäuren und einer Masse von 14,818 kD (Suzuki et al. 1982). Es verfügt über zwei stark positiv geladene Bereiche auf beiden Seiten eines negativ geladenen Mittelbereichs (Ruskamo et al. 2014). P2 macht bis zu 15 % des Proteinanteils im Myelin des PNS aus (Greenfield et al. 1973). Die P2-Expression variiert jedoch je nach Spezies, Teil des Nervensystems und sogar im Verlauf der einzelnen Nervenfasern im Nervenstrang (Kadlubowski et al. 1984). So finden sich innerhalb eines Nervs und selbst entlang eines Axons P2-exprimierende und P2-nichtexprimierende Internodien. In nur 5-30 % der myelinisierten Internodien kann P2 als Bestandteil der Myelinschicht gefunden werden (Trapp et al. 1979). Als integraler Bestandteil der zytoplasmatischen Seite der Schwannzellmembran wird P2 an der *major dense line* der Myelinscheiden exprimiert (Trapp et al. 1979, Majava et al. 2010). Auch strukturell lässt sich P2 der Gruppe der FABPs zuordnen (Uyemura et al. 1984). Mit seiner zylindrischen Form umschließt es eine Bindungsstelle für einen hydrophoben Liganden (Abb. 5) (Uyemura et al. 1984). Als bevorzugter Ligand wurde Cholesterin beschrieben (Majava et al. 2010).

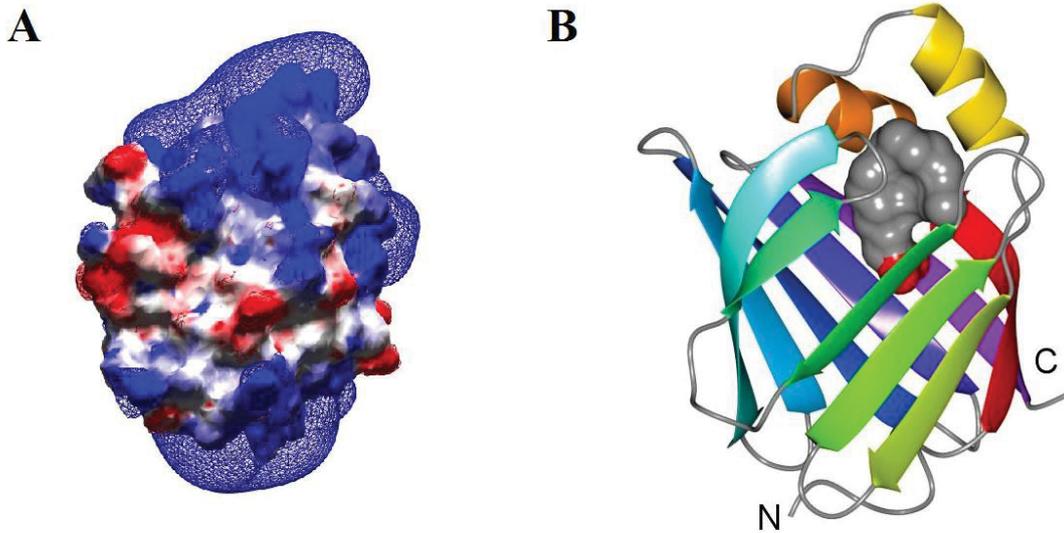


Abb. 5 Elektrostatistische Ladung und Struktur von P2

In (A) ist das elektrostatistische Potenzial von P2 veranschaulicht. Das Protein wurde mit seiner Solvens-zugänglichen Oberfläche dargestellt, darauf wurde als Netzdarstellung das elektrostatistische Potenzial visualisiert. Positive Ladung ist blau, negative Ladung rot dargestellt. (B) zeigt eine Darstellung der Tertiärstruktur des menschlichen P2. Die im inneren gebundene Fettsäure ist in Darstellung der Solvens-zugänglichen Oberfläche abgebildet. Abbildung aus Majava et al. 2010.

1.3.3 Theorien zur Funktion von P2

Untersuchungen zum elektrostatistischen Potential von P2 zeigten eine ausgeprägte positive Ladung an beiden Enden der Zylinderform. Dies ist bemerkenswert in Verbindung mit seinem Vorkommen an der *major dense line*. Die positive Ladung interagiert vermutlich mit dem negativ geladenen inneren Blatt der Myelinmembran (Majava et al. 2010). Als Bindeglied zwischen den zytoplasmatischen Membranblättern, könnte es als „molekularer Klebstoff“ zur Verdichtung der Myelinschicht beitragen – eine Funktion wie sie auch für MBP im ZNS beschrieben ist (Harauz et al. 2009). Insbesondere synergistisch mit MBP, scheint P2 diese Wirkung zu entfalten.

Als weitere Funktion von P2 wird eine Beteiligung an der Lipidhomöostase der Myelinmembran antizipiert. Es konnte gezeigt werden, dass P2 den Transfer von Fettsäuren zwischen Vesikeln und Membran vermittelt. Da sich im frühen Stadium der Myelinbildung für P2-defizientes Myelin eine unterschiedliche Lipidzusammensetzung zeigen ließ, scheint diese Funktion besonders beim initialen Aufbau der Myelinschicht von Bedeutung zu sein (Zenker et al. 2014).

1.3.4 P2 im Kontext demyelinisierender Neuropathien

Als tierexperimentelles Modell demyelinisierender Erkrankungen des PNS nutzte man schon früh die Immunreaktion auf eine Injektion von Bestandteilen des Nervensystems (Waksman und Adams 1955). Als verlässliches Antigen zur Auslösung dieser experimentellen autoimmunen Neuritis (EAN) wurde 1979 das Myelinprotein P2 ausgemacht (Kadlubowski und Hughes 1979).

Das Tiermodell der Autoimmunneuropathien, die EAN, bildet jedoch eher eine T-Zell-vermittelte Immunreaktion ab, inwieweit dieses Model die humane Immunpathogenese widerspiegelt ist fraglich. Bei entzündlichen Neuropathien des Menschen finden sich gehäuft Antikörper gegen P2, teilweise jedoch auch bei nicht erkrankten Untersuchungspersonen (Khalili-Shirazi et al. 1993). Dies betrifft vor allem Patienten mit Guillain-Barré-Syndrom (GBS) aber auch Patienten mit Chronisch inflammatorische demyelinisierender Polyneuropathie (CIDP) und verschiedenen anderen entzündlichen Neuropathien. Am häufigsten fanden sich Anti-P2-Antikörper bei Patienten mit GBS (Khalili-Shirazi et al. 1993). Wurden im Rahmen eines GBS Antikörper gegen P2 oder andere Myelinproteine wie PMP-22 oder P0 nachgewiesen, so verlief die Immunreaktion heftiger und das Heilungsergebnis der Patienten war schlechter (Makowska et al. 2008). Versuche der Desensibilisierung mittels Applikation von P2 vor der Induktion einer EAN an der Ratte, untersuchten die therapeutischen Optionen in Bezug auf P2 im Kontext der demyelinisierenden Neuropathien. Durch vorrausgehende orale Zufuhr von P2 ließ sich eine EAN durch Injektion von P2 nicht mehr auslösen - ein oraler Toleranzeffekt, der sich für vergleichbare Versuche mit anderen auslösenden Agenzien in dieser Stärke nur in Kombination mit Adjuvantien nachweisen ließ (Gaupp et al. 1997, Jung et al. 2001).

2 Fragestellung

Die Rolle von P2 beim Prozess der Myelinbildung und -regeneration ist noch weitgehend unbekannt. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Bestimmung der funktionellen Bedeutung von P2 beim Prozess der Myelinisierung als auch Remyelinisierung *in vitro* wie auch *ex vivo*, basierend auf dem Vergleich einer P2-defizienten Mauslinie mit Wildtyp-Tieren.

3 Material und Methoden

3.1 Generierung der transgenen Linie

Alle Tierversuche wurden vom Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz genehmigt (Aktenzeichen: 84-02.04.2012.A165) und gemäß den Richtlinien für Versuchstierkunde durchgeführt. Die Fachkunde auf dem Gebiet der Versuchstierkunde gem. § 9 des geltenden Tierschutzgesetzes, wurde durch erfolgreiche Teilnahme am FELASA-zertifizierten Kurs der Tierversuchsanlage des Universitätsklinikums Düsseldorf erworben.

Die transgene Mauslinie wurde durch die kollaborierende Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Roland Chrast aus Lausanne, Schweiz, generiert und zur weiteren Zucht in der Tierversuchsanlage in die HHU in Düsseldorf eingeführt.

Die P2-Knockout-Versuchstiere basieren auf der Black 6 Mauslinie C57BL/6NTac. Die P2-Gen-defizienten Stammzellen wurden von Regneron, INC (<http://www.velocigene.com/komp/detail/10878>) hergestellt. Im Rahmen des *Knockout Mouse Project* der Universität von Kalifornien in Davis (www.komp.org) wurden diese in die Mauslinie eingeführt. Alle 4 codierenden Exons von P2 wurden durch lacZ und eine Neomycinkassette ersetzt. Die Neomycinkassette wurde durch lox-P-Sequenzen flankiert. Durch Kreuzung mit der nestin-Cre-Maus wurde das Gen durch das Cre-Enzym an den lox-P-Sequenzen eliminiert, wodurch die Pmp2DEx1-4/DEx1-4-Linie entstand, im Weiteren als P2 -/- bezeichnet. Zur Überprüfung des Knockout-Erfolges durch Genotypisierung fanden folgende Primer Verwendung:

Tabelle 1: Primer zur Genotypisierung der P2 -/- Mauslinie

F	5'-TATAGAAGGGCTTAAGCATG-3'
R-WT	5'-CAGAACAAAGTCTCCACCACAC-3'
R-lacZ	5'-GTCTGTCCTAGCTTCCTCACTG-3'

3.2 Myelinisierende DRG-Schwanzzell-Co-Kulturen

3.1.1 Grundlagen

Zur Untersuchung der primären Ausbildung der Myelinscheiden *ex vivo*, eignet sich das Mausmodell der DRG-Schwanzzell-Co-Kultur, im weiteren Verlauf nur DRG-Kultur genannt (Stettner et al. 2013). Die Kulturen beinhalten Neurone der Spinalganglien (*dorsal root ganglia* - DRG) und Schwanzzellen. Dafür wurden Tiere aus der P2 -/- Linie verpaart und 14 Tage nach Konzeption die E14 Embryonen präpariert. Zu diesem Zeitpunkt setzt die Myelinisierung des embryonalen PNS ein, ist jedoch noch nicht abgeschlossen und die Mäuseembryonen sind groß genug für die Präparation.

3.1.2 Präparation

Nach Tötung der tragenden Muttertiere durch zervikale Dislokation, wurde das Tier auf dem Präparationstisch fixiert und mit 70 % Ethanol benetzt. Nach Eröffnung der Bauchhöhle mit der Präparationsschere wurde der Uterusschlauch entfernt und in eine Petrischale mit L-15 Leibovitz Flüssigmedium (L-15 Leibovitz, Invitrogen Corp., CA, USA) überführt. Der Uterusschlauch wurde eröffnet, die 14 Tage alten Embryonen (E14) aus den Eihäuten präpariert und mit der Schere dekapitiert.

Die Präparation der embryonalen DRGs erfolgte nach Fixation der Embryos in der Präparierschale von dorsal. Unter dem Stereomikroskop wurden Haut und Weichteile mit der Mikropinzette nach lateral abgeschoben und mit Pins fixiert. Da die Wirbelbögen der E14 Tiere dorsal noch nicht geschlossen sind, konnte das Rückenmark direkt mit den Pinzetten mobilisiert und entfernt werden. Bilateral der Wirbelsäulenanlage wurden die DRGs mit einer Pinzette gefasst und in eine Petrischale mit L-15 Leibowitz Flüssigmedium überführt. Die Petrischalen mit den präparierten DRGs wurden ebenso wie die Petrischalen mit den Embryonen auf Eis gelagert, um autolytische Veränderungen während des Präparationsvorgangs zu verlangsamen.

3.2.3 Anlegen der Zellkulturen

Um ein Anwachsen des Zellrasens am Grund der 24-Well-Zellkulturplatten (Greiner Bio-One AG, Frickenhausen, Deutschland) zu gewährleisten, wurden diese mit Kollagen Typ I (Becton Dickinson AG, New Jersey, USA) beschichtet. Dazu wurde die Kollagenlösung 1:6 in Essigsäure 0,02 N gelöst und jede Kavität zweimalig mit 30 µl der Lösung gleichmäßig benetzt und anschließend unter der sterilen Werkbank getrocknet. In die Zellkulturplatten, die für eine spätere Immunzytochemie vorgesehen waren wurden vor der Kollagenbeschichtung passende Deckgläschen eingelegt.

Das für die Initialphase der Zellkultur benötigte Neurobasalmedium wurde vorbereitet (Tabelle 2).

Tabelle 2: Zusammensetzung des Neurobasalmediums

Materialien	Konzentration	Firma	Ort
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)		BioWhittaker, Lonza AG	Basel, Switzerland
Pferdeserum (<i>horse serum</i> - HS)	5 %	Invitrogen, Corp.	Carlsbad, CA, USA
L-Glutamin	2 mM	Invitrogen Corp.	Carlsbad, CA, USA
Penicillin-Streptomycin	100 U/ml	Invitrogen Corp.	Carlsbad, CA, USA
Glukose	4 g/l	Sigma-Aldrich Corp.	MO, USA
Nervenwachstumsfaktor (<i>nerve growth factor</i> - NGF)	100 ng/ml	Sigma-Aldrich Corp.	MO, USA

Die bei der Präparation entnommenen DRGs wurden in Leibowitz Mediums aus den Petrischalen in 15 ml-Falcons überführt. Nach Zentrifugation wurde das überstehende Medium abgesaugt und die sedimentierten DRG-*Pellets* in Neurobasalmedium resuspendiert. Die Suspension wurde auf die beschichteten Zellkulturplatten verteilt. Als Kontrolle wurden Wildtyp-Kulturen angelegt.

3.2.4 Kultivieren der DRG-Kulturen

Die Zellkulturplatten wurden bei 36 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Nach 7 Tagen auf Neurobasalmedium wurde zu Myelinisierungsmedium gewechselt (Tabelle 3).

Tabelle 3: Zusammensetzung des Myelinisierungsmediums

Materialien	Konzentration	Firma	Ort
Minimum Essential Medium (MEM)		BioWhittaker, Lonza AG	Basel, Switzerland
L-Glutamin	2 mM	Invitrogen Corp.	Carlsbad, CA, USA
Pferdeserum (HS)	5 %	Invitrogen Corp.	Carlsbad, CA, USA
Penicillin-Streptomycin	100 U/ml	Invitrogen Corp.	Carlsbad, CA, USA
Glukose	4 g/l	Sigma-Aldrich Corp.	MO, USA
NGF	50 ng/ml	Sigma-Aldrich Corp.	MO, USA
N2 Supplement	1 %	Invitrogen Corp.	Carlsbad, CA, USA
Bovines Hypophysenextrakt (<i>pituitary extract bovine</i> - PEB)	20 µg/ml	Sigma-Aldrich Corp.	MO, USA

Dazu wurden dem Medium vor jedem Mediumswechsel frisch 50 mg/l L-Ascorbinsäure (AA, Sigma-Aldrich Corp., Missouri, USA) und Forskolin in einer Endkonzentration von 0,5 µM (FKL, Sigma-Aldrich Corp., Missouri, USA) zugegeben. Der Wechsel des Kulturmediums erfolgte alle 3-4 Tage.

3.2.5 De- und Remyelinisierung

Um den Prozess der De- und Remyelinisierung *in vitro* untersuchen zu können, wurde eine von Zhu und Glaser beschriebene Methode herangezogen (Zhu und Glaser 2008). Die Zugabe von 20 µl Forskolin pro ml Kulturmedium induzierte den Prozess der Demyelinisierung. Nach 4 Tagen wurden die Kulturen mit phosphatgepufferter Salzlösung (*phosphate buffered saline* - PBS) gewaschen und Myelinisierungsmedium

zugegeben. Unter der normalen Forskolinkonzentration von 0,5 μM beginnt die erneute Myelinisierung der Kultur. Nach 4 oder 8 Tagen der Remyelinisierung erfolgte die Fixation der Kulturen.

3.3 Fluoreszierende Fettsäuren

Um in der vitalen Zellkultur den Verlauf der Myelinbildung zu untersuchen und geeignete Zeitpunkte zur Fixation der Kulturen zu detektieren, verwendeten wir fluoreszenzmarkierte C16-Fettsäuren (BODIPY® FL, C16, Invi-trogen Corp, Carlsbad, CA, USA). Diese wurden 24 Stunden in einer Konzentration von 1:1000 dem Kulturmedium zugefügt. Als biologische Fettsäuren nehmen sie am Membranstoffwechsel der Schwanzzellen teil und inkorporieren sich in der multilamellären Membranschicht der Myelinscheiden. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Kulturen mikroskopiert. Bei 488 nm zeigte sich unter dem Fluoreszenzmikroskop (Nikon Eclipse TE-200, Nikon, Tokyo, Japan) das Myelin im grünen Fluoreszenzkanal.

3.4 Sudanschwarzfärbung

Zur exakten Quantifizierung der Myelinmenge färbten wir die Kulturen mit Sudanschwarz. Nach dem Waschen der Kulturen mit PBS erfolgte die Fixation über eine Stunde mit 4 % Paraformaldehyd (PFA). Nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBS wurden diese mit 0,1 % Osmiumtetroxid (Sigma–Aldrich corp., St. Louis, Missouri, USA) für eine Stunde behandelt. Nach Dehydrierung mittels einer Ethanol-Verdünnungsreihe (25 %, 50 %, 70 % für jeweils 5 min), erfolgte die Färbung der Kulturen für eine Stunde mit 0,5 % Sudanschwarz (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA) gelöst in 70 % Ethanol. Im Anschluss erfolgte die Rehydrierung durch Durchlaufen der Verdünnungsreihe in absteigender Konzentration (70 %, 50 %, 25 % für jeweils 2 min) und anschließend wurde der Zellrasen mit PBS bedeckt. Durch die Färbung stellen sich die Myelinscheiden schwarz dar. Die gefärbten Kulturen wurden mittels Lichtmikroskopie in 100 x Vergrößerung vollständig digital fotografisch erfasst. Repräsentative Bereiche fotografierten wir zusätzlich in 400 x Vergrößerung.

Mit Hilfe des Softwareprogramms Image J (<http://imagej.nih.gov/ij/>), konnten die Bilder jedes *wells* in 100 x Vergrößerung hinsichtlich der Anzahl der Nervenzellkerne und der myelinisierten Internodien ausgezählt werden. Mit der *CellCounter*-Funktion wurde jedes Soma und jedes Internodium markiert. Das Verhältnis der Internodien pro Neuron wurde als relativer Wert für die Myelinmenge angenommen und die Ergebnisse der P2-defizienten und Wildtyp-Kulturen in Vergleich gesetzt.

3.5 Immunzytochemie

Die Kulturen wurden initial zweimalig mit PBS gewaschen und anschließend für 30 min mit 4 % PFA fixiert. Es folgte für eine Stunde bei Raumtemperatur die Behandlung mit Blockierungslösung bestehend aus PBS, 10 % Normales Ziegen Serum (NGS; Vector Laboratories Inc., CA, USA) und 0,5 % Triton X100. Die Primärantikörper wurden je nach Versuchsansatz gewählt und in PBS mit 10 % NGS und 0,1 % Triton X100 in entsprechender Konzentration gelöst (Tabelle 4). Die Inkubation der Kulturen mit der Primärantikörperlösung erfolgte über Nacht. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Sekundärantikörper (Anti-Rabbit IgG, Alexa Fluor 594, PAb goat, Invitrogen Corp., CA, USA und Anti-Mouse IgG Alexa Fluor 488, PAb goat, Invitrogen Corp., CA, USA) 1:400 in PBS verdünnt und für eine Stunde bei Raumtemperatur zum Inkubieren auf die Kulturen gegeben. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBS wurde die Kulturen mit dem *mounting medium* 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) Vectashield (Vector Laboratories Inc., CA, USA) eingedeckelt. Im Anschluss wurden die Präparate mit dem Fluoreszenzmikroskop oder durch Konfokalmikroskopie mikroskopiert und fotografiert.

Tabelle 4: Primärantikörper der Immunzytochemie

Epitop	Klon	Spezies	Endverd ünnung	Firma/Katalognummer
P2	polyklonal	Kaninchen	1:100	ProteinTech Group, Inc , Manchester, UK/ 12717-1-AP
MBP	SMI 94	Maus	1:500	ProteinTech Group, Inc , Manchester, UK / SMI-94R
Neurofilament	polyklonal	Kaninchen	1:400	Merck Millipore GmbH, Darmstadt, DE / AB9568
Caspr	K65/35	Ratte	1:100	UC Davis/NIH NeuroMab Facility, Davis, USA / 75-001

3.6 Polymerase-Kettenreaktion

Zur Quantifizierung der Synthese der *messenger* Ribonukleinsäure (RNA) wurde die Methode der *Real-Time-Quantitative* Polymerase-Kettenreaktion (RT-Q-PCR) verwendet.

Die Kulturen wurden zweimalig mit PBS gewaschen und mit RLT-Puffer (Buffer RLT, Qiagen, Hilden, Germany), versetzt mit 1 % β -Mercaptoethanol (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA) lysiert.

Die zelluläre RNA wurde mit Hilfe des RNeasy Mini Kit von Qiagen (Qiagen, Hilden, Germany) extrahiert und mit NanoDrop 1000 (PEQLAB, Erlangen, Germany) quantifiziert. Aus 500 ng der RNA wurden unter Verwendung des Taq-Man Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) dem Protokoll entsprechend die cDNA synthetisiert. Diese wurde mit den Primern, SYBR-Green TaqMan Universal PCR Mastermix in den Thermocycler (AbiPrism7000, Foster City, CA, USA) gegeben. Der Temperaturverlauf war auf 2 min bei 50 °C, 10 min bei 95 °C und 40 Zyklen mit 95 °C für 15 s und eine Minute bei 60 °C festgelegt. Es wurden Primerpaare für MBP (Ko, Kinkel et al. 2010), SIRT (Wang, Sengupta et al. 2008) und zwei verschiedene Primerpaare für P0 mittels der Roche Universal ProbeLibrary designt (www.UniversalProbeLibrary.com). Zur Korrelation wurde das *Houskeeping*-Gen GAPDH verwendet (Tabelle 5).

Tabelle 5: Eingesetzte Primer für die RT-Q-PCR

Gen	S/AS	Sequenz
MBP	S	5'-AGCCGAGGTCCCATTGTT-3'
MBP	AS	5'-CCTCAGAGGACAGTGATGTGTTT-3'
SIRT	S	5'-CAATCCTAGCCCCTCAGAAA-3'
SIRT	AS	5'-AAAGTGCTGGAATTCAGGTG-3'
P0 (1)	S	5'-GCAAAGGCCCAGAGTGTCT-3'
P0 (1)	AS	5'-TGTTGGTAGCAGTGGCTGTG-3'
P0 (2)	S	5'-TTTCCCTGTCCGTGTAACC-3'
P0 (2)	AS	5'-GCTGCCCTGCTCTTCTCTT-3'
GAPDH	S	5'-CCAGGAAATGAGCTTGACAAAG-3'
GAPDH	AS	5'-AGGTTGTCTCCTGCGACTTCA-3'

3.7 Zymographie

Zur Untersuchung von regulatorisch an der Myelinbildung beteiligten Proteasen, kam die quantitative Bestimmung mittels Zymographie mit Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) zum Einsatz. Die Zellkulturüberstände wurden dabei in einem gelatinehaltigen Gel elektrophoretisch entsprechend ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Enthaltene Proteasen können nach der Auftrennung die Gelatine abbauen, so dass im angefärbten Gel dort entfärbte Banden entstehen, wo Proteasen Gelatine abgebaut haben (Frankowski et al. 2012).

Für die Analyse der Proteaseaktivität wurde serumfreies Medium angesetzt, zu den Kulturen gegeben und nach zwei Tagen asserviert. Ein Trenngel (Tabelle 6) wurde mit Isobutanol, überschichtet und auspolymerisiert. Nach Entfernen des Isobutanols, konnte das Sammelgel aufgetragen und ein Kamm eingelegt werden (Tabelle 6). Das Gel wurde in die Elektrophoresekammer eingelegt und diese mit Laufpuffer (Novex Tris-Glycine SDS Running Buffer 10x, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA) befüllt. 10 µl der entnommenen Mediumproben denaturierten in 10 µl Probenpuffer (Novex TRIS-Glycin SDS Sample Buffer 2X, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham,

USA) und wurden in die Geltaschen gegeben. Die elektrophoretische Trennung erfolgte über eine Stunde bei 130 V, als Marker bzw. Positivkontrollen wurden aktives MMP-2 und MMP-9 verwendet. (Frankowski et al. 2012). Anschließend inkubierte das Gel für 30 min in Renaturierungspuffer (Novex Zymogram Renaturing Buffer 10x, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA) und über Nacht bei 37 °C in Entwicklungspuffer (Novex Zymogram Developing Buffer, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA). Es folgte die Färbung mit 0,5 % Comassie Brilliant Blue R-250, 30 % Methanol und 10 % Essigsäure in destilliertem Wasser für 6 Stunden bei Raumtemperatur. Nach dem Entfärben in 30 % Methanol mit 10 % Essigsäure in destilliertem Wasser wurde das Gel kurz in Gel-Dry Drying Solution (Invitrogen, Carlsbad, USA) gegeben und anschließend zwischen Celophan-Folien über Nacht aufgespannt und getrocknet. Das Gel wurde gescannt und die Bandenintensität mittels ImageJ densitometrisch quantifiziert.

Tabelle 6: Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels der Zymographie

Materialien	Trenngel 10 %	Sammelgel 5 %	Firma	Ort
Destilliertes Wasser	4 ml	2,1 ml		
30% Bis-Acrylamid 19:1	3,3 ml	0,5 ml	Bio-Rad Laboratories	Hercules, USA
1,5 M Tris Puffer ph 8,8	2,5 ml	-	Merck	Darmstadt, DE
1 M Tris Puffer ph 6,8	-	0,38 ml	Merck	Darmstadt, DE
10% SDS	0,1 ml	0,03 ml	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
10% APS	0,1 ml	0,03 ml	Sigma	St. Louis, USA
0,1% Gelatine	0,1 ml	-	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
TEMED	4 µl	3 µl	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA

3.8 Nervenquetschung

3.8.1 Operatives Vorgehen zur Erzeugung der Nervenläsion

Um den Prozess der Remyelinisierung unter kontrollierten Bedingungen am Versuchstier *in vivo* untersuchen zu können, kommt die experimentelle Nervenquetschung, geläufiger als „*nerve crush*“ bezeichnet, als Modell der Axonotmesis zur Anwendung (Bridge et al. 1994, Stewart et al. 2001).

Die Versuchstiere wurden durch intraperitoneale Gabe von Ketamin 100 mg/kg Körpergewicht (KG) und Xylazin 5 mg/kg KG narkotisiert. An der Dorsalseite der rechten hinteren Extremität, wurde das Fell sorgfältig rasiert und die Haut mit Povidon-Iod desinfiziert. Unter Aufrechterhaltung der Antisepsis wurde ein ca. 1,0 cm langer Hautschnitt gesetzt. Durch stumpfe Präparation wurden die Musculi biceps femoris und quadratus femoris getrennt und der Nervus ischiadicus in seinem Verlauf dargestellt. 5 mm vor seiner Aufteilung in die drei Endäste wurde der Nerv mit einer stumpfen, zahnlosen Gefäßklemme gefasst und für 30 Sekunden mit definierter Kraft komprimiert. Im Anschluss wurde die Operationswunde durch Einzelknopfnähte verschlossen und antiseptische Salbe aufgetragen.

Am OP-Tag und 2 Tage darauf erhielten die Tiere jeweils Carprofen (5 mg/kg KG) subcutan zur Analgesie. Die ersten 4 Tage nach der Operation wurden die Tiere täglich kontrolliert, die OP-Wunde inspiziert und ggf. erneute Einzelknopfnähte gesetzt. Nach 8-10 Tagen wurden die Fäden gezogen, sofern die Tiere diese nicht schon selbstständig entfernt hatten.

3.8.2 Evaluation der klinischen Beeinträchtigung

Die Versuchstiere wurden klinisch hinsichtlich des Grades ihrer Beeinträchtigung untersucht. Ihr klinischer Zustand wurde in Stufen von 0 bis 5 eingeteilt und jedem Versuchstier zu verschiedenen Zeitpunkten ein Wert zugeordnet (Tabelle 7) (Szepanowski et al. 2017).

Tabelle 7: Grad der Beeinträchtigung der Versuchstiere nach Nervenquetschung

Klinische Beeinträchtigung	Wert
Keine Beeinträchtigung	5
Auffälliger Gang	4
Leichte Parese	3
Mittelschwere Parese	2
Schwere Parese	1
Plegie	0

3.8.3 Messung der Nervenleitgeschwindigkeit

Für die elektrophysiologischen Untersuchungen wurden die Versuchstiere durch die Applikation von 100 mg/kg KG Ketamin und 5 mg/kg KG Xylacin intraperitoneal, narkotisiert. Die Körpertemperatur der Tiere wurde durch ein Thermometer mit Rektalsonde überwacht und durch eine Heizdecke auf konstantem Niveau gehalten. Es wurden Elektromyographienadeln mit einem Durchmesser von 0,3 mm eingesetzt. Auf Höhe der Spina iliaca posterior superior wurde eine Nadel als Stimulationselektrode von dorsal jeweils lateral der Austrittsstelle des linken Nervus ischiadicus aus dem Becken in die Muskulatur eingestochen. Eine weitere Nadel wurde lateral der linken Achilles-Sehne im Bindegewebe eingebracht. Eine Nadel wurde als Ableitelektrode in der Muskulatur der medialen Plantarseite der linken Hinterpfote eingestochen und eine weitere Nadel als Erdungselektrode in der Haut des gegenüberliegenden rechten Hinterlaufs eingebracht. Die Nadeln wurden an ein tragbares Elektroneurographiegerät angeschlossen. Es wurden Spannungsimpulse von 0,2 s Dauer mit 1 bis 8 mV und einem maximalen Strom von 5 mA angelegt. Durch die Reizung des Nerven durch die bipolaren Stimulationselektroden kommt es als Reizantwort zur Muskelkontraktion im innervierten Muskel. Im Wechsel wurden proximale und distale Stimuli verabreicht. Nach maximal 10 min wurde die Untersuchung beendet und das Versuchstier durch zervikale Dislokation getötet.

3.8.4 Histologie und Auswertung

Die *Nervi ischiadici* wurden präpariert und vor der Einbettung in Epoxydharz für 24 h in 2,5 % Glutaraldehyd fixiert (Luft 1961). Im Anschluss wurde das Gewebe in 1 ml Cacodylatpuffer (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) mit 3 % Saccharose überführt und bei 4 ° C zwischengelagert. Es folgte die Kontrastierung in Osmiumlösung für 3 h. Die verwendete Osmiumlösung wurde aus einem Teil 2,5 % Kaliumdichromat (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland), einem Teil 3,4 % Natriumchlorid (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) und 2 Teilen 2 % Osmiumtetroxid (Sigma–Aldrich corp., St. Louis, Missouri, USA) zusammengesetzt. Nach der Kontrastierung wurde das Gewebe über Nacht mit Cacodylatpuffer gespült. Es folgte die Entwässerung der Proben für je 1 h in 70 %, 96 % und 99,9 % unvergälltem Ethanol bei Raumtemperatur. Die Epon-Stammlösungen des Epoxy-Embedding Kit (Sigma–Aldrich corp., St. Louis, Missouri, USA) wurden zusammengeführt und mit dem beigefügten 2 % DMP-30 versetzt. Nach Aufsteigen der Luftblasen erfolgte das Einbetten der Proben in Silikonformen (# G3533, Fa. Plano GmbH, Wetzlar, Deutschland). Im Anschluss wurden die Präparate schrittweise erhitzt, für 6 h bei 37 °C, 15 h bei 47 °C und 28 h bei 60 °C. Nach dem Abkühlen der Präparate wurden Semidünnschnitte von 1 µm Dicke angefertigt. Die Schnitte wurden mit Touluidinblau angefärbt und mit Hilfe eines Axioplan 2 Imaging Mikroskops (Zeiss, Axioplan 2, Carl Zeiss, Göttingen, Germany) fotografiert. Die erstellten Bilder wurden mit Hilfe des Softwareprogramms Photoshop CS3 (Adobe, San José, CA, USA) überlappend zu einem Gesamtbild des Nerven zusammengefügt. Die Anzahl der Axone pro Nerv wurden verblindet manuell ausgezählt, hierzu wurde mithilfe der *CellCounter*-Funktion von ImageJ jedes Axon markiert. Unmyelinisierte Axone mit einem Durchmesser unter 1 µm wurden separat ausgezählt. Es wurde der axonale Durchmesser und der Nervenfaserdurchmesser bestimmt und als Quotient aus Axondurchmesser und Gesamtfaserdurchmesser die relative Myelinscheidendicke (G-ratio) errechnet (Bear und Schmitt 1937, Chomiak und Hu 2009).

3.9 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten für Standardabweichung und P-Wert erfolgte mit Hilfe des Softwareprogramms GraphPad Prism Version 5.01 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). Das Signifikanzniveau wurde mit $p < 0.05$ festgelegt (p-Werte: * < 0.05 , ** < 0.01 , *** < 0.001).

Für normalverteilte Variablen aus 2 Gruppen wurde der ungepaarte T-Test durchgeführt. Zum Vergleich normalverteilter Variablen einer Gruppe mit einem genormten Referenzwert der gepaarte T-Test. Vergleiche von mehr als 2 Gruppen gegenüber einer Kontrolle wurden mit Hilfe des Dunnett-Tests auf ihre Signifikanz hin untersucht, auch hierfür wurde GraphPad Prism Version 5.01 verwendet.

4 Ergebnisse

4.1 Die P2-MBP-Co-Expression in der Immunzytochemie

In der Immunzytochemischen Färbung der Wildtyp-DRG-Kulturen fanden sich myelinisierte Nervenfasern mit unterschiedlich kombinierter Expression der Myelinproteine. Es konnten MBP-positive, P2-negative Fasern, ebenso wie für MBP und P2 positive Fasern nachgewiesen werden. Vereinzelt fanden sich auch MBP-negative, P2-positive Nervenfasern (Abb. 6).

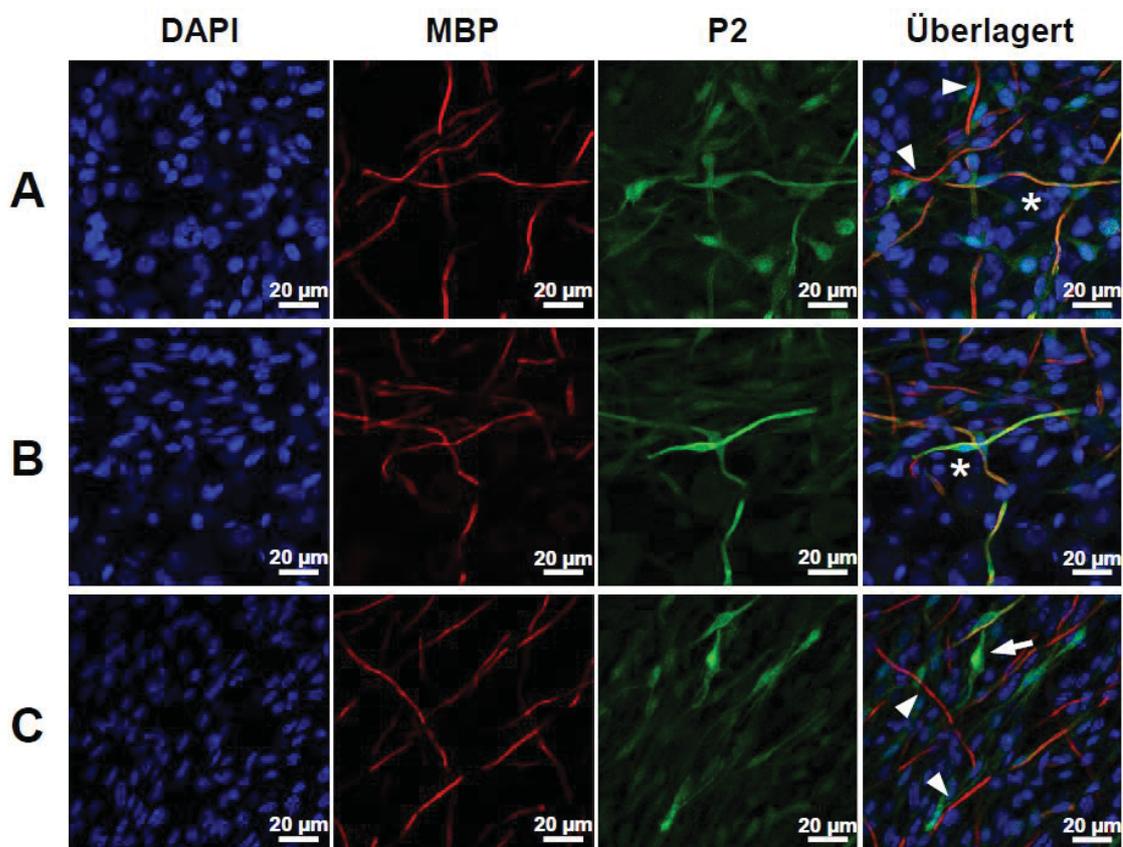


Abb. 6 Die Co-Expression von MBP und P2 in der Immunzytochemie

Die Abbildung zeigt immunhistochemische Färbungen von DRG-Schwannzell-Co-Kulturen, aufgenommen mittels Konfokalmikroskopie. Dargestellt sind 3 Ausschnitte der Zellkultur, (A), (B) und (C) in der Zellkernfärbung DAPI (blau), rot für Myelin-Basisches Protein (MBP), grün für das Myelinprotein 2 (P2) und rechts die überlagerte Darstellung. In (A) sind im linken oberen Bildausschnitt zwei Fasern zu sehen, die positiv für MBP, jedoch negativ für P2 sind (Pfeilspitze). In (B) ist eine doppelt-positive Faser für MBP und P2 in der Bildmitte zu sehen (Asteriske). In (C) ist eine Nur-P2-positive Faser im oberen Bildabschnitt zu sehen (Pfeil).

4.2 Die Expression von Caspr in P2-positiven Nervenfasern

Zur Darstellung möglicher Unterschiede der Nodal- und Paranodalregion P2-exprimierender Nervenfasern im Vergleich zu P2 negativen Fasern, wurde eine immunzytochemische Färbung für P2 und Caspr in Wildtyp-Kulturen durchgeführt. Die Bilder der Konfokalmikroskopie zeigen, soweit mit der Methode beurteilbar, keinen Unterschied in der nodalen Konfiguration P2-positiver und P2-negativer Fasern (Abb. 7).

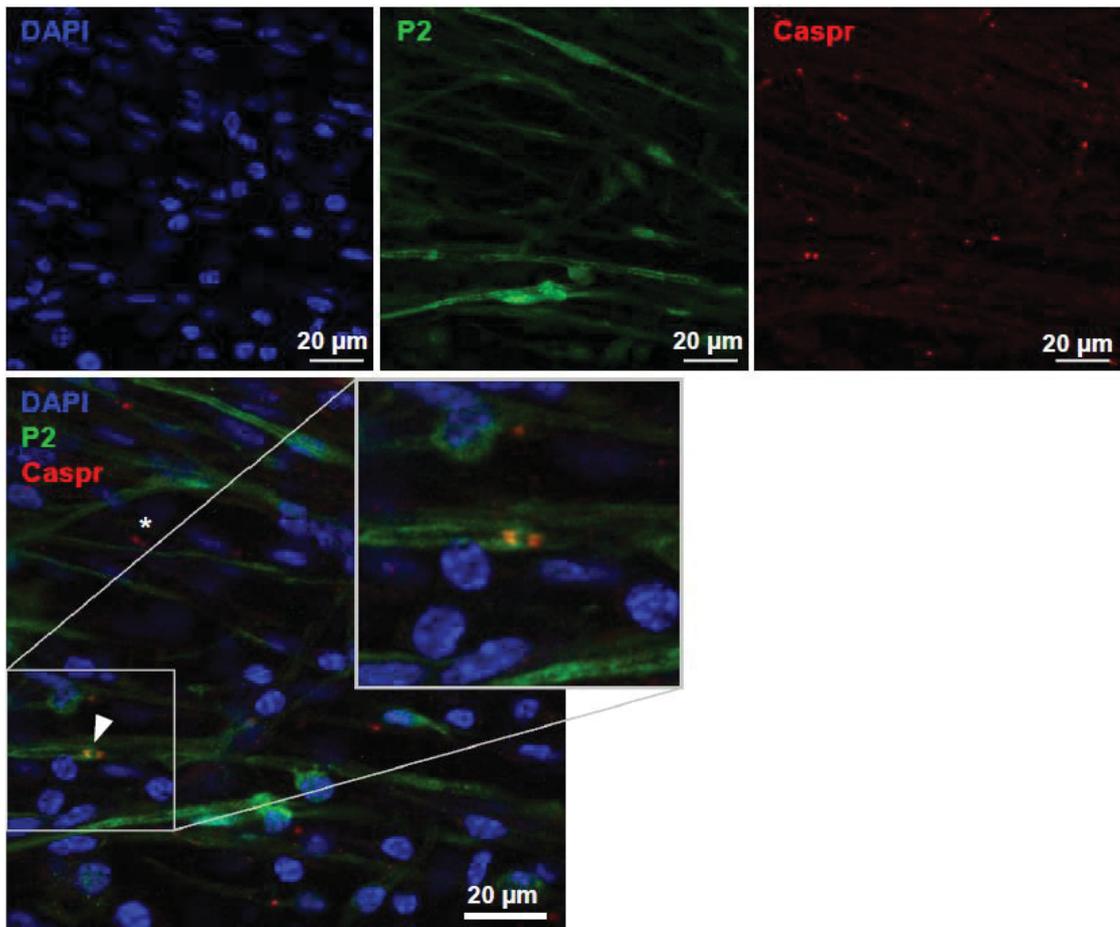


Abb. 7 Caspr in P2-positiven Nervenfasern in der Immunzytochemie

Die Abbildung zeigt eine immunhistochemische Färbung von Wildtyp-DRG-Schwannzell-Co-Kulturen, aufgenommen durch Konfokalmikroskopie. In blau zeigt sich die Zellkernfärbung DAPI, P2 zeigt sich im grünen Fluoreszenzkanal, rote Fluoreszenz markiert die Caspr-Expression. In der überlagerten Darstellung (links unten), ist durch eine Pfeilspitze ein Nodium einer P2-positiven Faser markiert. Die Markierung der Paranodalregion durch Caspr weist keine sicheren morphologischen Veränderungen auf. Das Asterisk markiert eine nodale Caspr-Expression, einer P2-negativen Faser.

4.3 Bestimmung der Myelinmenge von P2-defizienten DRG-Kulturen

Eine der gewählten Methoden zur Quantifizierung der Myelinmenge erfolgte mittels fluoreszenzmarkierter, inkorporierender Fettsäuren. Hierfür wurde die Myelinmenge der Ausschnittbilder in 5 Kategorien unterteilt. Diese lassen sich wie folgt beschreiben:

Tabelle 7: Zuordnung der Myelinmenge zu Kategorien

Kategorie	Beschreibung
1	Keine myelinisierten Fasern, höchstens einzelne Internodien
2	Einzelne myelinisierte Fasern / Dichter Zellrasen myelinisierter Fasern in < 25 % des Sichtfelds
3	Vermehrt myelinisierte Fasern / Dichter Zellrasen myelinisierter Fasern in > 25 % des Sichtfelds
4	Dichter Zellrasen myelinisierter Fasern in > 50 % des Sichtfelds
5	Dichter Zellrasen myelinisierter Fasern in > 75 % des Sichtfelds

Die entsprechende Myelinmenge in den Kategorien ist exemplarisch in Abbildung 8 dargestellt. Jedem Bild wurde entsprechend der zugeordneten Kategorie der jeweilige Punktwert zugeordnet (Abb. 8). Es wurden für die P2-defizienten Kulturen und die entsprechenden Kontrollen jeweils 2 Kavitäten vollständig abfotografiert und jeweils mindestens 100 Einzelbilder ausgewertet.

Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Myelinmenge der vitalen Kulturen zwischen den P2 defizienten Kulturen und den Wildtyp-Kontrollen. Im gleichen Versuchsaufbau erfolgte die Bestimmung der Myelinmenge nach Demyelinisierung der Kulturen mit Forskolin und anschließender Remyelinisierung über 4 Tage. Auch hier konnte kein signifikanter Unterschied in der Myelinmenge der Kulturen festgestellt werden (Abb. 8).

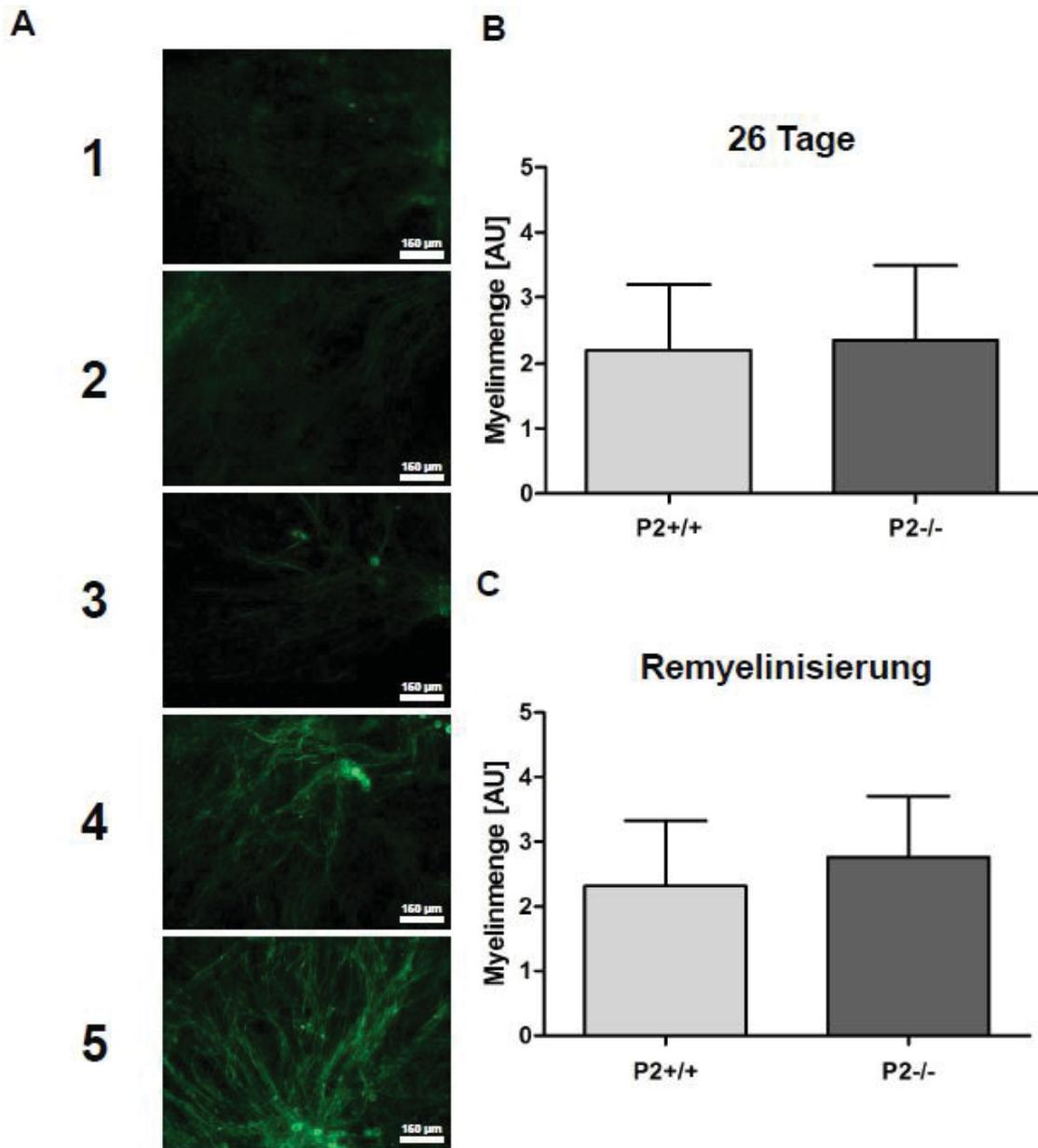


Abb. 8 Myelinmenge in der vitalen Zellkultur

Die Abbildung zeigt die Auswertung der Myelinquantifizierung durch Kategorisierung nach der Färbung mit fluoreszenzmarkierten Fettsäuren. Es wurden für beide Genotypen 2 Wells ab fotografiert. Jedem der jeweils mindestens 100 Einzelbilder wurde ein Wert für die Myelinmenge zwischen 1 und 5 zugeteilt. In **(A)** sind exemplarisch Bilder der entsprechenden Kategorisierung abgebildet. In **(B)** ist die Myelinmenge 26 Tage nach Induktion der Myelinisierung mit Mittelwert und Standardabweichung dargestellt ($p=0,2486$, P2+/+: $n=115$, P2-/-: $n=167$). In **(C)** sind auf gleiche Weise Kulturen nach Demyelinisierung mit Forskolin 20 $\mu\text{l/ml}$ und Remyelinisierung über 4 Tage dargestellt ($p=0,102$, P2+/+: $n=22$, P2-/-: $n=61$). P2+/+ = Wildtyp-Kulturen, P2-/- = Kulturen aus P2-defizienten Tieren, AU = Willkürliche Einheiten (*arbitrary units*)

Zudem wurden mit Sudanschwarz angefärbte Kulturen zu verschiedenen Kulturzeitpunkten nach Induktion der Myelinisierung, bzw. nach Remyelinisierung quantifiziert.

In den Kulturen wurden Internodien und Nervenzellkörper ausgezählt und der Quotient Internodien / Neuron als Wert der relativen Myelinmenge angenommen (Stettner et al. 2013). Nach Induktion der Myelinisierung durch Zugabe von Ascorbinsäure zum Kulturmedium, wurden Kulturen an den Tagen 8, 16 und mit 28-30 Tagen fixiert und ausgewertet. Die Zählergebnisse eines Wells gingen als Einzelversuch in die Statistik ein, sofern mehr als 50 Neurone gezählt werden konnten. Es wurden pro Well zwischen 184 und 3382 Neurone und zwischen 768 und 11312 Internodien gezählt. Für die Myelinmenge konnte zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied zwischen den P2-defizienten und Wildtyp-Zellen nachgewiesen werden, es zeigt sich jedoch ein Trend zu verminderter Myelinbildung in P2-defizienten Kulturen in der Frühphase der Myelinbildung – hier an Tag 8 evaluiert (siehe Abb. 9).

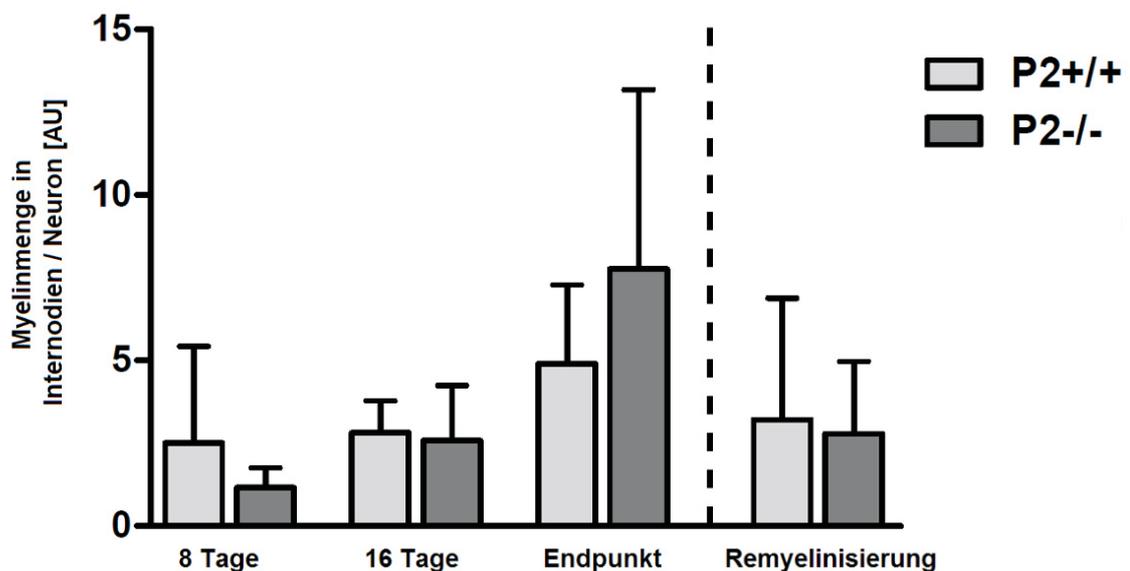


Abb. 9 Die relative Myelinmenge pro Neuron in DRG-Kulturen nach Sudanschwarzfärbung
 Die Abbildung zeigt die relative Myelinmenge der DRG-Kulturen zu verschiedenen Zeitpunkten. In den Sudanschwarz gefärbten Kulturen wurden Internodien und Nervenzellkörper ausgezählt und der Quotient Internodien / Neuron als Wert der relativen Myelinmenge angenommen. Verglichen wurden 3 Zeitpunkte nach Induktion der Myelinisierung. Rechts dargestellt ist die Myelinmenge nach Demyelinisierung mit Forskolin und Remyelinisierung über 4-8 Tage. P2+/+ = Wildtyp-Kontrollen, P2-/- = Kulturen aus P2-defizienten Tieren. (p=0,3251, Anzahl ausgewerteter Wells Gesamt: n = 35; 8 Tage: n = 8, 16 Tage: n = 7, Endpunkt: n = 7, Remyelinisierung: n = 13)

4.4. Die Morphologie myelinisierter Fasern in P2-defizienten DRG-Kulturen

Die myelinisierten Fasern der P2-defizienten und Wildtyp-Zellkulturen zeigten in den mikroskopischen Analysen keine morphologischen Unterschiede. In vitalen Kulturen wurde das Myelin durch fluoreszenzmarkierte Fettsäuren markiert. Das Myelin imponierte hinsichtlich der Verteilung und der Konfiguration unverändert in den P2-defizienten Kulturen im Vergleich zu Kontrollkulturen (Abb. 10).

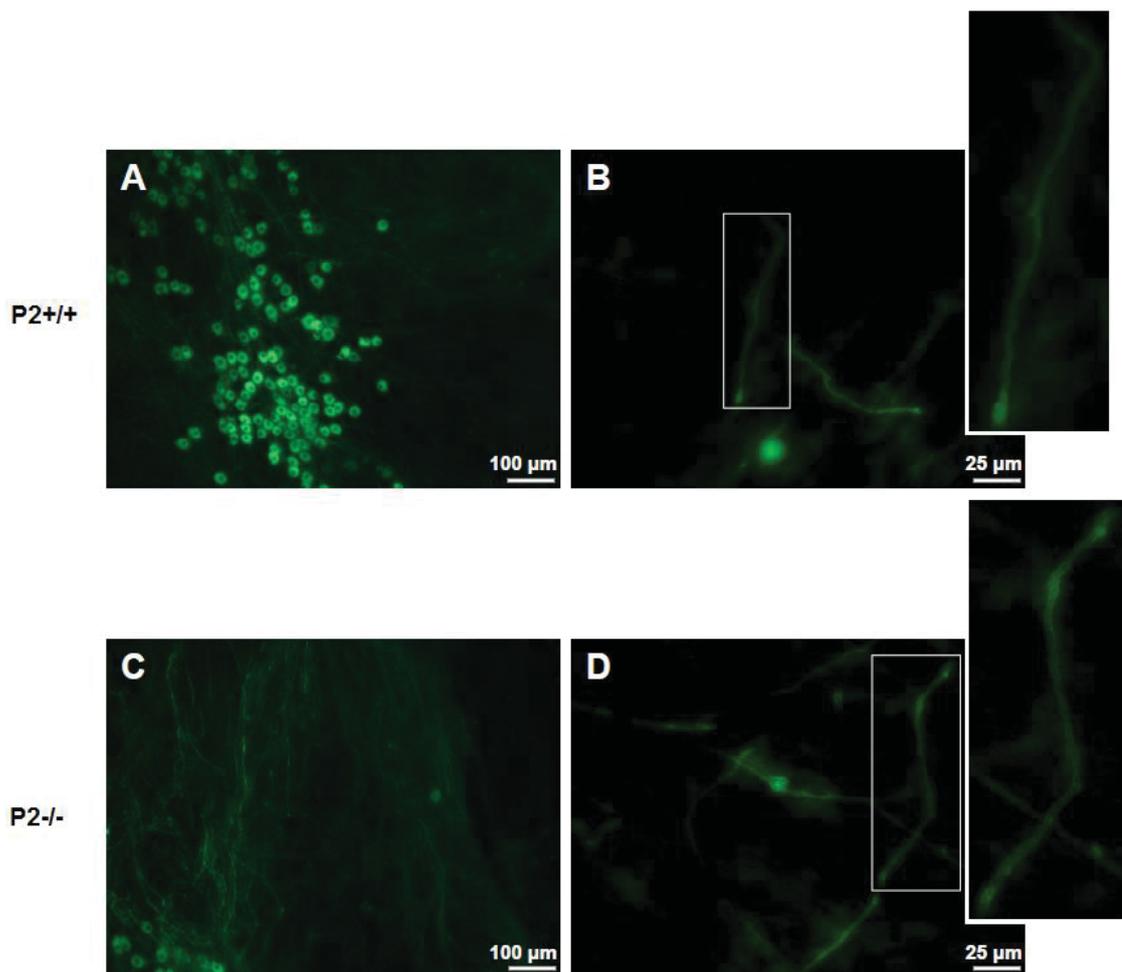


Abb. 10 Die Myelinmorphologie von fluoreszenzmarkiertem Myelin

Die Abbildung zeigt vitale DRG-Schwannzell-Co-Kulturen nach der Markierung mit fluoreszenzmarkierten Fettsäuren. Die Myelinscheiden fluoreszieren homogen und ohne offensichtliche Defekte im Sinne einer Hyper-/Hypomyelinisierung. (A) und (C) zeigen eine repräsentative Übersicht der myelinisierten Kulturen. (B) und (D) zeigen die jeweiligen Kulturen mit Ausschnittvergrößerung. P2+/+ = Wildtyp-Kulturen, P2-/- = Kulturen aus P2-defizienten Tieren.

Auch nach Fixation und Färbung der Lipidkomponente mittels Sudanschwarz zeigte sich das Myelin in den P2-defizienten verglichen mit den Wildtyp-Kulturen ähnlich konfiguriert (Abb.11).

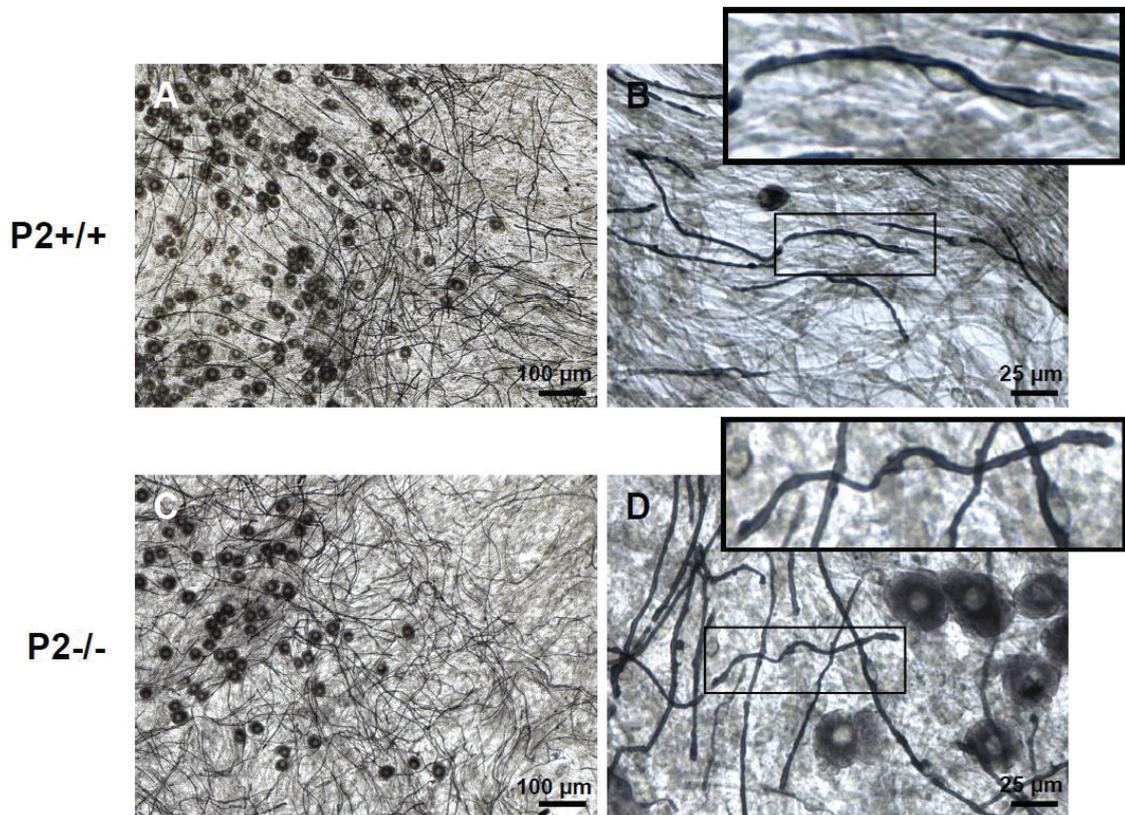


Abb. 11 Die Myelinmorphologie in der Sudanfärbung

Die Abbildung zeigt die DRG-Schwannzell-Co-Kultur nach der Färbung mit Sudanschwarz. (A) und (C) zeigen eine repräsentative Übersicht der myelinisierten Kulturen. (B) und (D) zeigen die Kulturen in höherer Vergrößerung mit Ausschnittvergrößerung. Die Myelinscheiden sind homogen angefärbt und ohne morphologisch erkennbare Defekte. P2+/+ = Wildtyp-Kulturen, P2-/- = Kulturen aus P2-defizienten Tieren.

4.5 Internodal- und Nodallänge myelinisierter Fasern in P2-defizienten DRG-Kulturen

Zu 3 Zeitpunkten nach Induktion der Myelinisierung wurden Zellkulturen fixiert, mittels Sudanschwarz gefärbt, fotografiert und die Bilder ausgewertet. Zur Messung der Länge der Internodien und Nodien wurden die Bilder in 400 x Vergrößerung, mit Hilfe von ImageJ vermessen. Für die Messungen der Internodallänge wurden für P2-defiziente Kulturen und Kontrollen jeweils mindestens 250 Internodien ausgemessen. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den P2-defizienten Kulturen und den Kontrollen (Abb. 12, A). Für die Messungen der Nodallängen wurden für P2-defiziente Kulturen und Kontrollen jeweils mindestens 150 Ranvier'sche Schnürringe ausgemessen. Die Messungen ergaben für P2-defiziente DRG-Kulturen verbreiterte Ranvier'sche Schnürringe über den gesamten zeitlichen Verlauf des Experiments im Vergleich zu den Kontrollkulturen (Abb. 12, B).

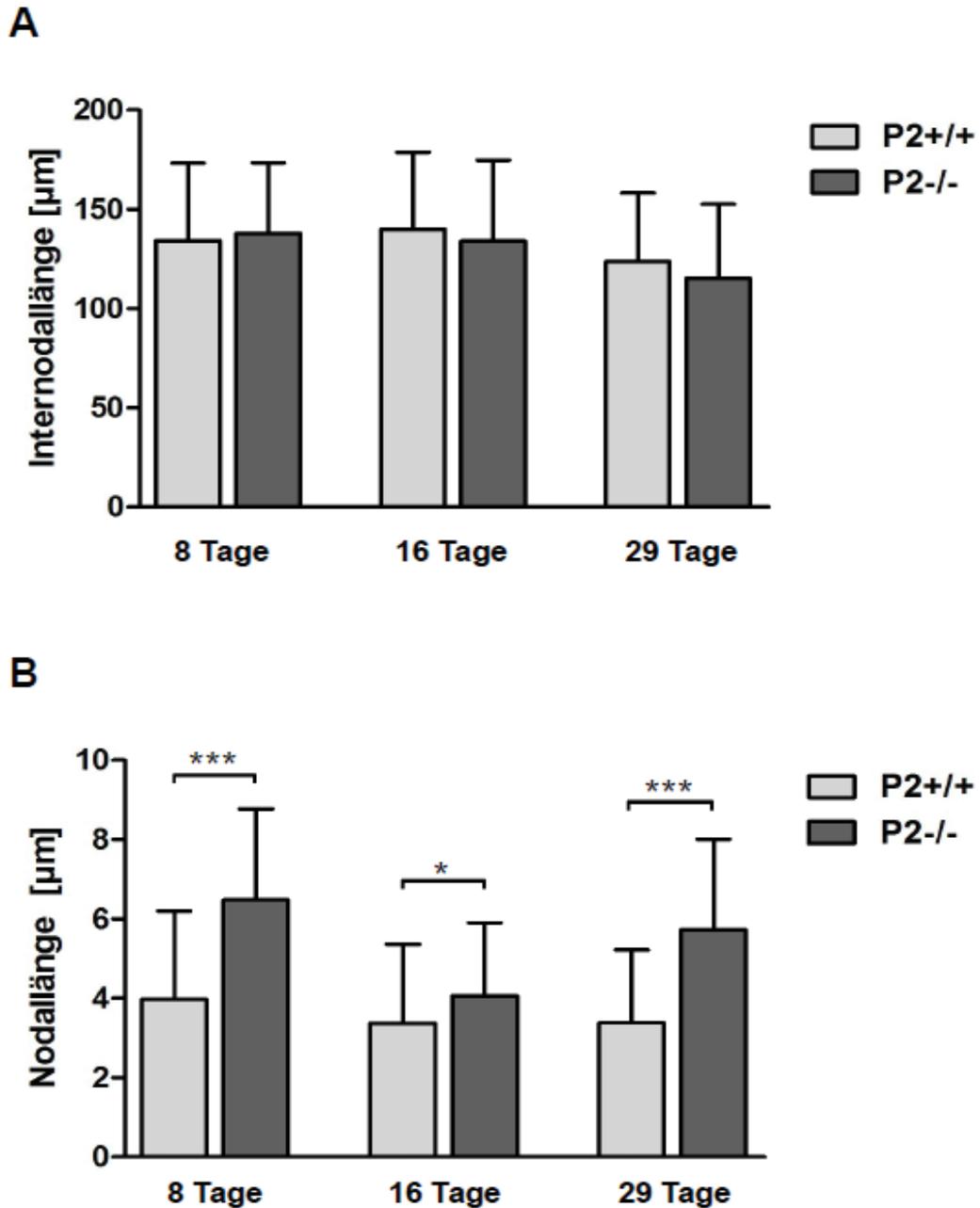


Abb. 12 Internodal- und Nodallängen P2-defizienter DRG-Kulturen im Verlauf der Myelinisierung

Die Abbildung zeigt den Vergleich von Internodal- und Nodallänge im Verlauf der Myelinisierung in DRG-Schwanzzell-Co-Kulturen. Es wurden Daten zu 3 Zeitpunkten nach Induktion der Myelinisierung erhoben. In **(A)** sind die Messungen der Internodallänge dargestellt. Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied der Internodallängen. In **(B)** sind die Messungen der Nodallänge dargestellt. Es zeigen sich signifikant vergrößerte Ranvier'sche Schnürringe in den P2-defizienten Fasern. Es wurden pro Gruppe über 90 Internodien und mindestens 70 Nodien quantifiziert. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$. Die Darstellung zeigt Mittelwerte und Standardabweichungen.

In den Kulturen wurde durch Zugabe von Forskolin die Demyelinisierung ausgelöst, mit im Anschluss 4 oder 8 Tagen Kultivierung zur Remyelinisierung. Die Internodal- und Nodallängen der P2-defizienten Kulturen wurden mit der, der Kontrollkulturen verglichen.

Weitere Untersuchungen wurden an Kulturen durchgeführt, in denen durch Zugabe von Forskolin die Demyelinisierung ausgelöst wurde und die nach 4 bzw. 8 Tagen Kultivierung erneut Myelin gebildet hatten. Der Vergleich dieser Kulturen zeigte sowohl signifikant verlängerte Nodien, als auch signifikant verkürzte Internodien für die P2-defizienten Nervenfasern nach 8 Tagen Remyelinisierung. Nach 4 Tagen zeigt sich lediglich für die Nodallänge ein nicht signifikanter Trend (Abb. 13).

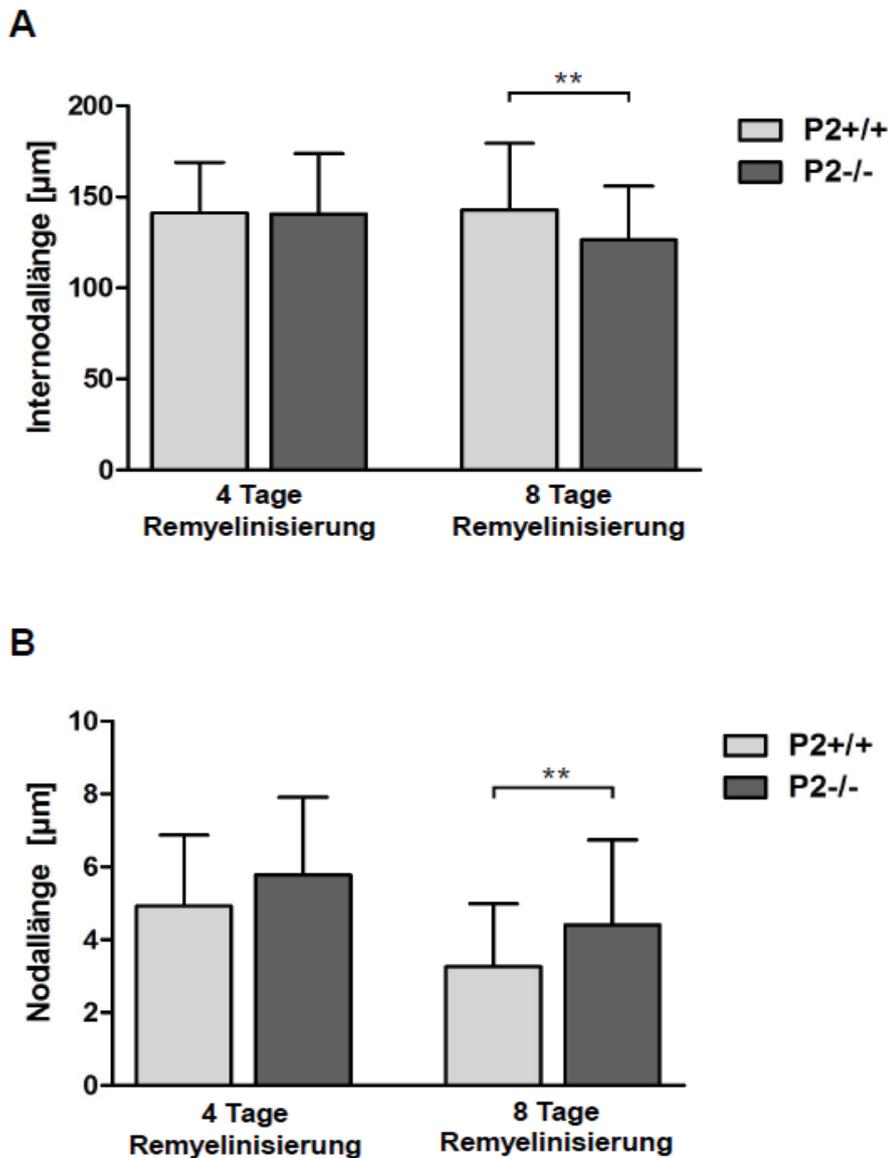


Abb. 13 Internodal- und Nodallängen von P2-defizienten DRG-Kulturen nach Remyelinisierung
 In (A) sind die Messungen der Internodallänge dargestellt. Es zeigt sich ein signifikanter der Nodallänge von P2-defizienten DRG-Kulturen und entsprechenden Kontrollen nach 8 Tagen Remyelinisierung. In (B) sind die Messungen der Nodallänge dargestellt. Es zeigen sich signifikant längere Nodien in den P2-defizienten Nervenfasern nach 8 Tagen Remyelinisierung. Es wurden pro Gruppe über 90 Internodien und mindestens 70 Nodien quantifiziert. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$. Die Darstellung zeigt Mittelwerte und Standardabweichungen.

4.6 Die RNA-Expression relevanter Myelogene in P2-defizienten DRG-Kulturen

Die Analyse der mRNA-Expression der P2-defizienten Kulturen im Vergleich zu korrespondierenden Wildtyp-Kontrollen ergab keine signifikante Veränderung der mRNA-Expression von MBP, SIRT und P0.

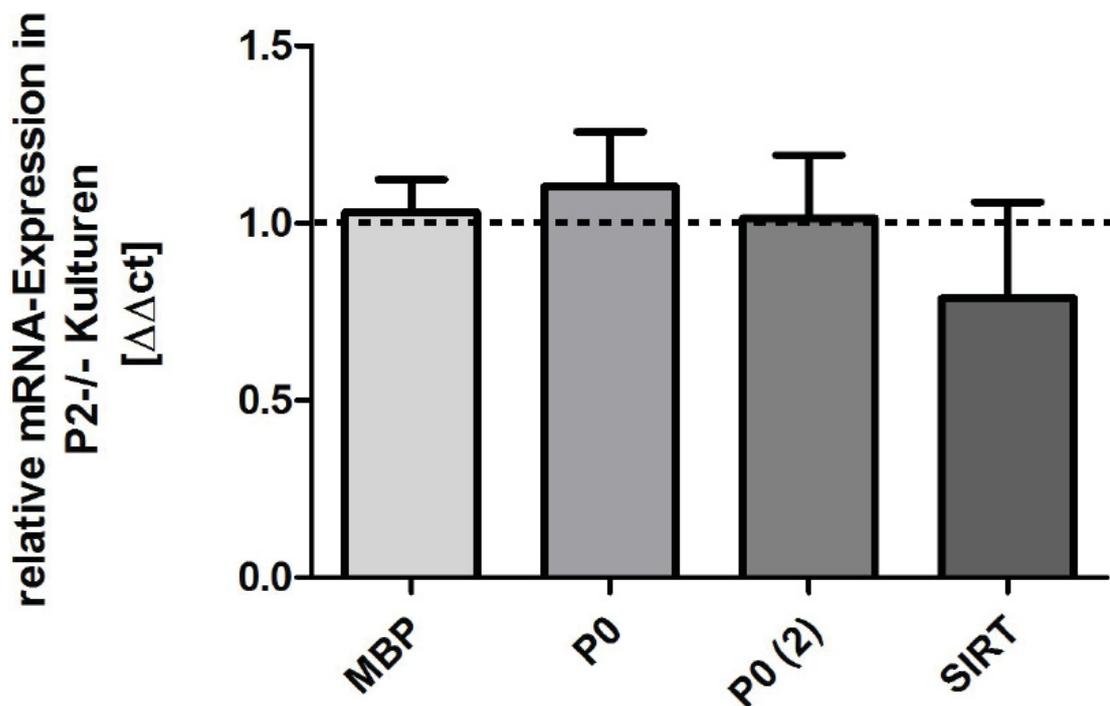


Abb. 14 Die RNA-Expression von MBP, P0 und SIRT in P2-defizienten DRG-Kulturen
Die Abbildung zeigt die relative mRNA-Expression der P2-defizienten (P2^{-/-}) DRG-Schwanzzell-Co-Kulturen nach 21 Tagen *in vitro* in Bezug auf die Expression in Kontrollkulturen (P2^{+/+}) und das Housekeeping Gen GAPDH. Untersucht wurden die RNA Expression von Myelin-Basischem Protein (MBP), Sirtuin 1 (SIRT) und zwei verschiedene Primer-Paare für Protein Null (P0, P0 (2)).

4.7 Die Proteinase-Aktivität im Mediumüberstand P2-defizienter DRG-Kulturen

Zur Aktivitätsbestimmung der sekretierten Gelatinasen MMP-2 und MMP-9 im Kulturmedium, wurde eine Zymographie durchgeführt. Die Aktivität der MMPs im 2 Tage auf der Kultur verbliebenen serumfreien Medium wurde untersucht (Abb. 15). Es zeigte sich allgemein eine geringe Aktivität für MMP-9 in den untersuchten Proben (bei 92 und 82 kD). Der relative Anteil der inaktiven Form pro-MMP-2 bei 72 kD ist deutlich höher als der, der aktiven MMP-2 (62 kD). Densitometrisch errechnete sich

eine diskrete Erhöhung der Aktivität der aktiven MMP-2 in den Kulturmedien P2-defizienter Kulturen, welche bei einer geringen Probenzahl von 2 jedoch ohne Signifikanz blieb (Abb. 15, repräsentativer Versuch).

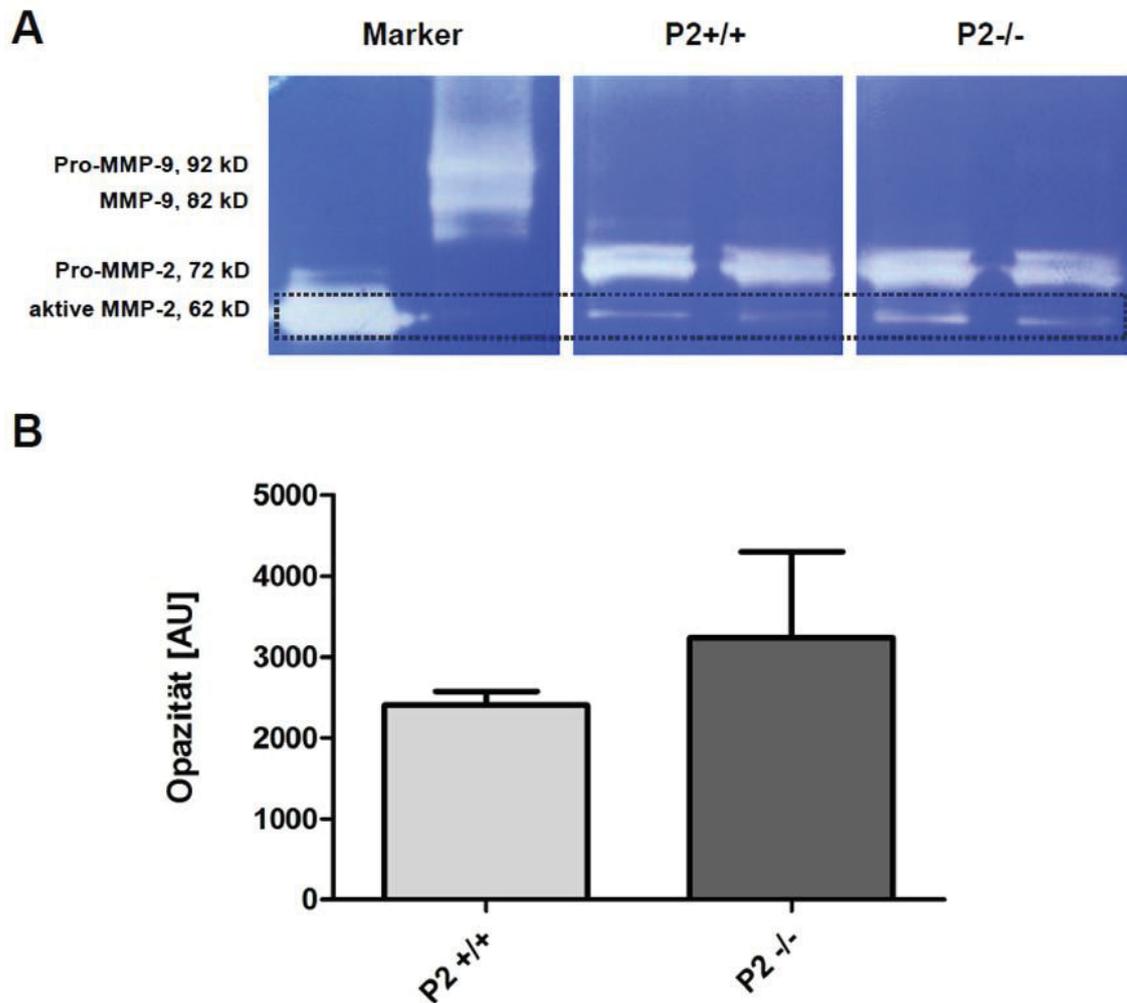


Abb. 15 Die Gelatinaseaktivität im Kulturmedium der DRG-Kulturen

Die Abbildung zeigt in (A) die Zymographien für die Aktivität der Matrix-Metalloproteasen 2 und 9 (MMP-2 und MMP-9) sowie in (B) die densitometrische Auswertung der MMP-2-Aktivität. Es zeigt sich eine geringe Aktivität der MMP-9 in allen Proben. Die diskret gesteigerte Aktivität der MMP-2 in den P2^{-/-} Proben gegenüber den P2^{+/+} Kontrollen erreichte keine statistische Signifikanz.

4.8 Die klinische Beeinträchtigung P2-defizienter Tiere nach Crush-Läsion

Um den klinischen Effekt der P2-Defizienz zu evaluieren, wurden die P2-defizienten Versuchstiere nach der experimentellen Nervenläsion im Hinblick auf ihre klinische Beeinträchtigung untersucht. Im Vergleich zu den nicht transgenen Kontrolltieren zeigten die P2-/- Tiere eine signifikant gesteigerte klinische Beeinträchtigung (Abb. 16).

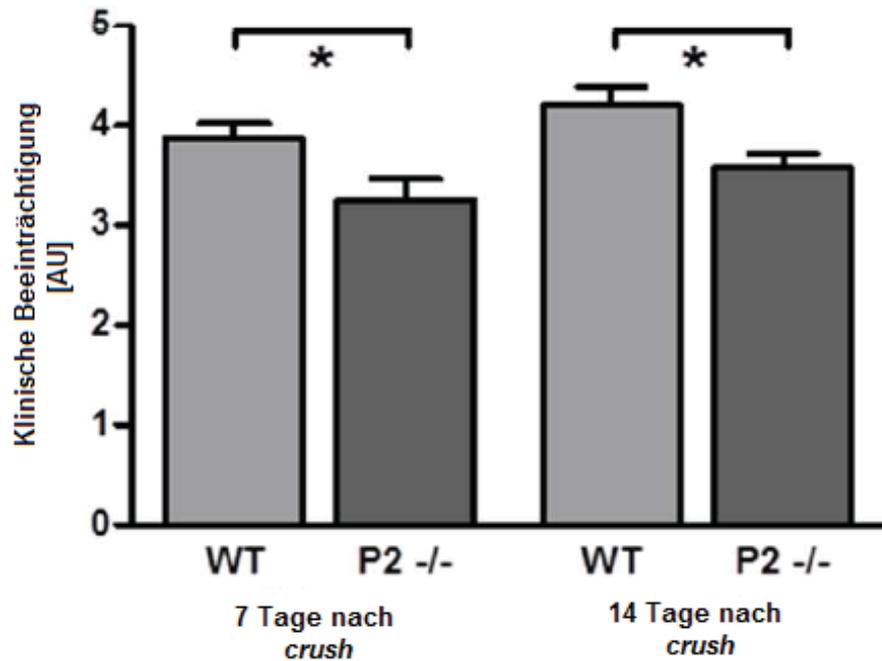


Abb. 16 Die klinische Beeinträchtigung P2-defizienter Versuchstiere

Die Abbildung zeigt den klinischen Grad der Beeinträchtigung von Versuchstieren 7 sowie 14 Tage nach Nervenquetschung des N. Ischiadicus im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren (WT) (n=34). Die Punktwerte des Scores ergeben sich folgendermaßen: 5 - unbeeinträchtigt, 4 - Auffälliger Gang, 3 - Leichte Parese, 2 - Mittelschwere Parese, 1 - Schwere Parese, 0 - Plegie. Nach der Nervenquetschung zeigen P2-/- Versuchstiere signifikant verringerte klinische Beeinträchtigung im Vergleich zu den Kontrolltieren (Tag 7: p=0.025, n=12; Tag 14: p=0.023, n=19).

4.9 Einfluss der P2-Defizienz auf die Nervenleitgeschwindigkeit nach Crush-Läsion

Zur Objektivierung der klinischen Einschätzung wurden die Tiere elektrophysiologisch untersucht. Es zeigte sich eine verlangsamte Nervenleitgeschwindigkeit der experimentell läsierten Nerven bei P2-defizienten Tieren, signifikant 14 Tage nach der Crush-Läsion (Abb. 17).

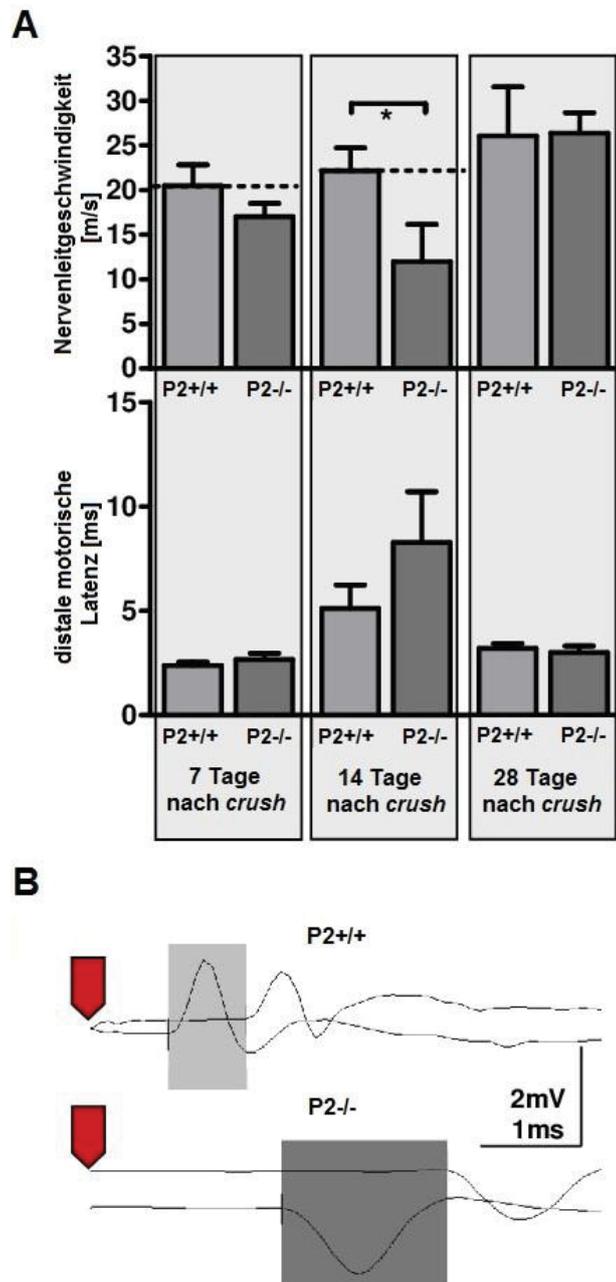


Abb. 17 Einfluss der P2-Defizienz auf die Nervenleitgeschwindigkeit

In (A) zeigt die Abbildung die Nervenleitgeschwindigkeit sowie die distal motorische Latenz des N. ischiadicus von P2-defizienten (P2^{-/-}) Mäusen im Vergleich mit Wildtyp-Tieren (P2^{+/+}) 7, 14 und 28 Tage nach Nervenquetschung (*crush*). 14 Tage nach Crush-Läsion zeigen die P2-defiziente Tiere eine signifikant stärkere Beeinträchtigung der Nervenleitgeschwindigkeit (für 14 Tage nach Crush-Läsion: $p=0,043$). (Tag 7 $n=12$, Tag 14 $n=19$, Tag 28 $n=10$). In (B) ist exemplarisch eine elektrophysiologische Messung von P2^{+/+} und P2^{-/-} Mäuse 14 Tage nach Nervenquetschung dargestellt. Die roten Pfeile markieren die elektrischen Stimuli, in grau sind die Zeitintervalle zwischen proximalen und distalen Latenzen hervorgehoben.

4.10 Morphologische Untersuchung der Nerven nach Crush-Läsion

Nach Durchführung des Crush-Experiments wurden nach 7 und 14 Tagen die Nn. Ischiadici der Versuchstiere entnommen. Nach histologischer Aufarbeitung der Nervenpräparate in Semidünnschnittpräparate, erfolgte die morphometrische Analyse und Quantifizierung von Myelinscheidendicke und Axondurchmesser. Als inverser Parameter zum Vergleich der Myelinscheidendicke in Relation zum Axondurchmesser wurde die G-ratio berechnet. 7 Tage nach der Crush-Läsion zeigte sich für dicke Nervenfasern eine relative Erhöhung der G-ratio P2-defizienter Fasern, respektive eine verringerte Myelinscheidendicke (Abb.18). Dieser Effekt war 14 Tage nach Crush-Läsion nicht mehr nachweisbar.

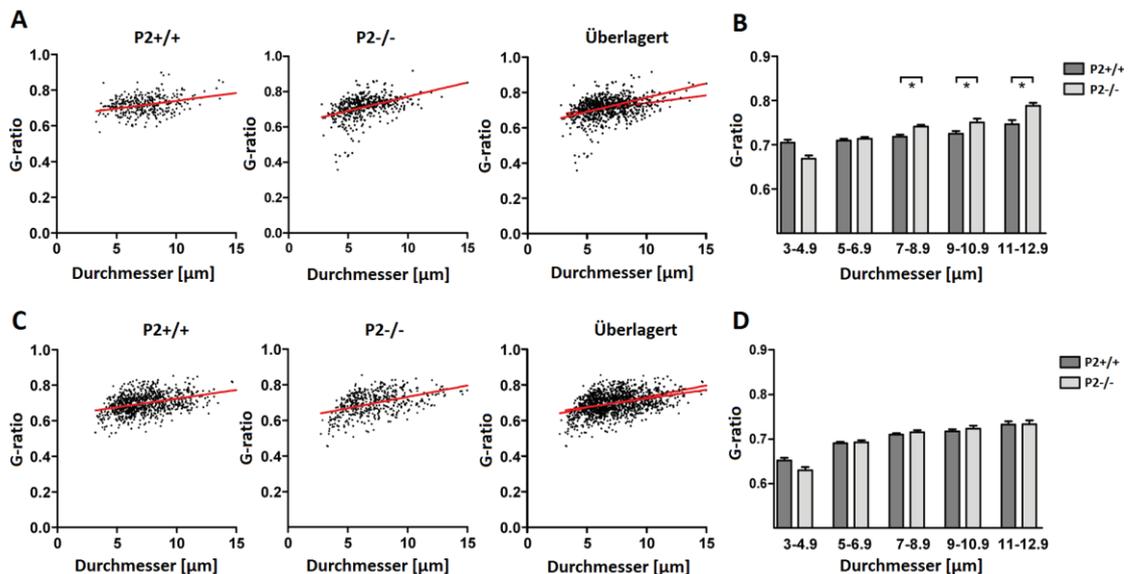


Abb. 18 Die relative Myelinscheidendicke P2-defizienter Nervenfasern nach experimenteller Nervenläsion

Die Abbildung zeigt die relative Myelinscheidendicke ($G\text{-ratio} = \text{Axondurchmesser} / \text{Gesamtfaserdurchmesser}$) im Verhältnis zum Gesamtfaserdurchmesser in Nervenpräparaten nach *crush*-Läsion. Verglichen werden Präparate von Wildtyp-Mäusen (P2+/+) mit P2-defizienten Tieren (P2-/-). (A) und (B) zeigen den Zeitpunkt 7 Tage nach *crush*-Läsion. In der graphischen Aufstellung nach Faserdurchmesser in (B) zeigt sich eine signifikant erhöhte G-ratio im Sinne einer verringerten Myelinscheidendicke von P2-/- Fasern bei größeren Faserdurchmessern (* = $p < 0,05$). In (C) und (D) sind in gleicher Weise die Ergebnisse 14 Tage nach *crush*-Läsion dargestellt. Hier zeigt sich kein signifikanter Unterschied mehr zu den Kontrolltieren.

5 Diskussion

5.1 Die Myelinmenge in P2-defizienten DRG-Kulturen

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu klären, welche Rolle P2 bei der Myelinisierung und Remyelinisierung im peripheren Nerv spielt. Die Fähigkeit von P2 Fettsäuren zu transferieren, seine Lokalisation an der zytoplasmatischen Seite der Membran und Häufung an den Zytoplasmabrücken der Myelinschicht - den Schmidt-Lantermann-Einkerbungen, bildeten die Grundlage der Theorie, dass P2 durch einen Transport von Fettsäuren aus dem Zellinneren in die Zellmembran am Aufbau der Myelinschicht beteiligt ist (Trapp et al. 1984, Ruskamo et al. 2014, Zenker et al. 2014). Blicke diese Funktion in einer Schwannzelle aus, könnte dies zum einen die Myelinsynthese qualitativ oder quantitativ beeinflussen. Sollte durch die P2-Defizienz der Prozess der Myelinisierung in den betroffenen Fasern vollständig unterbleiben, so wäre ein quantitativer Effekt auf die Myelinsynthese zu erwarten. Diese Hypothese findet Bestätigung in der Beobachtung dieser Arbeit, dass eine unauffällige Morphologie des Myelins in der Fettsäurefluoreszenzfärbung und Sudanschwarzfärbung in den P2-defizienten Kulturen vorliegt. Die Anzahl der myelinisierten Fasern müsste sich dann allerdings um den Anteil P2-exprimierender Fasern reduzieren. Als Präzedenzbeispiel, wie durch den Verlust eines Faktors in der Axon-Schwannzell-Kommunikation die Induktion der Myelinisierung negativ beeinflusst werden kann, zeigten immunhistochemische Untersuchungen der Nektin-like Proteine am Mausmodell – hier finden sich die Nektin-like Proteine gehäuft an Schmidt-Lantermann-Einkerbungen und ihre Ausschaltung führte zur Reduktion der Myelinmenge (Maurel et al. 2007).

Basierend auf der antizipierten Rolle von P2 auf den Fettsäuretransport in die Myelinschicht, wurde für die Myelinmengenbestimmung auch die Fettsäurefluoreszenzmarkierung herangezogen. Die fluoreszierenden Fettsäuren werden im Fettsäurestoffwechsel der vitalen Kultur metabolisiert und in die Myelinschicht eingebaut. Trotz der in der Literatur diskutierten Schlüsselrolle von P2 auf die Distribution der Fettsäuren in die Myelinschicht, war in den P2-/- Kulturen ähnlich viel fluoreszierendes Myelin nachzuweisen. Hierbei ist zu bedenken, dass die Sensitivität der Untersuchung durch visuelle Kategorisierung gering ist. Jedoch konnte auch die Bestimmung der Myelinmenge in den P2-/- DRG-Kulturen und den jeweiligen

Kontrollen mittels Sudanfärbung keine signifikante Veränderung des Myelingehalts zeigen. Diese Ergebnisse sprechen gegen eine unersetzbare Rolle von P2 in der Induktion der Myelinisierung im verwendeten *ex vivo* Modell, lassen jedoch Spielraum für eine mögliche Übernahme der P2-Funktion durch andere Myelinproteine.

5.2 P2-MBP-Coexpression in der Immunzytochemie

Zur Untersuchung des Stellenwerts im Aufbau der Myelinschicht, wurde P2 in einer Coexpressionsanalyse mit MBP näher betrachtet. Aus dem unmittelbaren Vergleich mit einem besser untersuchten Myelinprotein wurden nähere Erkenntnisse in Bezug auf mögliche Kompensationsvorgänge im Rahmen einer P2-Defizienz untersucht. Zwar fand sich P2 überwiegend in Internodalabschnitten, die ebenfalls MBP exprimierten, es zeigte sich jedoch auch, dass MBP und P2 unabhängig voneinander nachweisbar waren. So konnte P2 sowohl gemeinsam mit MBP, als auch in MBP negativen Internodien nachgewiesen werden.

Die bekannten Analysen der Zusammensetzung des Myelins basieren auf extrahiertem Myelin aus Nervengewebe und bedienten sich der Elektrophorese und Proteinmengenbestimmung mittels Western-Blot-Verfahrens (Greenfield et al. 1973, Trapp et al. 1979). P2 findet sich immunzytochemisch nur in 5-30% der Fasern (Trapp et al. 1979). Wie sich die Zusammensetzung der Proteinkomponenten des Myelins in diesen P2-exprimierenden Fasern darstellt bleibt unklar.

Immunzytochemische Färbungen an Nervenschnittpräparaten beschrieben eine Expression von P2 ausschließlich in MBP-positiven Internodien (Zenker et al. 2014). Ein Ergebnis, das sich von den vorliegenden Untersuchungen an den DRG-Kulturen unterscheidet. Als Ursache dieser Diskrepanz kann diskutiert werden, dass DRG-Kulturen als *in vitro*-Modell nur in Annäherung die Bedingungen der Myelinbildung *in vivo* abbilden. P2 in MBP-negativen Internodien könnte somit als Variante den veränderten Bedingungen *in vitro* geschuldet sein. Zudem konzentrieren sich bisherige Untersuchungen der Myelinproteine mittels der Immunzytochemie auf histologische Nervenpräparate, so auch bei Zenker et al. 2014. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Färbungen direkt in der fixierten Zellkultur durchgeführt. Sowohl P2 als auch MBP sind in der zytoplasmatischen Schicht der Membran lokalisiert und damit nur bedingt für die

Antikörper zugänglich. Ein technisches Artefakt kann diskutiert werden, ist jedoch aufgrund der Tatsache, dass trotz einer Permeabilisierung mit Triton selbige Ergebnisse darstellbar waren, höchst unwahrscheinlich.

Welche Bedeutung P2 in Internodien ohne MBP-Expression hat, ist zum jetzigen Zeitpunkt spekulativ. Jedoch legen sowohl die Ergebnisse von Zenker et al. (2014), als auch die Ergebnisse dieser Arbeit eine Bedeutung von P2 in der Frühphase der Myelinisierung bzw. Remyelinisierung nahe. Vorstellbar wäre daher, dass P2 als Lipidtransporter noch vor MBP von der Schwannzelle exprimiert wird oder als Lipid-*shuttle* nur im Bedarfsfall für den Auf- und Umbau der Lipidschicht exprimiert wird. Eine Theorie, die die große Variation einzelner Internodien im Nachweis von P2 erklären könnte. Der Anteil P2-positiver Fasern von 5-30 % wäre demnach nur eine Momentaufnahme der im Umbau befindlichen Internodien.

5.3 Caspr in P2-positiven Nervenfasern

Mit dem Ziel eine Veränderung der Organisation des Ranvier'schen Schnürrings in P2-positiven Fasern zu untersuchen, wurde eine Immunzytochemie mit dem Zielprotein Caspr durchgeführt. Die Doppelfärbung von Caspr und P2 zeigten eine identische Morphologie der Caspr-Expression in P2-positiven, wie auch P2-negativen Fasern.

Für die Adhäsion der Schwannzellmembranschleifen am Rande eines Internodiums an das Axon, ist unter anderem Caspr verantwortlich (Rios et al. 2000). Es steht mit dem axonalen Zytoskelett in Verbindung und durchspannt die axonale Membran (Tait et al. 2000). Caspr- und Caspr2-defiziente Mauslinien wiesen beim Verlust beider Gene einen verbreiterten Ranvier'schen Schnürring auf (Gordon et al. 2014). Aufgrund der Beobachtung eines verbreiterten Ranvier'schen Schnürrings in den P2-defizienten DRG-Kulturen im Rahmen dieser Arbeit, sollte eine mögliche Veränderung des Aufbaus P2-exprimierender Fasern in der Paranodalregion durch die Untersuchung von Caspr evaluiert werden, welche sich jedoch nicht fand. Zur weiteren Untersuchung der Auswirkung von P2-Defizienz auf die Expression von Caspr ist folglich auch in den P2 defizienten Kulturen zu untersuchen, in der vorliegenden Arbeit erfolgte der Vergleich jedoch lediglich zwischen P2 exprimierenden und nicht P2 exprimierenden Fasern einer Wildtyp Kultur. Es kann demnach nur gefolgert werden, dass es in Caspr und P2

coexpressierenden Fasern, im Vergleich zu P2 negativen Internodien keinen Unterschied der Nodalstruktur gibt.

5.4 Die Internodallänge und der Ranvier'sche Schnürring

Der Ranvier'sche Schnürring hat, im Rahmen der saltatorischen Erregungsleitung, eine hervorgehobene Bedeutung für die Funktionalität der gesamten Nervenfasern. Es wurden Messungen der Länge der einzelnen Internodien durchgeführt, ebenso wie der Breite der Ranvier'schen Schnürringe. Zwar zeigte sich weder die Anzahl der Internodien, die Internodallänge, noch ihre Morphologie verändert, jedoch ließen sich zu den untersuchten Zeitpunkten 8, 16 und 28 Tage nach Induktion der initialen Myelinisierung verbreiterte Ranvier'sche Schnürringe in den P2-/- DRG-Kulturen nachweisen. Das auf die Internodallänge kein signifikanter Einfluss festzustellen war, liegt am ehesten daran, dass mit einer durchschnittlichen Nodalgröße von 3-5 μm eine Abweichung von 1-2 μm ein signifikantes Abweichen eher Nachweisbar ist, als bei einer durchschnittlichen Internodallänge von 120 μm eine Verkürzung um wenige Mikrometer. Insbesondere aber in remyelinisierten Fasern nach induzierter Demyelinisierung zeigten sich in den P2-defizienten Kulturen vergrößerte Nodalgrößen. Hier konnte auch eine signifikante Abnahme der Internodallänge detektiert werden.

Die Internodallänge bekanntermaßen Einfluss auf die Physiologie der Reizweiterleitung in Nervenfasern. Durch die saltatorische Erregungsleitung erhöht die Myelinschicht die Nervenleitgeschwindigkeit um den Faktor 100. Jeder Mikrometer der Nervenfasern, der nicht durch kompaktes Myelin umschlossen ist, stellt demnach einen großen Zeitverlust bei der Reizüberleitung dar. Eine möglichst hohe Nervenleitgeschwindigkeit erreicht das Nervensystem durch möglichst lange Internodien, die so kurzstreckig und selten wie möglich durch Ranvier'sche Schnürringe unterbrochen werden (Sanders und Whitteridge 1946, Wu et al. 2012). Vergrößert sich die Nodalgröße auf Kosten der Internodallänge, erhöht sich der relative Anteil langsamer Erregungsleitung und die Nervenleitgeschwindigkeit nimmt ab. Für remyelinisierte Nervenfasern ist typischerweise eine verkürzte Internodallänge bekannt. Erst im Verlauf verlängert sich das Internodium wieder, womit auch die Nervenleitgeschwindigkeit erneut steigt (Wu et al. 2012). Im Falle der P2-Defizienz *in vivo* wirkten sich in unseren Daten die Folgen

der Nervenquetschung als Abnahme der Nervenleitgeschwindigkeit verstärkt aus. Dennoch war bereits nach 28 Tagen kein signifikanter Unterschied mehr zu den P2+/+ Kontrollen mehr feststellbar. Die P2-Defizienz scheint demnach nur in einem vorübergehenden Defizit im Rahmen akuter Umbau- und Regenerationsprozesse zu resultieren.

Schon in Versuchen mit heterozygot P0-defizienten Mäusen konnten Veränderungen an den Ranvier'schen Schnürringen, im Sinne einer erhöhten Nodallänge festgestellt werden (Samsam et al. 2002). Generell werden verkürzte Internodien im Zusammenhang mit neuropathischen Erkrankungen wie dem Typ 1A des Morbus Charcot–Marie-Tooth beschrieben (Saporta et al. 2009). Auch hier besteht eine Veränderung in der Zusammensetzung der Myelinproteine: Durch eine Duplikation in Chromosom 17p11.2 kommt es zur Überexpression von PMP-22 (Raeymaekers et al. 1991). Dabei zeigen sich erhöhte Latenzen in der Messung der Nervenleitgeschwindigkeit (Saporta et al. 2009).

Inwiefern durch die Ergebnisse aus der Nodallängenmessung der *in vitro*-Versuche die Ergebnisse der Messung der Nervenleitgeschwindigkeit in den von uns durchgeführten Crush-Experimenten erklärbar sind, ist spekulativ. Nichtsdestotrotz liegt die Annahme nahe, dass P2 durch eine morphologische Alteration im Bereich des Ranvier'schen Schnürrings funktionelle Eigenschaften der Nervenfasern beeinflusst. Eine verkürzte Nodallänge mit verbreiterten Ranvier'schen Schnürringen im Rahmen der Remyelinisierung P2-defizienter Nervenfasern, wie sie in dieser Arbeit *in vitro* nachgewiesen werden konnte, bietet für das elektrophysiologische Defizit der P2-defizienten Mäuse im Rahmen der Remyelinisierung eine mögliche Erklärung.

5.5 P2-Defizienz und mögliche Kompensationsmechanismen im Kontext der Myelinhomöostase

Die antizipierten Funktionen in der Myelinkompaktierung hatten zuvor zur Annahme geführt, dass sich P2 defiziente Fasern durch aufgelockertes, weniger kompaktes oder anderweitig morphologisch auffälliges Myelin präsentieren könnten. Die Untersuchung der myelinisierten Fasern der P2-defizienten DRG-Kulturen auf morphologische Besonderheiten zeigte keine Unterschiede im Vergleich mit den Kontrollen. Die

Beschaffenheit der Myelinschicht ist zum einen abhängig von der strukturellen Zusammensetzung seiner einzelnen Komponenten, zum anderen von deren Funktion auf Funktionalität und Homöostase. P0, MBP und vermutlich auch P2 beteiligen sich an der Kompaktierung der Membranschichten (Lemke und Axel 1985, Harauz et al. 2009, Ruskamo et al. 2014). So weisen P0-defiziente Mäuse beispielsweise größtenteils unkompaktiertes Myelin auf (Giese et al. 1992). Auch die Lokalisation und quantitative Expression anderer Myelinproteine wurde durch die P0-Defizienz verändert (Xu et al. 2000). Die Ergebnisse der Untersuchungen von Zenker et al. 2014, zeigten, dass P2 Einfluss auf die Lipidzusammensetzung nimmt, so dass eine P2-Defizienz zu einem beeinträchtigten Lipideinbau in die Myelinschicht führen könnte. Um dies zu untersuchen setzten wir Fluoreszenzmarkierte Fettsäuren ein. Als Folge eines beeinträchtigten Lipideinbaus in die Myelinmembranschichten wäre zu erwarten gewesen, dass sich die Fluoreszenz des Myelins bzw. dessen Morphologie verändert (Zhu und Glaser 2008, Stettner et al. 2013). Diesen Vermutungen zum Trotz, blieb das P2-defiziente Myelin quantitativ und morphologisch unverändert. Analog hierzu ließ sich schon zuvor in histologischen Untersuchungen an Nervenpräparaten adulter P2-/- Mäuse morphologisch bei P2-defizientem Myelins kein Unterschied nachweisen (Zenker et al. 2014).

Ebenso überraschende Ergebnisse zeigten bereits 1980 die Untersuchungen von Kirschner und Ganser 1980. Sie wiesen nach, dass die MBP-Defizienz der Shiverer-Maus die Kompaktierung des Myelins nicht beeinträchtigt. Obwohl klar ist, dass diese Myelinproteine gemeinsam an der Morphogenese kompakten Myelins beteiligt sind, scheint der Ausfall eines einzelnen Myelinproteins keinen größeren Einfluss auf die Grundstruktur der Myelinschicht zu nehmen. Dies legt nahe, dass die Funktionen der Myelinproteine MBP oder P2 in ihrer Abwesenheit hinsichtlich der Myelinkompaktierung zumindest teilweise kompensiert werden können.

Die Myelinproteine haben teilweise ähnliche funktionelle Eigenschaften. Es wird angenommen, dass PLP im Laufe der Evolution P0 als dominierendes Myelinprotein des ZNS ersetzt hat (Yoshida und Colman 1996). Auch wenn die Untersuchungen von Yin et al. 2015 zeigen, dass PLP und P0 im PNS nicht einfach austauschbar sind, sind Kompensationsmechanismen auch für P2 zu diskutieren. So wird bei P0-defizienten Mäusen über die Hochregulation anderer Myelinproteine wie MAG und PLP berichtet,

auch dies spricht für eine gegenseitige funktionelle Kompensation der Myelinproteine (Xu et al. 2000). P2 wie auch MBP verfügen über die Fähigkeit des Verankerns von Membranschichten und die Eigenschaft der Myelinkompaktierung (Harauz et al. 2009). So zeigten bei *in vitro*-Messungen des Lamellenabstands von Membrandoppelschichten, die durch MBP bzw. P2 kompaktiert wurden, die Membranen in beiden Fällen ähnliche Abstände, was als möglicher Hinweis auf eine vergleichbare Rolle bei der Membrankompaktierung an der *major dense line* gedeutet wurde (Ruskamo et al. 2014, Yin et al. 2015, Knoll et al. 2014). Bei der Kompaktierung der Membran scheinen MBP und P2 sogar eine synergistische Wirkung zu haben (Suresh et al. 2010). Auch P0 übernimmt Aufgaben bei der Kompaktierung der Myelinschicht (Yin et al. 1998). Dies und auch der schwache klinische Phänotyp der P2^{-/-} Mäuse und die von uns gezeigte vollständige Normalisierung ihrer Nervenleitgeschwindigkeit im Verlauf nach einer *crush*-Läsion weisen auf Kompensationsmechanismen in Bezug auf die Funktionen von P2 hin. Die Aussagekraft dieser Arbeit bezüglich einer differentiellen Myelinkompaktierung bei P2-defizienten Mäusen ist jedoch eingeschränkt, da keine elektronenmikroskopischen Aufnahmen angefertigt wurden, jedoch konnte ein größerer Myelindefekt konfokalmikroskopisch ausgeschlossen werden.

Auf RNA-Ebene sind Wechselbeziehungen durch Ausfall eines Myelinproteins bereits beschrieben, die Kompensationsmechanismen vermuten lassen. P0-negative Mauslinien exprimierten beispielsweise vermehrt PLP mRNA und reduziert PMP-22 mRNA (Xu et al. 2000).

Eine weitere mögliche Erklärung für das morphologisch unauffällige Myelin der P2-defizienten Kulturen in unseren Untersuchungen, liegt in der Verteilung von P2 auf einzelne Internodien begründet. So lässt sich P2 wie auch oben beschrieben immunzytochemisch nur in einzelnen Internodien nachweisen (Trapp et al. 1979). Die antizipierte Rolle als Fettsäuretransporter wirft die Möglichkeit auf, dass P2 sich nur im Rahmen aktiver Umbauvorgänge in der Myelinschicht befindet (Uyemura et al. 1984). Außerhalb dieser Umbauprozesse wäre P2 immunzytochemisch nicht nachweisbar. Eine andere Erklärung wäre, dass generell nur spezifische Schwannzellen P2 exprimieren. Die hochspezialisierten Funktionen der Schwannzellen unterliegen einer reversiblen axon-induzierten und autokrinen Regulation, so dass eine Schwannzelle je nach Bedarf des assoziierten Neurons myelinisierende, neurotrophe oder neuroregenerative

Funktionen übernimmt (Jessen und Mirsky 1999). Hierbei ändert sich je nach Differenzierung die Proteinexpression. Im Rahmen der Differenzierung zur myelinisierenden Schwannzelle erfolgt die Hochregulation der Proteinexpression von P0, MLP und PMP-22 und Herabregulation der Expression spezifischer Adhäsions- und Rezeptorproteine (Jessen et al. 1990). Eine selektive Differenzierung einzelner Schwannzellen zur P2-Expression böte eine Erklärung für das Nachweismuster von P2.

Welcher Faktor die Expression von P2 induzieren würde, wie auch die spezifische Rolle dieser Schwannzellen im Nerv ist jedoch bisher unklar.

Neben den gut untersuchten Myelinproteinen wurde in dieser Arbeit die SIRT mRNA analysiert. Bei den Sirtuinen handelt es sich um Deacetylasen, die regulatorischen Einfluss auf verschiedenste metabolische Prozesse in Zellen nehmen, unter anderem im Rahmen neurodegenerativer Erkrankungen (Carafa et al. 2016). SIRT spielt zudem in der Regulation der Myelinisierung im peripheren Nervensystem eine relevante Rolle (Stettner et al. 2013, Beirowski et al. 2011). In den durchgeführten rtPCR Analysen ließ sich jedoch kein Hinweis auf eine aberrante Expression detektieren.

MMP-2 und MMP-9 spielen, durch ihre Fähigkeit kollagenes Bindegewebe jedoch auch MBP und P0 abzubauen, eine Rolle bei Umbauprozessen des Myelin im zentralen und peripheren Nervensystem (Chandler et al. 1995, Hartung und Kieseier 2000). Im Rahmen von Experimenten an DRG-Kulturen, konnte gezeigt werden, dass MMPs auch auf die Myelinbildung Einfluss nehmen; so korreliert die MMP-2-Expression mit dem Grad der Myelinisierung. Durch Hemmung der MMP-2-Aktivität ist alteriertes oder reduziertes Myelin nachweisbar (Lehmann et al. 2009).

So ist neben der Rolle der MMPs im Kontext entzündlicher und degenerativer Erkrankungen im PNS (Kieseier et al. 1999) anzunehmen, dass MMP-2 und MMP-9 im Rahmen des physiologischen Myelin-Turnovers eine Rolle zukommt (Lehmann et al. 2009). In der vorliegenden Arbeit ergab sich die Aktivität der MMP-2 in den Überständen der P2-defizienten Kulturen leichtgradig erhöht. Für einen wegweisenden Rückschluss auf die Rolle von P2 bietet die vorliegende Datenlage dieser Arbeit hierzu jedoch keine ausreichende Grundlage.

5.6 Nerve Crush

Die Nervenquetschung, oder *nerve crush*, ist ein häufig angewandtes Tiermodell der Axonotmesis und wird zur standardisierten Untersuchung der Regeneration des peripheren Nerven herangezogen (Brown und Hardman 1987, De Leon et al. 1996, Unezaki et al. 2009).

Es zeigte sich nach dem Crush bereits klinisch bei den P2-defizienten Mäusen ein größeres Defizit 7 und 14 Tage nach der Nervenläsion. Korrespondierend hierzu, wiesen auch die Ergebnisse der elektrophysiologischen Untersuchungen in den Messungen der P2-defizienten Mäuse eine geringere Nervenleitgeschwindigkeit auf. Unprovokiert zeigt sich klinisch bei den P2-defizienten Tieren kein apparenter Phänotyp (Zenker et al. 2014), im Rahmen des Crush-Versuchs jedoch nun eine gesteigerte Beeinträchtigung der P2-defizienten Tiere.

Die histologische Aufarbeitung der Nervenpräparate der Versuchstiere konnte als morphologischen Korrelat hierfür in Bezug auf die relative Myelinmenge eine erhöhte G-ratio, also dünnere Myelinschichten der P2-defizienten Tiere insbesondere für großkalibrige Nervenfasern zeigen.

Allgemein gehen beim Crush durch die Quetschung des Nerven Axone zu Grunde, während das stabilisierende Bindegewebe erhalten bleibt. Das Nervengewebe distal der Quetschverletzung wird im Rahmen der Waller'schen Degeneration abgebaut und wächst schrittweise aus dem proximalen Nervenstumpf, entlang der verbliebenen bindegewebigen Leitstruktur nach distal ein - nach 4 Wochen ist eine funktionelle Erholung zu erwarten (Bridge et al. 1994).

Allgemein finden sich im Rahmen der Regenerationsvorgänge Veränderungen der Genexpression. So wird im Nerven distal der Crush-Läsion vermehrt Vimentin exprimiert, P0 und MBP jedoch herunterreguliert (Trapp et al. 1988, De Leon et al. 1991). Das Protein DA-11, Mitglied der FABP-Familie, konnte unter den hochregulierten Proteinen nach einem *nerve crush* identifiziert werden (De Leon et al. 1996). Die FABP-Familie ist eine Gruppe fettsäurebindender Proteine, der auch P2 angehört (Uyemura et al. 1984).

Eine naheliegende Hypothese ist demnach, dass auch P2 im Rahmen von Regenerationsvorgängen vermehrt exprimiert wird und somit den raschen Wiederaufbau

der Myelinschicht unterstützt. Im Falle der P2-Defizienz unterbliebe dies, was regenerative Vorgänge verzögern könnte. Der Anstieg der Internodallänge im Prozess der Myelinisierung wird dabei durch die vermehrte Produktion von Lipidmembran gesteuert (Muse et al. 2001). Ein verzögerter Einbau der Lipide in die Membran würde demnach in vorübergehend verkürzten Internodien respektive verbreiterten Ranvier'schen Schnürringen resultieren – dies konnte im Rahmen dieser Arbeit *in vitro* nachgewiesen werden. Auch die Myelindicke – primär abhängig von der Anzahl der Membranlamellen - würde durch eine Lipideinbaustörung negativ beeinflusst. Eine verminderte Myelinscheidendicke konnte in den P2-/- Nervenpräparaten 7 Tage nach Crush-Läsion gezeigt werden. Eine solche Verzögerung der Regeneration der Myelinschicht würde funktionell in einer verlangsamten Regeneration der Leitfähigkeit eines verletzten Nerven resultieren, wie sie für die P2-defizienten Mäuse in der elektrophysiologischen Messung gezeigt werden konnte.

Zum Beweis der Kausalität dieser Ergebnisse sind zwar weitere Untersuchungen notwendig, doch erscheint ein Zusammenhang zum jetzigen Zeitpunkt naheliegend.

6 Schlussfolgerungen

In dieser Arbeit wurde die Fragestellung der funktionellen Relevanz der P2-Defizienz nachgegangen. Es konnte gezeigt werden, dass P2 insbesondere im Rahmen der Remyelinisierung eine Rolle hinsichtlich des morphologischen Aufbaus und der Funktion des Myelins einnimmt. Dies unterstreichen sowohl die Ergebnisse der funktionellen Testung *in vivo*, wie auch die strukturellen Veränderungen der Nodalregion *in vitro*.

Auch wenn zur Bestätigung dieser Annahme weitere Untersuchungen notwendig sind, so scheint ein Zusammenhang zwischen der Verbreiterung der Nodalregion und der Abnahme der Nervenleitgeschwindigkeit plausibel. Inwieweit diese Veränderungen durch Umbauprozesse von Matrix-Metalloproteasen insbesondere MMP2 beeinflusst werden, kann nur vermutet werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind als Wegweiser für die weitere dezidierte Untersuchung der Nodalregion und der im Rahmen der Remyelinisierung vorgehenden Umbauprozesse zu verstehen. So werden zukünftige Arbeiten auf den hier gewonnenen Ergebnissen aufbauen um den Einfluss von P2 auf die Myelinbildung im PNS weiter zu dechiffrieren.

7 Literatur- und Quellenverzeichnis

- Abercrombie, M. and M. L. Johnson (1946). "Quantitative histology of Wallerian degeneration: I. Nuclear population in rabbit sciatic nerve." J Anat 80(Pt 1): 37-50.
- Aggarwal, S., L. Yurlova, N. Snaidero, C. Reetz, S. Frey, J. Zimmermann, G. Pähler, A. Janshoff, J. Friedrichs, Daniel J. Müller, C. Goebel and M. Simons (2011). "A Size Barrier Limits Protein Diffusion at the Cell Surface to Generate Lipid-Rich Myelin-Membrane Sheets." Developmental Cell 21(3): 445-456.
- Amor, V., K. Feinberg, Y. Eshed-Eisenbach, A. Vainshtein, S. Frechter, M. Grumet, J. Rosenbluth and E. Peles (2014). "Long-term maintenance of Na⁺ channels at nodes of Ranvier depends on glial contact mediated by gliomedin and NrCAM." J Neurosci 34(15): 5089-5098.
- Araki, T., Y. Sasaki and J. Milbrandt (2004). "Increased nuclear NAD biosynthesis and SIRT1 activation prevent axonal degeneration." Science 305(5686): 1010-1013.
- Asakura, K., A. Ueda and T. Mutoh (2015). "Lipid rafts and their possible involvements in neuroimmunological disorders." Front Biosci (Landmark Ed) 20: 303-313.
- Basak, S., K. Raju, J. Babiarz, N. Kane-Goldsmith, D. Koticha and M. Grumet (2007). "Differential expression and functions of neuronal and glial neurofascin isoforms and splice variants during PNS development." Dev Biol 311(2): 408-422.
- Bear, R. S. and F. O. Schmitt (1937). "Optical properties of the axon sheaths of crustacean nerves." Journal of Cellular and Comparative Physiology 9(2): 275-287.
- Beirowski, B., J. Gustin, S. M. Armour, H. Yamamoto, A. Viader, B. J. North, S. Michan, R. H. Baloh, J. P. Golden, R. E. Schmidt, D. A. Sinclair, J. Auwerx and J. Milbrandt (2011). "Sir-two-homolog 2 (Sirt2) modulates peripheral myelination through polarity protein Par-3/atypical protein kinase C (aPKC) signaling." Proc Natl Acad Sci U S A 108(43): E952-961.
- Bharucha, V. A., K. W. Peden, B. R. Subach, V. Narayanan and G. I. Tennekoon (1993). "Characterization of the cis-acting elements of the mouse myelin P2 promoter." J Neurosci Res 36(5): 508-519.
- Bridge, P. M., D. J. Ball, S. E. Mackinnon, Y. Nakao, K. Brandt, D. A. Hunter and C. Hertl (1994). "Nerve crush injuries--a model for axonotmesis." Exp Neurol 127(2): 284-

290.

Brown, M. C. and V. J. Hardman (1987). "A reassessment of the accuracy of reinnervation by motoneurons following crushing or freezing of the sciatic or lumbar spinal nerves of rats." Brain 110 (Pt 3): 695-705.

Buchthal, F., F. Carlsen and F. Behse (1987). "Schmidt-Lanterman clefts: a morphometric study in human sural nerve." Am J Anat 180(2): 156-160.

Caldwell, J. H., K. L. Schaller, R. S. Lasher, E. Peles and S. R. Levinson (2000). "Sodium channel Na(v)1.6 is localized at nodes of ranvier, dendrites, and synapses." Proc Natl Acad Sci U S A 97(10): 5616-5620.

Campbell, E. O., R. A. Samlan, N. T. McMullen, S. Cook, S. Smiley-Jewell and J. Barkmeier-Kraemer (2013). "Developmental changes in the connective tissues of the porcine recurrent laryngeal nerve." J Anat 222(6): 625-633.

Carafa, V., D. Rotili, M. Forgione, F. Cuomo, E. Serretiello, G. S. Hailu, E. Jarho, M. Lahtela-Kakkonen, A. Mai and L. Altucci (2016). "Sirtuin functions and modulation: from chemistry to the clinic." Clin Epigenetics 8: 61.

Chandler, S., R. Coates, A. Gearing, J. Lury, G. Wells and E. Bone (1995). "Matrix metalloproteinases degrade myelin basic protein." Neurosci Lett 201(3): 223-226.

Chang, K. T. and K. T. Min (2002). "Regulation of lifespan by histone deacetylase." Ageing Res Rev 1(3): 313-326.

Chen, Z. L., W. M. Yu and S. Strickland (2007). "Peripheral regeneration." Annu Rev Neurosci 30: 209-233.

Chomiak, T. and B. Hu (2009). "What is the optimal value of the g-ratio for myelinated fibers in the rat CNS? A theoretical approach." PLoS One 4(11): e7754.

Chrast, R., G. Saher, K. A. Nave and M. H. Verheijen (2011). "Lipid metabolism in myelinating glial cells: lessons from human inherited disorders and mouse models." J Lipid Res 52(3): 419-434.

Cooper, R. A. (1978). "Influence of increased membrane cholesterol on membrane fluidity and cell function in human red blood cells." J Supramol Struct 8(4): 413-430.

Cragg, B. G. and P. K. Thomas (1957). "The relationships between conduction velocity

and the diameter and internodal length of peripheral nerve fibres." J Physiol 136(3): 606-614.

De Leon, M., A. A. Welcher, R. H. Nahin, Y. Liu, M. A. Ruda, E. M. Shooter and C. A. Molina (1996). "Fatty acid binding protein is induced in neurons of the dorsal root ganglia after peripheral nerve injury." J Neurosci Res 44(3): 283-292.

De Leon, M., A. A. Welcher, U. Suter and E. M. Shooter (1991). "Identification of transcriptionally regulated genes after sciatic nerve injury." J Neurosci Res 29(4): 437-448.

Dekker, D. M., J. J. Briaire and J. H. Frijns (2014). "The impact of internodal segmentation in biophysical nerve fiber models." J Comput Neurosci 37(2): 307-315.

Einheber, S., G. Zanazzi, W. Ching, S. Scherer, T. A. Milner, E. Peles and J. L. Salzer (1997). "The axonal membrane protein Caspr, a homologue of neurexin IV, is a component of the septate-like paranodal junctions that assemble during myelination." J Cell Biol 139(6): 1495-1506.

Frankowski, H., Y. H. Gu, J. H. Heo, R. Milner and G. J. Del Zoppo (2012). "Use of gel zymography to examine matrix metalloproteinase (gelatinase) expression in brain tissue or in primary glial cultures." Methods Mol Biol 814: 221-233.

Garbern, J. Y., F. Cambi, X.-M. Tang, A. A. F. Sima, J. M. Vallat, E. P. Bosch, R. Lewis, M. Shy, J. Sohi, G. Kraft, K. L. Chen, I. Joshi, D. G. B. Leonard, W. Johnson, W. Raskind, S. R. Dlouhy, V. Pratt, M. E. Hodes, T. Bird and J. Kamholz (1997). "Proteolipid Protein Is Necessary in Peripheral as Well as Central Myelin." Neuron 19(1): 205-218.

Gaupp, S., H. P. Hartung, K. Toyka and S. Jung (1997). "Modulation of experimental autoimmune neuritis in Lewis rats by oral application of myelin antigens." J Neuroimmunol 79(2): 129-137.

Giese, K. P., R. Martini, G. Lemke, P. Soriano and M. Schachner (1992). "Mouse P0 gene disruption leads to hypomyelination, abnormal expression of recognition molecules, and degeneration of myelin and axons." Cell 71(4): 565-576.

Gollan, L., D. Salomon, J. L. Salzer and E. Peles (2003). "Caspr regulates the processing of contactin and inhibits its binding to neurofascin." J Cell Biol 163(6):

1213-1218.

Gordon, A., K. Adamsky, A. Vainshtein, S. Frechter, J. L. Dupree, J. Rosenbluth and E. Peles (2014). "Caspr and caspr2 are required for both radial and longitudinal organization of myelinated axons." J Neurosci 34(45): 14820-14826.

Greenfield, S., S. Brostoff, E. H. Eylar and P. Morell (1973). "Protein composition of myelin of the peripheral nervous system." J Neurochem 20(4): 1207-1216.

Guo, J., L. Wang, Y. Zhang, J. Wu, S. Arpag, B. Hu, B. A. Imhof, X. Tian, B. D. Carter, U. Suter and J. Li (2014). "Abnormal junctions and permeability of myelin in PMP22-deficient nerves." Ann Neurol 75(2): 255-265.

Harauz, G., V. Ladizhansky and J. M. Boggs (2009). "Structural polymorphism and multifunctionality of myelin basic protein." Biochemistry 48(34): 8094-8104.

Hartung, H. P. and B. C. Kieseier (2000). "The role of matrix metalloproteinases in autoimmune damage to the central and peripheral nervous system." J Neuroimmunol 107(2): 140-147.

Hassan, S. and E. M. Lieberman (1988). "Studies of axon-glia cell interactions and periaxonal K⁺ homeostasis--II. The effect of axonal stimulation, cholinergic agents and transport inhibitors on the resistance in series with the axon membrane." Neuroscience 25(3): 961-969.

Hayasaka, K., M. Himoro, G. Takada, E. Takahashi, S. Minoshima and N. Shimizu (1993). "Structure and localization of the gene encoding human peripheral myelin protein 2 (PMP2)." Genomics 18(2): 244-248.

Hodes, M. E., V. M. Pratt and S. R. Dlouhy (1993). "Genetics of Pelizaeus-Merzbacher disease." Dev Neurosci 15(6): 383-394.

Hopkins, W. F., M. L. Allen, K. M. Houamed and B. L. Tempel (1994). "Properties of voltage-gated K⁺ currents expressed in *Xenopus* oocytes by mKv1.1, mKv1.2 and their heteromultimers as revealed by mutagenesis of the dendrotoxin-binding site in mKv1.1." Pflugers Arch 428(3-4): 382-390.

Hughes, P. M., G. M. Wells, J. M. Clements, A. J. Gearing, E. J. Redford, M. Davies, K. J. Smith, R. A. Hughes, M. C. Brown and K. M. Miller (1998). "Matrix metalloproteinase expression during experimental autoimmune neuritis." Brain 121 (Pt

3): 481-494.

Ioannidou, K., K. I. Anderson, D. Strachan, J. M. Edgar and S. C. Barnett (2012). "Time-lapse imaging of the dynamics of CNS glial-axonal interactions in vitro and ex vivo." PLoS One 7(1): e30775.

Jessen, K. R. and R. Mirsky (1999). "Schwann cells and their precursors emerge as major regulators of nerve development." Trends Neurosci 22(9): 402-410.

Jessen, K. R. and R. Mirsky (2005). "The origin and development of glial cells in peripheral nerves." Nat Rev Neurosci 6(9): 671-682.

Jessen, K. R., L. Morgan, H. J. Stewart and R. Mirsky (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(1): 91-103.

Jung, S., S. Gaupp, H. P. Hartung and K. V. Toyka (2001). "Oral tolerance in experimental autoimmune neuritis (EAN) of the Lewis rat. II. Adjuvant effects and bystander suppression in P2 peptide-induced EAN." J Neuroimmunol 116(1): 21-28.

Kadlubowski, M., R. A. Hughes and N. A. Gregson (1984). "Spontaneous and experimental neuritis and the distribution of the myelin protein P2 in the nervous system." J Neurochem 42(1): 123-129.

Kadlubowski, M. and R. A. C. Hughes (1979). "Identification of the neuritogen for experimental allergic neuritis." Nature 277(5692): 140-142.

Khalili-Shirazi, A., P. Atkinson, N. Gregson and R. A. Hughes (1993). "Antibody responses to P0 and P2 myelin proteins in Guillain-Barre syndrome and chronic idiopathic demyelinating polyradiculoneuropathy." J Neuroimmunol 46(1-2): 245-251.

Kidd, G. J., N. Ohno and B. D. Trapp (2013). "Biology of Schwann cells." Handb Clin Neurol 115: 55-79.

Kieseier, B. C., J. M. Clements, H. B. Pischel, G. M. Wells, K. Miller, A. J. Gearing and H. P. Hartung (1998). "Matrix metalloproteinases MMP-9 and MMP-7 are expressed in experimental autoimmune neuritis and the Guillain-Barre syndrome." Ann Neurol 43(4): 427-434.

Kieseier, B. C., T. Seifert, G. Giovannoni and H. P. Hartung (1999). "Matrix metalloproteinases in inflammatory demyelination: targets for treatment." Neurology 53(1): 20-25.

- Kim, Y., A. G. Remacle, A. V. Chernov, H. Liu, I. Shubayev, C. Lai, J. Dolkas, S. A. Shiryaev, V. S. Golubkov, A. P. Mizisin, A. Y. Strongin and V. I. Shubayev (2012). "The MMP-9/TIMP-1 axis controls the status of differentiation and function of myelin-forming Schwann cells in nerve regeneration." PLoS One 7(3): e33664.
- Kirschner, D. A. and A. L. Ganser (1980). "Compact myelin exists in the absence of basic protein in the shiverer mutant mouse." Nature 283(5743): 207-210.
- Knoll, W., J. Peters, P. Kursula, Y. Gerelli, J. Ollivier, B. Deme, M. Telling, E. Kemner and F. Natali (2014). "Structural and dynamical properties of reconstituted myelin sheaths in the presence of myelin proteins MBP and P2 studied by neutron scattering." Soft Matter 10(3): 519-529.
- Ko, H. J., S. A. Kinkel, F. X. Hubert, Z. Nasa, J. Chan, C. Siatskas, P. Hirubalan, B. H. Toh, H. S. Scott and F. Alderuccio (2010). "Transplantation of autoimmune regulator-encoding bone marrow cells delays the onset of experimental autoimmune encephalomyelitis." Eur J Immunol 40(12): 3499-3509.
- Kordeli, E., S. Lambert and V. Bennett (1995). "AnkyrinG. A new ankyrin gene with neural-specific isoforms localized at the axonal initial segment and node of Ranvier." J Biol Chem 270(5): 2352-2359.
- Koticha, D., P. Maurel, G. Zanazzi, N. Kane-Goldsmith, S. Basak, J. Babiarez, J. Salzer and M. Grumet (2006). "Neurofascin interactions play a critical role in clustering sodium channels, ankyrin G and beta IV spectrin at peripheral nodes of Ranvier." Dev Biol 293(1): 1-12.
- Lehmann, H. C., A. Kohne, F. Bernal, P. Jangouk, G. Meyer Zu Horste, T. Dehmel, H. P. Hartung, S. C. Previtali and B. C. Kieseier (2009). "Matrix metalloproteinase-2 is involved in myelination of dorsal root ganglia neurons." Glia 57(5): 479-489.
- Lemke, G. and R. Axel (1985). "Isolation and sequence of a cDNA encoding the major structural protein of peripheral myelin." Cell 40(3): 501-508.
- Lindberg, R. L., C. J. De Groot, L. Montagne, P. Freitag, P. van der Valk, L. Kappos and D. Leppert (2001). "The expression profile of matrix metalloproteinases (MMPs) and their inhibitors (TIMPs) in lesions and normal appearing white matter of multiple

sclerosis." Brain 124(Pt 9): 1743-1753.

Liu, H., Y. Kim, S. Chattopadhyay, I. Shubayev, J. Dolkas and V. I. Shubayev (2010). "Matrix metalloproteinase inhibition enhances the rate of nerve regeneration in vivo by promoting dedifferentiation and mitosis of supporting schwann cells." J Neuropathol Exp Neurol 69(4): 386-395.

Luft, J. H. (1961). "Improvements in epoxy resin embedding methods." J Biophys Biochem Cytol 9: 409-414.

Majava, V., E. Polverini, A. Mazzini, R. Nanekar, W. Knoll, J. Peters, F. Natali, P. Baumgartel, I. Kursula and P. Kursula (2010). "Structural and functional characterization of human peripheral nervous system myelin protein P2." PLoS One 5(4): e10300.

Makowska, A., J. Pritchard, L. Sanvito, N. Gregson, M. Peakman, A. Hayday and R. Hughes (2008). "Immune responses to myelin proteins in Guillain-Barre syndrome." J Neurol Neurosurg Psychiatry 79(6): 664-671.

Martini, R., M. H. Mohajeri, S. Kasper, K. P. Giese and M. Schachner (1995). "Mice doubly deficient in the genes for P0 and myelin basic protein show that both proteins contribute to the formation of the major dense line in peripheral nerve myelin." J Neurosci 15(6): 4488-4495.

Maurel, P., S. Einheber, J. Galinska, P. Thaker, I. Lam, M. B. Rubin, S. S. Scherer, Y. Murakami, D. H. Gutmann and J. L. Salzer (2007). "Nectin-like proteins mediate axon Schwann cell interactions along the internode and are essential for myelination." J Cell Biol 178(5): 861-874.

Muse, E. D., H. Jurevics, A. D. Toews, G. K. Matsushima and P. Morell (2001). "Parameters related to lipid metabolism as markers of myelination in mouse brain." J Neurochem 76(1): 77-86.

Narayanan, V., K. H. Kaestner and G. I. Tennekoon (1991). "Structure of the mouse myelin P2 protein gene." J Neurochem 57(1): 75-80.

Narayanan, V., B. Ripepi, E. W. Jabs, A. Hawkins, C. Griffin and G. Tennekoon (1994). "Partial structure and mapping of the human myelin P2 protein gene." J Neurochem 63(6): 2010-2013.

Pedrola, L., A. Espert, X. Wu, R. Claramunt, M. E. Shy and F. Palau (2005). "GDAP1, the protein causing Charcot-Marie-Tooth disease type 4A, is expressed in neurons and is associated with mitochondria." Hum Mol Genet 14(8): 1087-1094.

Pham-Dinh, D., M. C. Birling, G. Roussel, A. Dautigny and J. L. Nussbaum (1991). "Proteolipid DM-20 predominates over PLP in peripheral nervous system." Neuroreport 2(2): 89-92.

Poliak, S., L. Gollan, R. Martinez, A. Custer, S. Einheber, J. L. Salzer, J. S. Trimmer, P. Shrager and E. Peles (1999). "Caspr2, a new member of the neurexin superfamily, is localized at the juxtaparanodes of myelinated axons and associates with K⁺ channels." Neuron 24(4): 1037-1047.

Raeymaekers, P., V. Timmerman, E. Nelis, P. De Jonghe, J. E. Hoogendijk, F. Baas, D. F. Barker, J. J. Martin, M. De Visser, P. A. Bolhuis and et al. (1991). "Duplication in chromosome 17p11.2 in Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 1a (CMT 1a). The HMSN Collaborative Research Group." Neuromuscul Disord 1(2): 93-97.

Rawlins, F. A., G. M. Villegas, E. T. Hedley-Whyte and B. G. Uzman (1972). "Fine structural localization of cholesterol-1,2- 3 H in degenerating and regenerating mouse sciatic nerve." J Cell Biol 52(3): 615-625.

Rios, J. C., C. V. Melendez-Vasquez, S. Einheber, M. Lustig, M. Grumet, J. Hemperly, E. Peles and J. L. Salzer (2000). "Contactin-associated protein (Caspr) and contactin form a complex that is targeted to the paranodal junctions during myelination." J Neurosci 20(22): 8354-8364.

Roomi, M. W., A. Ishaque, N. R. Khan and E. H. Eylar (1978). "The PO protein. The major glycoprotein of peripheral nerve myelin." Biochim Biophys Acta 536(1): 112-121.

Ruskamo, S., R. P. Yadav, S. Sharma, M. Lehtimäki, S. Laulumaa, S. Aggarwal, M. Simons, J. Burck, A. S. Ulrich, A. H. Juffer, I. Kursula and P. Kursula (2014). "Atomic resolution view into the structure-function relationships of the human myelin peripheral membrane protein P2." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 70(Pt 1): 165-176.

Saher, G., B. Brügger, C. Lappe-Siefke, W. Möbius, R. I. Tozawa, M. C. Wehr, F. Wieland, S. Ishibashi and K. A. Nave (2005). "High cholesterol level is essential for

myelin membrane growth." Nature Neuroscience 8(4): 468-475.

Saher, G., S. Quintes, W. Möbius, M. C. Wehr, E.-M. Krämer-Albers, B. Brügger and K.-A. Nave (2009). "Cholesterol Regulates the Endoplasmic Reticulum Exit of the Major Membrane Protein P0 Required for Peripheral Myelin Compaction." The Journal of Neuroscience 29(19): 6094-6104.

Samsam, M., R. Frei, M. Marziniak, R. Martini and C. Sommer (2002). "Impaired sensory function in heterozygous P0 knockout mice is associated with nodal changes in sensory nerves." J Neurosci Res 67(2): 167-173.

Sanders, F. K. and D. Whitteridge (1946). "Conduction velocity and myelin thickness in regenerating nerve fibres." J Physiol 105(2): 152-174.

Saporta, M. A., I. Katona, R. A. Lewis, S. Masse, M. E. Shy and J. Li (2009). "Shortened internodal length of dermal myelinated nerve fibres in Charcot-Marie-Tooth disease type 1A." Brain 132(Pt 12): 3263-3273.

Scherer, S. S. and E. J. Arroyo (2002). "Recent progress on the molecular organization of myelinated axons." J Peripher Nerv Syst 7(1): 1-12.

Scherer, S. S., D. Y. Wang, R. Kuhn, G. Lemke, L. Wrabetz and J. Kamholz (1994). "Axons regulate Schwann cell expression of the POU transcription factor SCIP." J Neurosci 14(4): 1930-1942.

Schoser, B. G. and D. Blottner (1999). "Matrix metalloproteinases MMP-2, MMP-7 and MMP-9 in denervated human muscle." Neuroreport 10(13): 2795-2797.

Sedava, H., Heller, Berenbaum (2011). "Purves Biologie." 9.Auflage.

Smith, C. M., E. Cooksey and I. D. Duncan (2013). "Myelin loss does not lead to axonal degeneration in a long-lived model of chronic demyelination." J Neurosci 33(6): 2718-2727.

Snipes, G. J., U. Suter, A. A. Welcher and E. M. Shooter (1992). "Characterization of a novel peripheral nervous system myelin protein (PMP-22/SR13)." J Cell Biol 117(1): 225-238.

Sonig, A., V. Gandhi and A. Nanda (2014). "From the cell of Schwann to schwannoma--a century's fruition." World Neurosurg 82(5): 906-911.

- Stettner, M., K. Wolfram, A. K. Mausberg, P. Albrecht, A. Derksen, A. Methner, T. Dehmel, H. P. Hartung, H. Dietrich and B. C. Kieseier (2013). "Promoting myelination in an in vitro mouse model of the peripheral nervous system: the effect of wine ingredients [corrected]." PLoS One 8(6): e66079.
- Stettner, M., K. Wolfram, A. K. Mausberg, C. Wolf, S. Heikaus, A. Derksen, T. Dehmel and B. C. Kieseier (2013). "A reliable in vitro model for studying peripheral nerve myelination in mouse." J Neurosci Methods 214(1): 69-79.
- Stewart, H. J., A. Brennan, M. Rahman, G. Zoidl, P. J. Mitchell, K. R. Jessen and R. Mirsky (2001). "Developmental regulation and overexpression of the transcription factor AP-2, a potential regulator of the timing of Schwann cell generation." Eur J Neurosci 14(2): 363-372.
- Sunderland, S. (1951). "A classification of peripheral nerve injuries producing loss of function." Brain 74(4): 491-516.
- Suresh, S., C. Wang, R. Nanekar, P. Kursula and J. M. Edwardson (2010). "Myelin basic protein and myelin protein 2 act synergistically to cause stacking of lipid bilayers." Biochemistry 49(16): 3456-3463.
- Suzuki, M., K. Kitamura, Y. Sakamoto and K. Uyemura (1982). "The complete amino acid sequence of human P2 protein." J Neurochem 39(6): 1759-1762.
- Tait, S., F. Gunn-Moore, J. M. Collinson, J. Huang, C. Lubetzki, L. Pedraza, D. L. Sherman, D. R. Colman and P. J. Brophy (2000). "An oligodendrocyte cell adhesion molecule at the site of assembly of the paranodal axo-glial junction." J Cell Biol 150(3): 657-666.
- Szepanowski F, D.M. Donaldson, H.P. Hartung, A.K. Mausberg, C. Kleinschnitz, B.C. Kieseier, M. Stettner (2017). „Dimethyl fumarate accelerates peripheral nerve regeneration via activation of the anti-inflammatory and cytoprotective Nrf2/HO-1 signaling pathway.“Acta Neuropathol. 133(3):489-491
- Trapp, B. D., S. B. Andrews, A. Wong, M. O'Connell and J. W. Griffin (1989). "Co-localization of the myelin-associated glycoprotein and the microfilament components, F-actin and spectrin, in Schwann cells of myelinated nerve fibres." J Neurocytol 18(1): 47-60.

Trapp, B. D., P. Hauer and G. Lemke **(1988)**. "Axonal regulation of myelin protein mRNA levels in actively myelinating Schwann cells." J Neurosci 8(9): 3515-3521.

Trapp, B. D., L. J. McIntyre, R. H. Quarles, N. H. Sternberger and H. D. Webster **(1979)**. "Immunocytochemical localization of rat peripheral nervous system myelin proteins: P2 protein is not a component of all peripheral nervous system myelin sheaths." Proc Natl Acad Sci U S A 76(7): 3552-3556.

Unezaki, S., S. Yoshii, T. Mabuchi, A. Saito and S. Ito **(2009)**. "Effects of neurotrophic factors on nerve regeneration monitored by in vivo imaging in thyl-YFP transgenic mice." J Neurosci Methods 178(2): 308-315.

Uyemura, K., K. Yoshimura, M. Suzuki and K. Kitamura **(1984)**. "Lipid binding activities of the P2 protein in peripheral nerve myelin." Neurochem Res 9(10): 1509-1514.

Vinson, M., O. Rausch, P. R. Maycox, R. K. Prinjha, D. Chapman, R. Morrow, A. J. Harper, C. Dingwall, F. S. Walsh, S. A. Burbidge and D. R. Riddell **(2003)**. "Lipid rafts mediate the interaction between myelin-associated glycoprotein (MAG) on myelin and MAG-receptors on neurons." Mol Cell Neurosci 22(3): 344-352.

Waksman, B. H. and R. D. Adams **(1955)**. "Allergic neuritis: an experimental disease of rabbits induced by the injection of peripheral nervous tissue and adjuvants." J Exp Med 102(2): 213-236.

Wang, R. H., K. Sengupta, C. Li, H. S. Kim, L. Cao, C. Xiao, S. Kim, X. Xu, Y. Zheng, B. Chilton, R. Jia, Z. M. Zheng, E. Appella, X. W. Wang, T. Ried and C. X. Deng **(2008)**. "Impaired DNA damage response, genome instability, and tumorigenesis in SIRT1 mutant mice." Cancer Cell 14(4): 312-323.

Weishaupt, A., R. Gold, S. Gaupp, G. Giegerich, H. P. Hartung and K. V. Toyka **(1997)**. "Antigen therapy eliminates T cell inflammation by apoptosis: effective treatment of experimental autoimmune neuritis with recombinant myelin protein P2." Proc Natl Acad Sci U S A 94(4): 1338-1343.

Wu, L. M., A. Williams, A. Delaney, D. L. Sherman and P. J. Brophy **(2012)**. "Increasing internodal distance in myelinated nerves accelerates nerve conduction to a flat maximum." Curr Biol 22(20): 1957-1961.

- Xu, W., D. Manichella, H. Jiang, J. M. Vallat, J. Lilien, P. Baron, G. Scarlato, J. Kamholz and M. E. Shy **(2000)**. "Absence of P0 leads to the dysregulation of myelin gene expression and myelin morphogenesis." J Neurosci Res 60(6): 714-724.
- Yin, X., T. O. Crawford, J. W. Griffin, P. Tu, V. M. Lee, C. Li, J. Roder and B. D. Trapp **(1998)**. "Myelin-associated glycoprotein is a myelin signal that modulates the caliber of myelinated axons." J Neurosci 18(6): 1953-1962.
- Yin, X., S. Kiryu-Seo, G. J. Kidd, M. L. Feltri, L. Wrabetz and B. D. Trapp **(2015)**. "Proteolipid protein cannot replace P0 protein as the major structural protein of peripheral nervous system myelin." Glia 63(1): 66-77.
- Yoshida, M. and D. R. Colman **(1996)**. "Parallel evolution and coexpression of the proteolipid proteins and protein zero in vertebrate myelin." Neuron 16(6): 1115-1126.
- Zenker, J., M. Stettner, S. Ruskamo, E. Domenech-Estevez, H. Baloui, J. J. Medard, M. H. Verheijen, J. F. Brouwers, P. Kursula, B. C. Kieseier and R. Chrast **(2014)**. "A role of peripheral myelin protein 2 in lipid homeostasis of myelinating Schwann cells." Glia 62(9): 1502-1512.
- Zhu, T. S. and M. Glaser **(2008)**. "Neuroprotection and enhancement of remyelination by estradiol and dexamethasone in cocultures of rat DRG neurons and Schwann cells." Brain Res 1206: 20-32.

Danksagung

Ich bedanke mich herzlich bei meinem Betreuer Dr. Dr. Mark Stettner für sein herausragendes Engagement und große Geduld durch alle Phasen der Arbeit.

Weiterhin gilt mein Dank Kathleen Ingenhoven, Thomas Dehmel und Zippora Kohne sowie dem gesamten Laborteam der Arbeitsgemeinschaft für die tatkräftige Unterstützung und freundschaftliche Zusammenarbeit.

Auch Herrn Prof. Dr. B.C. Kieseier möchte ich meinen herzlichen Dank aussprechen für die Möglichkeit mich mit diesem spannenden Thema in diesem Umfang auseinandersetzen zu können.