

Aus der Neurologischen Klinik und Poliklinik und dem
Institut für klinische Neurobiologie
der Universität Würzburg
Direktor: Prof. Dr. med. Klaus V. Toyka

**Mechanismen der Makrophagen-Aktivierung in Connexin32-
defizienten Mäusen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Juliane Greeske

aus Greifswald

Würzburg, Februar 2008

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Rudolf Martini

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Andreas Weishaupt

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung:

9. Mai 2008

Die Promovendin ist Ärztin.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Abbildungsverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VI
1 Einleitung	1
1.1 Hereditäre periphere Neuropathien	1
1.2 Aufbau einer myelinisierten Nervenfasern im peripheren Nervensystem	3
1.3 Connexin32 und seine Funktion im peripheren Nervensystem	5
1.4 Tiermodelle für CMT zeigen eine immunvermittelte Demyelinisierung.....	6
1.4.1 P ₀ -heterozygot-defiziente Mäuse als Mausmodell	7
1.4.2 Connexin32-defiziente Mäuse.....	8
1.4.3 Molekulare Mechanismen der Zytokinexpression	11
1.5 Ziel der Arbeit	12
2 Material und Methoden	14
2.1 Versuchstiere	14
2.2 Gewinnung des Gewebes/Präparation peripherer Nerven	14
2.3 Proteinisolation.....	14
2.4 Proteinbestimmung nach Lowry	15
2.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	15
2.6 Western Blot.....	16
2.7 Antikörper-Reaktionen.....	17
2.8 Auswertung der Western Blot Analysen durch das Graphikprogramm ImageJ	19
2.9 Zellkultur als Kontrollen für die Western Blot Analysen	19
2.10 Sequentielle Isolation von RNA, DNA und Protein aus peripheren Nerven	20
2.10.1 RNA-Isolation	21
2.10.2 DNA- Isolierung.....	21
2.10.3 Proteinisolierung	21
2.11 RNA – Agarosegelelektrophorese.....	22
2.12 Photometrische Bestimmung der RNA	22
2.13 Reverse Transkription	23
2.14 Realtime PCR (TaqMan [®] PCR)	24
3 Ergebnisse	26
3.1 Einleitung	26
3.2 Ergebnisse zum Aktivierungsstatus verschiedener Signalkaskaden	26
3.2.1 Aktivitätsstatus der Signaltransduktionswege STAT 1 α , NF κ B, p38-MAP- Kinase und JNK.....	27
3.2.2 Aktivierungsstatus der ERK 1/2-Signalkaskade	29
3.2.3 Aktivierungsstatus der MEK 1/2 in der ERK 1/2 Signalkaskade	34
3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse zur Aktivierung der untersuchten Signalkaskaden	37
3.4 Ergebnisse der semiquantitativen Realtime PCR.....	38
3.5 Zusammenfassung der Ergebnisse	39
4 Diskussion	41
4.1 Aktivierungsstatus von ERK 1/2 in P ₀ -heterozygot- und Cx32-defizienten Mäusen	41
4.1.1 P ₀ und Cx32 erfüllen im peripheren Nervensystem unterschiedliche Funktionen.....	41
4.1.2 Mutationen von P ₀ und Cx32 lösen unterschiedliche zelluläre Signale aus	42

4.1.3	Keine ERK 1/2 Aktivierung in Cx32-defizienten Mäusen in Bezug auf einen gemeinsamen Mechanismus der Aktivierung von Makrophagen in Mausmodellen für CMT	44
4.2	Unterschiedlicher Aktivierungsstatus der ERK-Signalkaskade in männlichen und weiblichen Cx32-defizienten Mäusen	45
4.2.1	Primär unterschiedliche Genexpression in männlichen und weiblichen Mäusen	45
4.2.2	Einfluss von hormonellen Unterschieden zwischen weiblichen und männlichen Mäusen.....	46
5	Zusammenfassung.....	49
	Literaturverzeichnis.....	51
	Anhang	1

Abbildungsverzeichnis

	Seite
Abbildung 1: Schematischer Aufbau eines myelinisierten Axons im PNS	4
Abbildung 2: Schematische Ansicht der Proteine des kompakten und nicht-kompakten Myelins.....	5
Abbildung 3: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer myelinisierten Nervenfasern einer Cx32-defizienten Maus im Alter von sechs Monaten.....	8
Abbildung 4: Elektronenmikroskopische Aufnahme nach einer F4/80-Färbung von Makrophagen in ventraler Spinalwurzel von 6 Monate alten Cx32-defizienten Mäusen	10
Abbildung 5: Makrophagen (F4/80-Färbung) in Quadricepsnerven.....	10
Abbildung 6: Relative Genexpression des Zytokins MCP-1 in Wildtypmäusen und Cx32-defizienten Mäusen im Alter von einem, drei und zwölf Monaten.....	11
Abbildung 7: Relative Genexpression des Zytokins M-CSF in Wildtypmäusen und Cx32-defizienten Mäusen im Alter von einem, drei und zwölf Monaten.....	11
Abbildung 8: Detektion von phosphorylierten STAT-Proteinen in Cx32-defizienten und Wildtypmäusen im Alter von zwei Monaten:	27
Abbildung 9: Detektion von phosphorylierten I κ B α -Proteinen in drei Monate alten Cx32-defizienten und Wildtypmäusen.....	28
Abbildung 10: Detektion von phosphorylierten I κ B α - Proteinen in einen, zwei und drei Monate alten Cx32-defizienten Mäusen	28
Abbildung 11: Detektion von phosphorylierten p38-MAPK-Proteinen in Cx32-defizienten und Wildtypmäusen im Alter von einem und zwei Monaten.....	29
Abbildung 12: Detektion von JNK-Proteinen in einen Monat alten Mäusen	29
Abbildung 13: Detektion von ERK 1/2 Proteinen in Cx32- und P ₀ -heterozygot-defizienten Mäusen im Alter von einem Monat.....	30
Abbildung 14: Detektion von phosphorylierten ERK-Proteinen in Cx32-defizienten und Wildtypmäusen im Alter von einem Monat.....	31
Abbildung 15: Detektion von phosphorylierten ERK-Proteinen in Cx32-defizienten und Wildtypmäusen im Alter von zwei Monaten	32
Abbildung 16: Detektion von ERK 1/2-Proteinen in Cx32-defizienten, P ₀ -heterozygot-defizienten und Wildtyp-Mäusen im Alter von drei Monaten	33
Abbildung 17: Detektion von phosphorylierten MEK-Proteinen von Cx32-defizienten und Wildtypmäusen im Alter von einem Monat.....	35
Abbildung 18: Detektion von phosphorylierten MEK-Proteinen in Cx32-defizienten und Wildtypmäusen im Alter von zwei Monaten	36
Abbildung 19: Detektion von MEK 1/2 Proteinen in Cx32-defizienten, P ₀ -heterozygot-defizienten und Wildtyp-Mäusen im Alter von drei Monaten	37
Abbildung 20: Relative Genexpression von Cx32-defizienten im Alter von einem, zwei und drei Monaten für die Zytokine MCP-1 und M-CSF.....	39

Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
CMT	Charcot-Marie-Tooth Syndrom
CMTX	X-chromosomal vererbte Form der CMT
CNS	zentrales Nervensystem
CT	Threshold Cycle
Cx32	Connexin 32
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium
DMN	hereditäre motorisch-sensorische Neuropathie
DNA	Desoxyribonukelinsäue
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiaminetetraacetatsäure
EGR 2	early growth response 2 zink finder protein
ERK 1/2	extracellular signal-regulated protein kinase
FCS	Fetales Kälberserum
HMSN	hereditäre motorisch-sensorische Neuropathie
HNPP	hereditary neuropathy with liability to pressure plasies
HSAN	hereditäre sensible und autonome Neuropathie
IκB	inhibitor of nuclear factor kappa B
IL-4	Interleukin-4
IL-13	Interleukin-13
JNK	Januskinase
LMW	low molecular weight marker
MAG	Myelin-assoziiertes Glykoprotein
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MBP	basisches Myelinprotein
M-CSF	macrophage colony stimulating factor
MCP-1	monocyte chemoattractant protein-1
MEK 1/2	mitogen activated Erk kinase
MOPS	3-N-morpholino-propanesulfonic acid
NFκB	nuclear factor kappa B
p38-MAPK	protein38-mitogen-activated protein kinase

PBS	phosphate buffered saline
PBST	phosphate buffered saline and tween
PCK α	Proteinkinase C alpha
PCR	Polymerase- Kettenreaktion
PMP 22	peripheral nerve myelin protein 22
PNS	peripheres Nervensystem
PLP	Proteolipid Protein
PR	Progesteronrezeptor
P ₀	Myelinprotein Null
RAG1	recombination activation gene 1
RIPA Lysispuffer	Radioimmunoprecipitation Lysispuffer
RT-PCR	Realttime-PCR
RNA	Ribonukleinsäure
SAPK	stress-activated protein kinase
SDS	sodiumvdodecylsulfate
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamine
WT	Wildtyp

1 Einleitung

1.1 Hereditäre periphere Neuropathien

Hereditäre periphere Neuropathien umfassen eine pathophysiologisch, klinisch und genetisch heterogene Gruppe von Erkrankungen des peripheren Nervensystems. Diese lassen sich nach klinischen Gesichtspunkten durch die jeweils betroffenen Nervenfasern in hereditäre sensible und autonome Neuropathien (HSAN), distale motorische Neuropathien (DMN) und hereditäre motorisch-sensible Neuropathien (HMSN) einteilen.

Letztere sind mit einer Prävalenz von 40:100000 die häufigste vererbte Erkrankung des peripheren Nervensystems (Auer-Grumbach et al. 1999). Die heute im klinischen Alltag gängige Klassifikation nach Dyck (HMSN I-III, 1968) steht immer noch einer älteren Klassifikation durch Eigennamen entgegen. 1886 wurden erstmalig durch die französischen Neurologen Jean-Martin Charcot (1825-1893) und Pierre Marie (1853-1940) und ihrem englischen Kollegen Howard Tooth (1856-1926) Symptome einer hereditären motorisch-sensiblen Neuropathie beschrieben, die unter dem Namen Charcot-Marie-Tooth-Syndrom bekannt wurde. Klinisches Kennzeichen dieser Art von Neuropathie ist eine distale Muskelschwäche zunächst der unteren Extremitäten und damit verbundene Gangstörungen, Fußdeformitäten, herabgesetzte oder fehlende Muskeleigenreflexe und gering bis mäßig ausgeprägte Sensibilitätsstörungen.

Als hereditäre motorisch-sensible Neuropathien der Gruppe I (HMSN I) werden überwiegend Formen demyelinisierender Nervenschädigungen mit Beginn im ersten und zweiten Lebensjahrzehnt beschrieben. Die Patienten besitzen meist eine reduzierte Nervenleitgeschwindigkeit von < 38 m/s (eine Nervenleitgeschwindigkeit von 50m/s wird als normal betrachtet), peroneal betonte Paresen vorwiegend ohne Beteiligung der proximalen Beinmuskulatur, Hohlfußbildung und verdickte, eventuell palpable Nervenstränge.

Unter HMSN II werden dagegen axonale, neuronale Formen der Neuropathie gefasst, die häufig erst nach dem 20. Lebensjahr auftreten. Die Symptome sind der HMSN I ähnlich, allerdings ist die Nervenleitgeschwindigkeit nicht so stark herabgesetzt (> 38 m/s) oder normal.

Stärker ausgeprägte Formen mit regelhaftem Beginn bei der Geburt oder in den ersten zwei Lebensjahren werden als Dejerine-Scottas-Syndrom (DSS) oder HMSN III bezeichnet. Hiervon betroffene Patienten weisen Kennzeichen auf wie De- und Remyelinisierung peripherer Nerven, daneben Hypomyelinisierung, eine verzögerte motorische Entwicklung, distale Muskelschwäche oder -atrophie, hochgradige Sensibilitätsstörungen und eine stark reduzierten Nervenleitgeschwindigkeit von unter 10 m/s. Das Syndrom der kongenitalen Hypomyelinisierung wird ebenfalls zu dieser Gruppe gerechnet und kann als stärkere Ausprägung angesehen werden. Es treten zusätzlich Schluck- und Atemstörungen auf, die motorische Nervenleitgeschwindigkeit ist nicht bestimmbar.

Eine weitere Sonderform ist eine Neuropathie mit Neigung zu Nervendruckläsionen (hereditary neuropathy with liability to pressure palsies, HNPP), die durch eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Traumata gekennzeichnet ist. Nach akuten Läsionen entstehen sensible Ausfälle und Dysästhesien, die zum Teil persistieren können.

Außerdem sind die Formen HMSN IV-VII beschrieben, welche komplexere Syndrome mit Beteiligung mehrerer Organsysteme bezeichnen. Diese können hier aus Platzgründen nicht weiter erörtert werden. Insgesamt sind Mutationen in über zwei Duzend Genen bekannt, die mit verschiedenen Formen der Charcot-Marie-Tooth-Erkrankung in Verbindung gebracht werden (Berger et al. 2006, Niemann et al. 2006).

Durch molekulargenetische Untersuchungen ist es inzwischen gelungen, für eine Vielzahl von Genen und deren Mutationen einen Zusammenhang mit dem Charcot-Marie-Tooth-Syndrom nachzuweisen. Häufig liegen die Genveränderungen in Myelin-Proteinen, welche für die Entwicklung, Aufrechterhaltung und Funktion der Myelinscheiden von großer Bedeutung sind. So führen unter anderem Mutationen in den Genen für das periphere Myelinprotein 22 (PMP 22, peripheral nerve myelin protein 22), für das Myelinprotein Null (P_0), für das Gap Junction Protein Connexin32, Mutationen in dem Zinkfinger-Transkriptionsfaktor EGR2 (early growth response 2 zink finger protein) und in den Genen für das Myelin-Protein Periaxin zu verschiedenen Subtypen der Charcot-Marie-Tooth-Erkrankung. Patienten mit einer Mutation im Connexin32 leiden unter einer X-chromosomal dominant vererbten Form der Charcot-

Marie-Tooth-Erkrankung (CMTX), die zu den HMSN I gerechnet wird. Bei dieser Erkrankung sind Patienten stets schwerer betroffen als Patientinnen. Meist beginnt die Symptomatik im frühen Jugendalter und führt im Laufe des Lebens durch Sensibilitätsausfälle, Muskelatrophien und Fußdeformitäten zu möglicherweise schweren Behinderungen.

Einen großen Fortschritt in der Erforschung hereditärer peripherer Neuropathien stellte die Generierung von Mausmutanten dar, welche Gendefekte in Myelin- und Myelin-assoziierten Proteinen tragen und einem dem Menschen ähnliches Krankheitsbild entwickeln. Diese Mausmodelle machen es möglich, neuropathologische Veränderungen des peripheren Nervensystems genauestens zu studieren und denkbare Mechanismen der Erkrankungsentstehung näher zu untersuchen.

Einige dieser Mausmodelle für die Charcot-Marie-Tooth-Erkrankung (CMT bzw. HMSN) zeigen im Vergleich zueinander große Ähnlichkeiten in ihrer Pathogenese und in ihrem pathologischen Bild, obwohl Mutationen jeweils in unterschiedlichen Myelinproteinen vorhanden sind. Für diese Arbeit wurden Connexin32(Cx32)-defiziente Mäuse untersucht, damit weitere mögliche Parallelen dieses Krankheitsmodells mit anderen Mausmodellen für CMT aufgezeigt werden können.

1.2 Aufbau einer myelinisierten Nervenfasern im peripheren Nervensystem

Gliazellen des peripheren Nervensystems, die für die Funktion der Axone von äußerster Wichtigkeit sind, werden als Schwannzellen bezeichnet. Man kann zwischen nicht-myelinisierenden und myelinisierenden Schwannzellen unterscheiden. Großkalibrige Nervenfasern ($\geq 1\mu\text{m}$) können im Gegensatz zu Nervenfasern kleineren Kalibers durch ihre Myelinscheide wesentlich schneller und energiesparender Aktionspotentiale weiterleiten. In dieser wechseln sich kurze Abschnitte, die Ranvier-Schnürringe, mit längeren sog. Internodien ab. Durch den Einstrom von Na^+ in die Zelle wird an den Ranvier-Schnürringen eine Depolarisation ausgelöst. In den dazwischen liegenden Internodien sind Membranen in vielen Schichten um die Nervenfasern „gewickelt“. Durch den erhöhten Membranwiderstand fließt dort bei Potentialänderungen kein Strom, sondern das Aktionspotential „springt“ von Schnürring zu Schnürring (saltatorische Erregungsleitung).

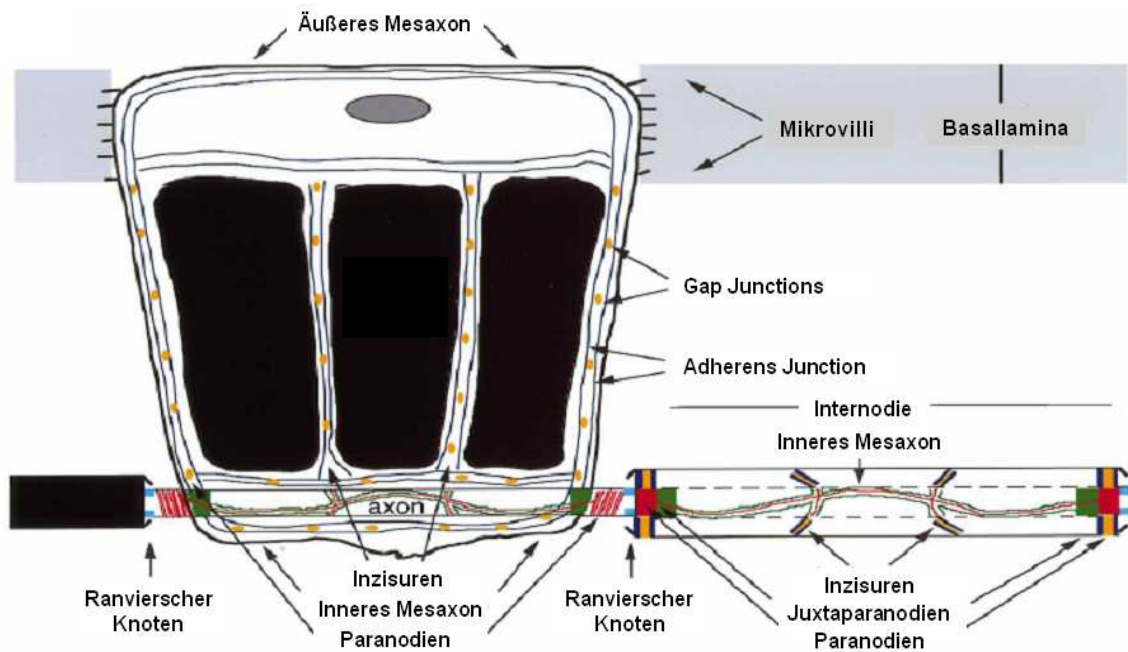


Abbildung 1: Schematischer Aufbau eines myelinisierten Axons im PNS

Eine myelinisierte Schwannzelle mit schematisch abgerollter Myelinscheide lässt kompaktes Myelin (schwarz) und nicht-kompaktes Myelin (weiß) mit seinen Inzisuren und der paranodalen Region erkennen. Gap Junctions sind als orange Ovale dargestellt; die nodale, paranodale und juxtaparanodale Region sind mit den Farben blau, rot und grün gekennzeichnet (aus Arroyo et al. 2000).

Bei der Myelinscheide handelt es sich um eine durch mehrfache Windungen der Schwannzelle um das Axon gebildete „Isolierschicht“. Sie besteht aus zwei verschiedenen Kompartimenten, dem nicht-kompakten und dem kompakten Myelin, wobei das kompakte Myelin den größten Teil der Myelinscheide ausmacht. Nicht-kompaktes Myelin enthält das Zytoplasma der Schwannzelle und ist sowohl in Schmidt-Lanterman-Inzisuren als auch in paranodalen Regionen zu finden (s. Abb. 1).

Die Myelinscheide besteht zu 70-85% aus Lipiden und zu 15-30% aus Proteinen. Im kompakten Myelin peripherer Nerven macht das P₀-Glykoprotein den größten Proteinanteil aus, daneben sind PMP22 und das basische Myelinprotein (MBP) als klassische Myelinproteine nachgewiesen worden. Letzteres ist auch in Myelinscheiden des zentralen Nervensystems zu finden. Das Myelin-assoziierte Glykoprotein (MAG) und einige nicht auf das Myelin beschränkte Proteine wie E-Cadherin und das Gap

Junction Protein Connexin32 sind Bestandteile der nicht-kompakten Region der Myelinscheide (s. Abb. 2).

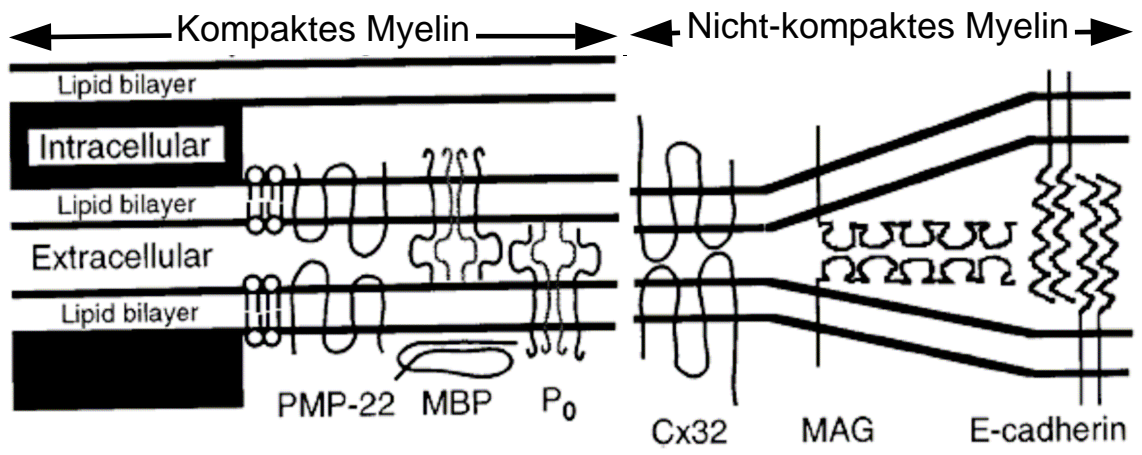


Abbildung 2: Schematische Ansicht der Proteine des kompakten und nicht-kompakten Myelins

Kompaktes Myelin enthält die Proteine PMP22, MBP und P_0 , während im nicht-kompakten Myelin Proteine wie Cx32, MAG und E-Cadherin zu finden sind. P_0 und MAG besitzen Immunglobulin-ähnliche Domänen, während PMP22 und Cx32 vier Transmembrandomänen aufweisen (entnommen aus: Bone et al. 1997).

1.3 Connexin32 und seine Funktion im peripheren Nervensystem

Gap Junction Proteine sind intrazelluläre Membrankanäle, die in vielen Organismen vorkommen. Sie stellen in der Regel Verbindungen zwischen Plasmamembranen zweier benachbarter Zellen her und steuern den Austausch von Ionen, Metaboliten und kleinen Signalmolekülen der Größe unter 1 kDa (Kumar & Gilula, 1996). Elektronenmikroskopische Studien haben gezeigt, dass Gap Junctions aus hexagonalen Strukturen (Connexons) bestehen, die wiederum in sechs Proteinuntereinheiten aufgeteilt sind (Kumar & Gilula 1996, Yeager 1998) und Connexine genannt werden. Inzwischen sind über 21 Connexin-Gene im menschlichen Genom und über 20 im Maus-Genom identifiziert (Sohl & Willecke, 2003). Aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeiten wird diese Gruppe von Proteinen auch als Connexin-Multi-Gen-Familie bezeichnet.

Das 32kDa große Protein Connexin32 (Cx32) wurde zuerst in der Leber als integrales Membranprotein mit 283 Aminosäuren und der klassischen Topologie eines Gap Junction Proteins entdeckt (Paul 1986, Kumar & Gilula 1986, Heynkes, Kozjek, Taub & Willecke 1986). Es besitzt zwei extrazelluläre Domänen, vier hydrophobe Membrandomänen und drei zytoplasmatische Domänen mit einer intrazellulären Schleife, einem Amino- und einem Carboxylterminus.

Neben Hepatozyten zählt auch eine ganze Reihe anderer Gewebe zum Expressionsort des Cx32, wie z.B. Alveolarzellen der sezernierenden Mamma, Neurone, Azinarzellen des Pankreas, der proximale Nierentubulus, Follikelzellen der Schilddrüse und Schwanzzellen sowie Oligodendrozyten (Bruzzone et al. 1996), die myelinisierenden Zellen des peripheren bzw. des zentralen Nervensystems. Immunocytochemische Studien konnten nachweisen, dass Cx32 im peripheren Nervensystem von Schwanzzellen exprimiert wird und sich in Regionen des nicht-kompakten Myelins befindet (Berghoffen & Fischbeck, 1993, Scherer & Paul 1995, Nelles & Willecke 1996). Cx32 ist hier nicht an der Bildung eines *interzellulären* Kanals beteiligt, sondern formt einen *intrazellulären* Kanal, sog. „reflexive junctions“ (Scherer et al. 1995). Diese außergewöhnliche Position deutet auf eine gebildete, schnelle Verbindung für Signalmoleküle und Ionen vom perinuklearen zum adaxonalen Teil der Schwanzzelle durch die verschiedenen Myelinlagen hin, die für eine Aufrechterhaltung des Zellmetabolismus von Bedeutung ist (Bruzzone & Paul 1996, White & Paul 1999, Bone & Scherer 1997, Saez et al. 2003, Scherer 2006).

1.4 Tiermodelle für CMT zeigen eine immunvermittelte Demyelinisierung

Sowohl für Mutationen im PMP22, im Transkriptionsfaktor ERG2 als auch für das P₀-Glykoprotein und Cx32 existieren transgene Mausmodelle. Diese weisen zum Teil erstaunliche histologische Ähnlichkeiten mit verschiedenen Formen der humanen HMSN auf. In der Mauslinie C61, welche das PMP22 leicht überexprimiert und ein Mausmodell für eine Form von CMT (CMT1A) darstellt, sowie in P₀-defizienten und Cx32-defizienten Mäusen -ebenfalls Mausmodelle für CMT- konnten Makrophagen als mögliche Mediatoren der Demyelinisierung identifiziert werden.

1.4.1 P₀-heterozygot-defiziente Mäuse als Mausmodell

Mäuse mit einer P₀^{+/-}-Defizienz stellen ein Mausmodell für die mildere Form der Charcot-Marie-Tooth-Erkrankung (CMT1B) dar. Diese Mausmutanten entwickeln ab einem Alter von drei Monaten eine periphere demyelinisierende Neuropathie mit abnormal dünnen Myelinscheiden, Zwiebelschalenformationen und einem partiellen Strukturverlust des kompakten Myelins. Diese elektronenmikroskopisch gut sichtbaren Merkmale nehmen mit fortschreitendem Alter in ihrem Schweregrad zu. Auch die Nervenleitgeschwindigkeit ist in P₀^{+/-}-defizienten Mäusen ab dem fünften Lebensmonat reduziert. Aus noch ungeklärter Ursache sind motorische Nervenfasern wesentlich stärker betroffen als sensible (Giese et al. 1992, Martini et al. 1995).

In weiteren Studien ließ sich feststellen, dass in P₀^{+/-}-defizienten Mäusen die Anzahl von Makrophagen im peripheren Nerv altersabhängig ansteigt und sich diese Zellen in unmittelbarer Nähe demyelinisierter Axone befinden, zum Teil sogar myelinhaltige Vakuolen aufweisen (Schmid et al. 2000, Carenini et al. 2001). Eine Verkreuzung von P₀-heterozygot-defizienten Mäusen und RAG-1-defizienten Mäusen (Rekombinations-Aktivierungs-Gen 1), denen reife T- und B-Zellen fehlen, ergab eine deutliche Reduktion de- und hypomyelinisierter Nervenfasern und eine reduzierte Anzahl endoneuraler Makrophagen (Schmid et al. 2000). Nach einer Transplantation von Knochenmark gesunder Wildtypmäuse in diese P₀^{+/-}/RAG-1^{-/-}-Doppelmutanten und der damit verbundenen Wiederherstellung eines kompetenten Immunsystems wurde wiederum eine stärkere Destruktion der peripheren Nerven festgestellt (Mäurer et al. 2001).

Für M-CSF (macrophage colony stimulating factor) und MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) ist vielfach die Eigenschaft, Makrophagen anzulocken und zu aktivieren beschrieben worden. Durch die Verkreuzung P₀-heterozygot-defizienter Mäuse mit M-CSF-defizienten Mäusen konnte ein Anstieg der Makrophagenanzahl im peripheren Nerv verhindert werden (Carenini et al. 2001). Eine Quantifizierung von MCP-1 und M-CSF mittels „Echtzeit-“ oder Realtime PCR (Polymerase-Kettenreaktion, RT-PCR) zeigt in peripheren Nerven P₀-heterozygot-defizienter Mäuse eine erhöhte Genexpression dieser beiden Zytokine (C. Kleinschnitz, unveröffentlichte Daten, Fischer et al. 2008). Außerdem lässt sich in P₀^{+/-}-defizienten Mäusen eine starke

Aktivierung der Signalkinase ERK (extracellular signal-regulated kinase) im peripheren Nerv im Vergleich zum Wildtyp nachweisen. Durch Inhibition dieses Signalweges konnte eine verringerte Genexpression von MCP-1 im peripheren Nerv von $P_0^{+/-}$ -defizienten Mäusen gezeigt werden (Fischer et al. im Druck). Diese Daten lassen auf einen Zusammenhang zwischen der Aktivierung von ERK und der Chemokinexpression schließen.

1.4.2 Connexin32-defiziente Mäuse

Mäuse mit einer Connexin32-Defizienz stellen ein Mausmodell für eine X-chromosomal dominant vererbte Form der Charcot-Marie-Tooth-Erkrankung dar (Nelles et al. 1996, White & Paul 1999, Scherer & Balice Gordon 1997, Bone & Scherer 1997, Kleopa & Scherer 2006, Review von Scherer 2006). Im Alter von drei Monaten entwickeln diese Mäuse ähnlich den P_0 -heterozygot-defizienten Mäusen eine progressive, periphere Neuropathie, die histologisch mit demyelinisierten Axonen und abnorm dünnen Myelinscheiden, Zwiebelschalenformationen und vergrößertem periaxonalem Schwanzzellfortsatz einhergeht. Diese Zeichen nehmen mit steigendem Alter zu.

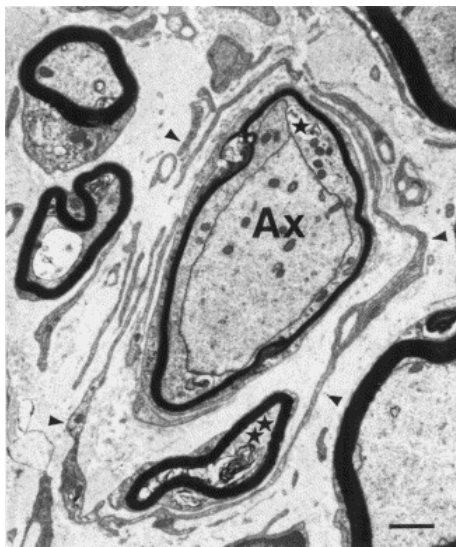


Abbildung 3: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer myelinisierten Nervenfasers einer Cx32-defizienten Maus im Alter von sechs Monaten

Zu sehen sind typische Kennzeichen wie ein vergrößerter periaxonaler Schwanzzellfortsatz (Sterne), dünnes Myelin, auffällig viele Schwanzzellen (Pfeilköpfe) und regenerative Axontriebe (Doppelsterne) (Entnommen aus: Kobsar et al. 2002).

Allerdings sind hier ebenfalls aus noch ungeklärter Ursache motorische Nervenfasern wesentlich stärker betroffen als sensible (Anzini et al. 1997; Scherer et al. 1998).

Weibliche heterozygote Cx32^{+/-}-defiziente Mäuse entwickeln eine schwächere Pathologie als gleichaltrige männliche Cx32^{Y/-}-defiziente Mäuse, weil sie ein gesundes und ein mutiertes Cx32-Allel besitzen (Deschênes et al. 1996). Dagegen ist in weiblichen homozygoten Cx32^{-/-}-defizienten und männlichen Cx32^{Y/-}-defizienten Mäusen kein geschlechtsspezifischer Unterschied im Beginn der Demyelinisierung, dem Ausprägungsgrad und ihren histologischen Kennzeichen festzustellen (Scherer et al. 1998).

Die Korrelation von Genotyp und Phänotyp ist auch in der menschlichen Erkrankung CMTX zu beobachten. Männer entwickeln meist eine schwerere Symptomatik als Frauen. Außerdem konnten in Nervenbiopsien von CMTX-Patienten den Cx32-defizienten Mäusen ähnliche histopathologische Merkmale wie z.B. Zwiebschalenformationen nachgewiesen werden (Rozeau et al. 1987). Im Menschen beginnt die Erkrankung meistens erst in der zweiten oder dritten Lebensdekade, während bei Cx32-defizienten Mäusen erste Anzeichen von Demyelinisierung ab einem Alter von drei Monaten zu erkennen sind. Diese Parallelen machen Cx32-defiziente Mäuse zu einem suffizienten Tiermodell für CMTX.

In weiteren Studien an Cx32-defizienten Mäusen konnte ähnlich den P₀^{+/-}-defizienten Mäusen ein Ansteigen der Anzahl von Makrophagen in demyelinisierten Nerven Cx32-defizienter Mäuse gezeigt werden (Kobsar et al. 2002). Auch mit diesen Myelinmutanten wurde eine Verkreuzung mit RAG-1-defizienten Mäusen durchgeführt, die ebenfalls eine Verbesserung der Myelinisierung und eine geringere Anzahl an Makrophagen ergab (Kobsar et al. 2003).

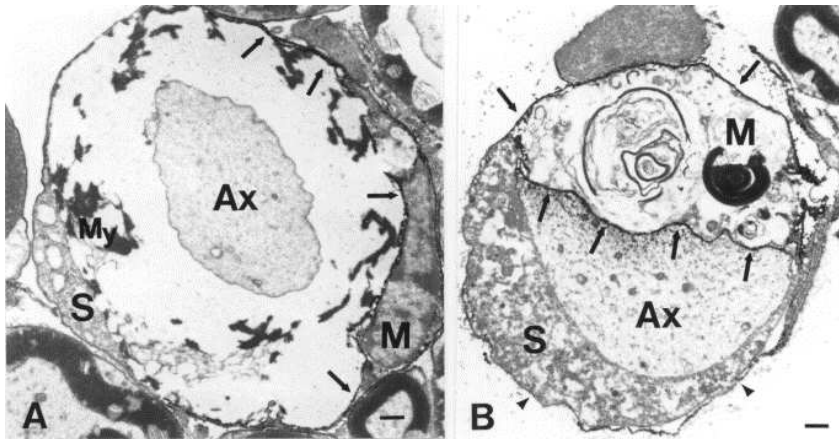


Abbildung 4: Elektronenmikroskopische Aufnahme nach einer F4/80-Färbung von Makrophagen in ventraler Spinalwurzel von 6 Monate alten Cx32-defizienten Mäusen (A) Ein F4/80-positiver Makrophage (M) hat die Schwannzell-Basallamina durchdrungen und befindet sich im engen Kontakt mit stark zerstörtem Myelin (My). (B) Ein demyelinisiertes Axon (Ax) zusammen mit einem Makrophagen; die Pfeile zeigen in beiden Bildern F4/80-spezifische Immunoprecipitate auf Makrophagenmembranen (entnommen aus Kobsar et al. 2002).

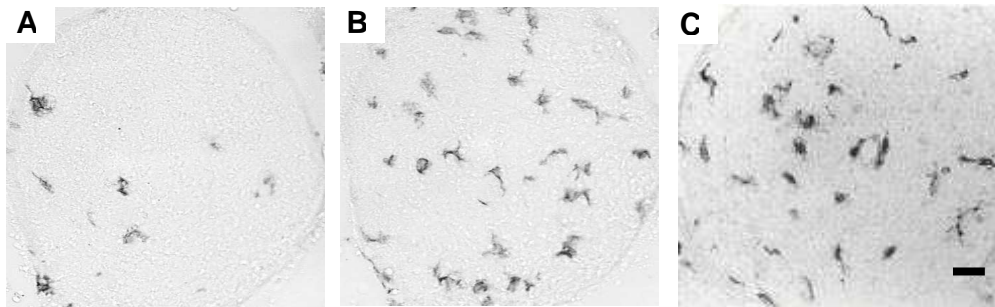


Abbildung 5: Makrophagen (F4/80-Färbung) in Quadricepsnerven Makrophagen (F4/80-Färbung) in Quadricepsnerven eines Wildtyps (A), einer Cx32-defizienten (B) und P₀^{+/-}-defizienten (C) Maus im Alter von 12 Monaten; Balken 20 µm (entnommen aus Kobsar 2005).

An diesem Mausmodell für CMTX wurde parallel zu den Ergebnissen aus Studien mit P₀-heterozygot-defizienten Mäusen eine semiquantitative Bestimmung der Genexpression von MCP-1 und M-CSF mittels PCR durchgeführt. MCP-1 zeigt hier sein Expressionsmaximum in drei Monate alten Cx32-defizienten Tieren, während M-CSF im ersten und vor allem im zwölften Monat stark im Vergleich zum Wildtyp exprimiert ist (unveröffentlichte Daten, s. Abb. 6 und 7).

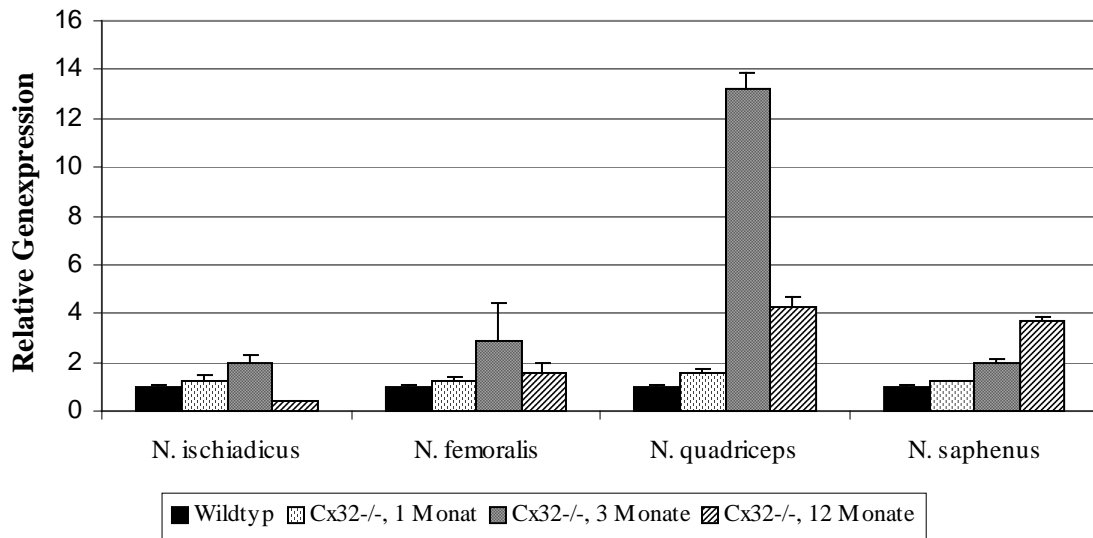


Abbildung 6: Relative Genexpression des Zytokins MCP-1 in Wildtypmäusen und Cx32-defizienten Mäusen im Alter von einem, drei und zwölf Monaten

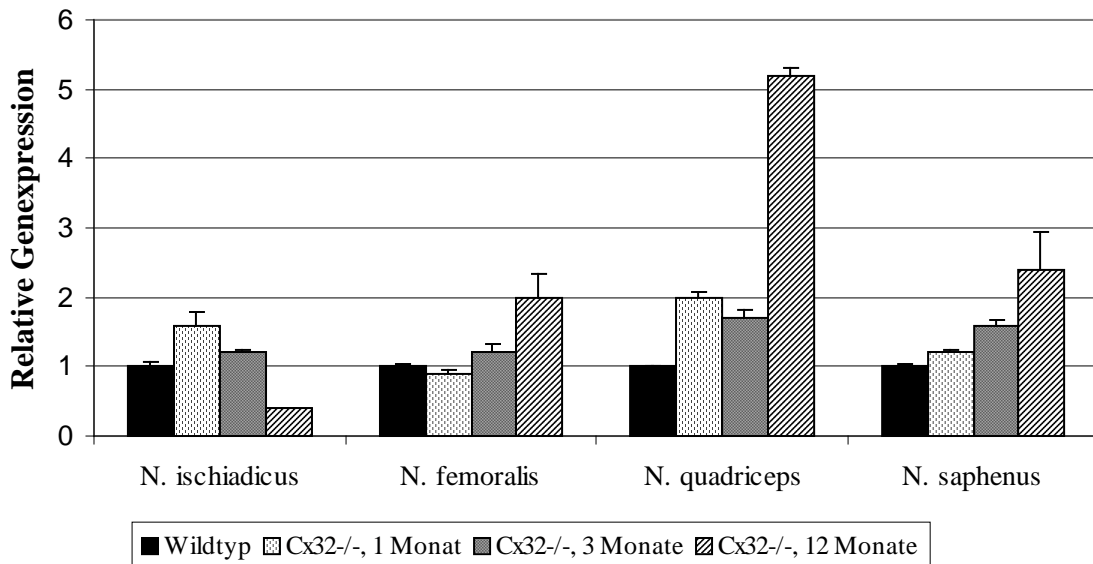


Abbildung 7: Relative Genexpression des Zytokins M-CSF in Wildtypmäusen und Cx32-defizienten Mäusen im Alter von einem, drei und zwölf Monaten

1.4.3 Molekulare Mechanismen der Zytokinexpression

Die dargestellten Daten einer erhöhten Makrophagenanzahl in peripheren Nerven $P_0^{+/-}$ - und Cx32-defizienter Mäuse und die erhöhte Genexpression Makrophagenaktivierender Zytokine deuten auf eine sekundär immunvermittelte Krankheitsentstehung hin, obwohl es sich primär um einen Gendefekt handelt.

Zelluläre Signalverarbeitung und Informationsaustausch funktionieren durch Zytokinausschüttung, die meist am Ende einer komplizierten Kette von sich gegenseitig beeinflussenden Signalmolekül-Reaktionen steht. Eine Vielzahl von Signaltransduktionswegen konnte bereits in einen Zusammenhang mit zellulärem Stress und/oder einer MCP-1-bzw. M-CSF-Expression gebracht werden. Folglich sind diese Signaltransduktionswege in Mausmodellen für hereditäre periphere Neuropathien als potentielle Vermittler einer erhöhten Genexpression von MCP-1 und damit einer zellulären Stressantwort auf die Mutation im jeweiligen Myelinprotein anzusehen.

In $P_0^{+/-}$ -defizienten Mäusen ließ sich eine Aktivierung der ERK-Signalkinase (extracellular signal-regulated protein kinase) im peripheren Nerv im Vergleich zu Wildtypen nachweisen. Bei Blockade des ERK-Signaltransduktionsweges in $P_0^{+/-}$ -defizienten Mäusen wurde eine verringerte Expression dieser Zytokine im peripheren Nerven gezeigt. Also scheint der ERK-Signaltransduktionsweg aufgrund des Gendefektes in der Schwanzzelle durch seine Aktivierung eine Zytokinausschüttung und damit eine Aktivierung von Makrophagen auszulösen, die wiederum für die Symptomatik einer peripheren demyelinisierenden Neuropathie verantwortlich sind.

1.5 Ziel der Arbeit

Die bereits dargelegten Parallelen hinsichtlich der pathogenetischen Einflussnahme von Immunzellen in $P_0^{+/-}$ - und $Cx32^{-/-}$ -defizienten Mäusen lassen einen gemeinsamen Pathomechanismus für hereditäre periphere Neuropathien vermuten. In beiden Mausmodellen ist eine erhöhte Genexpression von MCP-1 und M-CSF nachgewiesen worden. Für $P_0^{+/-}$ -defiziente Mäuse ließ sich eine starke Aktivierung von ERK nachweisen, deren Inhibition eine verringerte Genexpression von MCP-1 zur Folge hatte. Da es sich hierbei um einen weiteren Baustein in der Pathogenese hereditärer peripherer Neuropathien handelt, soll in dieser Arbeit untersucht werden, ob eine ERK-Aktivierung ebenfalls Teil dieses gemeinsamen Mechanismus der Aktivierung von Makrophagen darstellt und auch in anderen Mausmodellen für HMSN zu finden ist.

Aus diesem Grund wurden für diese Arbeit in $Cx32$ -defizienten Mäusen verschiedene Signalkaskaden im peripheren Nerv untersucht, um mögliche Mediatoren einer erhöhten

Genexpression von Zytokinen (vor allem MCP-1) zu finden, die Makrophagen aktivieren und damit das Krankheitsbild der peripheren Neuropathie mitbestimmen.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Bei den für diese Arbeit verwendeten Tieren handelt es sich um Mäuse des gemischten Hintergrunds C57/B16 und SV129 mit einer Cx32^{-/-}- bzw. Cx32^{Y/-}-Defizienz (Nelles et al, 1996, PNAS) und Wildtyp-Mäuse im Alter von einem, zwei und drei Monaten. Die Versuchstiere entstammen alle der eigenen SPF- Haltung (spezifiziert-pathogen-frei-Bedingungen).

2.2 Gewinnung des Gewebes/Präparation peripherer Nerven

Zur Gewinnung der peripheren Nerven wurden Tiere nach erfolgter intraperitonealer Anästhesie (0,6 % Ketanest, 8,3 % NaCl, 0,08% Rompun) tanskardial mit PBS (phosphate buffered saline) für zwei bis drei Minuten perfundiert und anschließend mittels dorsalen Zugangs beidseits der Nervus ischiadicus, durch einen ventralen Zugang der Nervus saphenus und Nervus quadriceps präpariert, entnommen und mit Hilfe von flüssigem Stickstoff gefroren. Entnommenes Gewebe wurde zur Lagerung bei -80°C aufbewahrt.

In der Regel wurden mindestens drei Nn.ischiadici, Nn.quadricipes und Nn.sapheni von Mäusen gleichen Alters, Geschlechts und Genotyps zu einer Probe vereinigt.

- PBS (phosphate buffered saline)

137 mM NaCl

1,5 mM KH₂PO₄

2,7 mM KCl

8,1 mM Na₂HPO₄

2.3 Proteinisolation

Zur Lyse der gewonnenen Probe wurde ein zum Gewicht entsprechendes Volumen RIPA-Lysisbuffer (100µl auf 10- 20mg) zusammen mit Proteinase-Inhibitor addiert und das Gewebe zweimal auf Eis etwa für dreißig Sekunden sonifiziert. Unlösliche Partikel wurden durch Zentrifugation (5min, 15000xg) pelletiert und der Überstand in ein neues Gefäß überführt.

- RIPA Lysispuffer

25 mM Tris pH 8	0,4% EDTA
10 mM Hepes pH 4,4	1% SDS
150 mM NaCl	1% NP 40
5 mM MgCl ₂	10% Glycerol
145 mM KCl	

2.4 Proteinbestimmung nach Lowry

Um den Proteingehalt der Proben zu messen, wurde eine Proteinbestimmung nach Lowry durchgeführt. Diese bedient sich der Biuret-Reaktion: in alkalischen Lösungen reduzieren Proteine Cu^{2+} -Ionen zu Cu^{+} -Ionen, die mit Peptidbindungen einen blau gefärbten Komplex bilden. Die Intensität der Färbung lässt Rückschlüsse auf den Proteingehalt der zu untersuchenden Lösung zu.

Um den Proteingehalt des Lysates zu messen, wurden 1:100 und 1:33 –Verdünnungen mit Aqua bidest. mit einem Endvolumen von 100 μl in einer 96well Polystyrolplatte hergestellt, jeweils 100 μl des Lowry Reagenz I (Sigma) hinzugegeben und für zwanzig Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 50 μl Lowry Reagenz II (Sigma) addiert und die Lösung nach dreißigminütiger Inkubation bei Raumtemperatur photometrisch bei 690 nm und 610 nm mit einem Plattenphotometer gemessen.

Als Standard wurde BSA (Sigma) in verschiedenen Konzentrationen verwendet.

2.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Mit der Gelelektrophorese nach Laemmli (1970) wurden die Proteingemische der Nerven nach der Molekülmasse enthaltener Proteine durch Wanderung in einem Spannungsfeld aufgetrennt.

Dazu wurden 0,75 mm dicke Trenn- und Sammelgele mit einer Acrylamidkonzentration von 10% bzw. 4,5% verwendet. Die Nervlysate wurden vor der Elektrophorese in reduzierendem Laufpuffer (Roti Loading Dye[®]) bei 92°C denaturiert und bei konstanter Spannung von 100 V aufgetrennt.

Der verwendete Standard für Molekulargewichte (LMW-SDS Marker Kit, Amersham Bioscience) und die Kontrollen (Zellsate von kultivierten Zellen der Linie NIH 3T3) wurden ebenfalls mit Roti Loading Dye[®] versetzt und denaturiert.

- Trenngelpuffer
1,5 M Tris-HCl

0,4% SDS

0,4% TEMED
- Sammelgelpuffer
0,5 M Tris-HCl

SDS 0,4%

TEMED 0,4%

- Laufpuffer
0,25 M Tris

1,92 M Glycin

SDS 1%

2.6 Western Blot

Mit Hilfe eines Immuno- oder Western Blot werden die im Gel aufgetrennten Proteine in einem Spannungsfeld auf eine proteinbindende Membran übertragen. Durch die Bindung spezifischer Antikörper und einer damit verbundenen Signalreaktion lassen sich bestimmte Proteine auf der Membran nachweisen. Zur Detektion von weiteren Proteinen auf dem gleichen Western Blot ist es möglich, die spezifisch gebundenen Antikörper mittels eines Stripping Buffers (siehe unten) wieder zu entfernen.

Das Gel wurde zwischen drei Lagen Filterpapier (Gel Blotting Papier, Schleicher & Schuell BioScience) und Filterpads auf eine Nitrocellulosemembran (Protran[®], Schleicher & Schuell BioScience) in die Kassette eingespannt und in Transferpuffer mit zusätzlichem Eisbehälter zur Kühlung für sechzig Minuten an eine konstante Spannung von 100 V angeschlossen.

Nach dem Blot wurde die Membran zum Nachweis des gelungenen Proteintransfers und zur Ladekontrolle mit Ponceaulösung (Ponceau S, Sigma) gefärbt, die Markerbanden und Orte der Probenauftragung auf der Membran markiert und ein Foto zur Dokumentation erstellt.

Anschließend wurde die Ponceaulösung mit H₂O entfernt, der Blot in einfachem PBST gewaschen und mit 5 % Milch (handelsübliches Magermilchpulver) für dreißig Minuten bei Raumtemperatur geblockt, um unspezifische Proteinbindungsstellen zu sättigen.

Zur weiteren Bearbeitung wurde der Blot nach einem weiteren Waschvorgang zwischen Filterpapier getrocknet, bei Raumtemperatur aufbewahrt oder über Nacht weiterbehandelt (siehe unten).

- Transferpuffer
Ethanol 10 % (v/v)
150 mM Glycin
25 mM Tris-HCL pH 8,0
- PBST
0,1 % (v/v) Tween
in 1x PBS

2.7 Antikörper-Reaktionen

Nach erfolgreichem Proteintransfer wurde der Blot mit einem primären Antikörper bei Raumtemperatur für zwei Stunden oder bei 4°C über Nacht inkubiert und anschließend nach mehreren Waschvorgängen mit PBST für dreißig Minuten mit einem passenden sekundären Meeretich-Peroxidase (H)-markierten Antikörper (Inkubationszeit: 30 Minuten).

Als Nachweis für die stattgefundene Antikörper-Bindung wurde mittels ECL (enhanced chemiluminescence) eine Farbreaktion durchgeführt und auf einem Röntgenfilm (Hyperfilm, Amersham Bioscience) dokumentiert. Die Filmexposition variierte je nach verwendetem Antikörper von mehreren Sekunden bis 24 Stunden.

Um den Blot nach erfolgter Färbung noch einmal mit anderen Antikörpern beladen zu können, wurde bei 4°C über Nacht oder nach zwei Stunden bei Raumtemperatur die gebundenen Antikörper im Strippingpuffer abgewaschen. Zur Kontrolle des

erfolgreichen Entfernen der gebundenen Antikörper wurde der Blot nach dem Blocken und anschließender Inkubation mit einem passenden sekundären Antikörper erneut mit Substrat versetzt und mindestens zwei weiteren Stunden einem Hyperfilm ausgesetzt, um eine eventuell noch vorhandene Bindung des sekundären Antikörpers nachzuweisen. Falls dies geschah, wurde ein weiterer Abwaschvorgang durchgeführt. Nach erneutem Waschen und Blocken ist eine Färbung mit einem weiteren Antikörper vorgenommen worden.

Zum Einsatz kamen Antikörper gegen (Maus-) ERK, MEK 1/2 (mitogen activated Erk kinase, STAT (signal transducers and activators of transcription), IκB (inhibitor of nuclear factor kappa B), p38-MAPK (protein38 mitogen-activated protein kinase) und JNK (januskinase) und gegen die jeweils phosphorylierte Form dieser Signalproteine.

- Antikörper

<u>Name</u>	<u>Firma/ Konzentration</u>	
Rabbit Anti-Stat1α Polyclonal Antibody	Chemicon	1:1000
Rabbit Anti-Phospo-Stat1 (Tyr701) Polyclonal Antibody	Chemicon	1:1000
ERK 1 Rabbit polyclonal IgG	Santa Cruz	1:1000
pERK1 Mouse monoclonal IgG	Santa Cruz	1:1000
pJNK Mouse monoclonal IgG ₁	Santa Cruz	1:1000
JNK Rabbit polyclonal IgG	Santa Cruz	1:1000
Rabbit Anti-Phospo-MEK 1/2 Polyclonal Antibody	Chemicon	1:1000
Rabbit Anti-Human Phospo-MEK 1/2 Polyclonal Antibody	Chemicon	1:1000
Rabbit Anti-p38α MAP Kinase Polyclonal Antibody	Chemicon	1:1000
Rabbit Anti-Phospo-p38 MAPK Polyclonal Antibody	Chemicon	1:1000
Rabbit IkappaB-alpha Antibody	Cell Signaling	1:1000
Rabbit Phospo-IkappaB-alpha (Ser32) Antibody	Cell Signaling	1:1000
Anti-Mouse Antibody	Chemicon	1:2000
Anti-Rabbit Antibody	Chemicon	1:2000

- Strippingpuffer
 0,2 M Glycin
 SDS 0,1%
 20 mM DTT
 Tween 1%
 pH 2,2

2.8 Auswertung der Western Blot Analysen durch das Graphikprogramm ImageJ

ImageJ ist ein Graphikprogramm zur Bearbeitung und Analyse von Bildern für Forschungszwecke, herausgebracht vom „National Institutes of Health“ (NIH) der Vereinigten Staaten und im Internet als freie Version erhältlich (<http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html>).

Mit Hilfe des Programms wurden in den Western Blots nach entsprechender Bearbeitung die Intensitäten der verschiedenen Banden gemessen. So ließ sich der Gehalt an gefärbtem Protein quantifizieren und miteinander vergleichen. Für jeden Blot wurden die Signalintensitäten der Färbungen in ein Verhältnis gesetzt, und zwar Färbungen der phosphorylierten Form der Signalkinase mit Färbungen der dephosphorylierten Form der gleichen Signalkinase. Je größer der errechnete Quotient an phosphoryliertem zu dephosphoryliertem Protein im Vergleich zu anderen Banden ist, desto höher ist der relative Anteil an phosphorylierter Proteinkinase und damit auch ihre Aktivität. Die Werte wurden jeweils auf die im Blot vorhandenen Signalintensitäten der Proben von Wildtyp-Mäusen normiert und in einem Diagramm dargestellt.

2.9 Zellkultur als Kontrollen für die Western Blot Analysen

Als Positiv- und Negativkontrollen für die Western Blot Analysen wurden Fibroblasten der Linie NIH 3T3 verwendet. Diese wurden im Vollmedium regelmäßig passagiert oder in einem Hungermedium (ohne Serum) kultiviert. Das Hungermedium bewirkt in den Zellen eine Stressreaktion, die zu Änderungen zellulärer Signaltransduktionen führt.

Die Zellen besitzen eine Generationszeit von 24 Stunden. Zur Passage wurde das Medium aus der Kulturflasche abgesaugt, die angewachsenen Zellen mit PBS gespült und anschließend für 5 min bei 37°C mit Trypsin versetzt. Nach einem erneuten Waschvorgang wurden die Zellen wieder in Kultur gebracht.

Um die Zellen als Kontrolle verwenden zu können, wurden sie über Nacht mit einem Hungermedium (siehe unten) kultiviert. Ein Anteil der Zellen wurde nun für 30 Minuten mit 20% Serum versetzt (+S, Positivkontrolle) und danach mit PBS gewaschen, der andere Anteil diesem Waschvorgang mit PBS unbehandelt unterzogen (-S, Negativkontrolle). Anschließend wurden beide Anteile wieder mit Trypsin versetzt, abzentrifugiert (4°C für 5 Minuten bei 2000xg) und nach einem weiteren Waschvorgang und Zentrifugation in RIPA Lysispuffer mit Proteinase Inhibitor versetzt und sonifiziert. Zur Aufbewahrung wurden die Zellen bei -20°C gelagert.

- | | |
|----------------------------|-----------------------------|
| • <u>Vollmedium</u> | • <u>Hungermedium</u> |
| 390ml DMEM | 98ml DMEM |
| 100ml FCS (20%) | 0,05ml FCS |
| 5ml Glutamin | 1ml Glutamin |
| 5ml Penicilin/Streptomycin | 1ml Penicillin/Streptomycin |

2.10 Sequentielle Isolation von RNA, DNA und Protein aus peripheren Nerven

Eine andere Methode der Proteingewinnung und gleichzeitigen Isolierung der DNA und RNA aus dem Nervengewebe wurde mit Trizol (Invitrogen, Trizol[®] Reagent) durchgeführt.

Zunächst wurde das Nervengewebe mit Trizol[®] versetzt (1ml) und homogenisiert (Gerät ART-Micra D8).

2.10.1 RNA-Isolation

Nach der Homogenisation wurden 200 µl Chloroform hinzugegeben, drei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend die entstandene Lösung bei 2-8°C für 15 Minuten mit 12000xg pro Minute zentrifugiert.

Die resultierende wässrige obere Phase wurde in ein neues Gefäß überführt, mit 500 µl Isopropanol gefällt und nach einer zehnminütigen Inkubation bei Raumtemperatur erneut für zehn Minuten zentrifugiert (12000xg). (Die untere phenolische Phase wurde zur weiteren Aufreinigung enthaltener Protein und DNA aufbewahrt [siehe unten]). Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet mit 75%igem Ethanol gewaschen und nochmals zentrifugiert (12000xg). Abschließend wurde das Ethanol vorsichtig entfernt, das Pellet an der Luft getrocknet und in 10 µl DEPC-Wasser (Diethylpyrocarbonat = RNase Inhibitor) bei 55°C gelöst.

2.10.2 DNA- Isolierung

Die phenolische, untere Phase aus der RNA Isolierung wurde nun mit Hilfe von 300 µl 100%igem Ethanol gefällt. Dafür wurde die Lösung drei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und bei 2-8°C 2000xg zentrifugiert. Der Überstand enthält nun die aus dem Nervengewebe gewonnenen Proteine und wurde zur weiteren Verarbeitung (siehe unten) in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Das noch bestehende Pellet wurde zweimal unter Schütteln 30 Minuten in 1 ml 0,1 M NaCitrat in 10%igem Ethanol bei Raumtemperatur gewaschen und nachfolgend für fünf Minuten mit 2000xg zentrifugiert. Jetzt wurde das Pellet in 75%igem Ethanol zwanzig Minuten gewaschen und noch einmal fünf Minuten 2000xg zentrifugiert. Die entstandene Lösung wurde verworfen und nachdem der restliche Alkohol bei Raumtemperatur verdampft war, konnte das Pellet in 8 mM NaOH gelöst werden und wurde bei -20°C aufbewahrt.

2.10.3 Proteinisolierung

Um die Proteine des bei der DNA-Isolierung gewonnenen Überstandes (siehe oben) zu reinigen, wurde das enthaltene Protein mit 1,5 ml Isopropanol gefällt und nach einer zehnminütigen Inkubation bei Raumtemperatur und anschließender Zentrifugation

(12000xg, 10min bei 2-8°C) dreimal mit 0,3 M Guanidinohydrochlorid in 95%igem Ethanol gewaschen. Nachdem nun eine erneute Inkubation von jeweils zwanzig Minuten und eine darauf folgende Zentrifugation (75000xg 5min) stattgefunden hatte, wurde das entstandene Pellet in Ethanol gewaschen und nach Luftrocknen in RIPA Lysispuffer nach der oben beschriebenen Methode sonifiziert.

2.11 RNA – Agarosegelelektrophorese

Um die Qualität der aus dem Trizol-Protokoll isolierten RNA zu untersuchen, wurde eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt.

Das Gel bestehend aus Agarose, MEN-Puffer und Formaldehyd wurde mit jeweils 1µg RNA im frisch zubereiteten Ladepuffer (Formamid, Formaldehyd, MEN-Puffer) und 1 %iger Ethidiumbromidlösung beladen und an eine konstante Spannung von 100 V angeschlossen. Als Größenstandard diente der „RNA Ladder“ von MBI Fermentas.

Das Gel wurde unter UV-Licht beurteilt, die Qualität der RNA orientiert sich an den ribosomalen 18S- und 28S-Banden.

- MEN Puffer
0,2 M MOPS
10mM EDTA
50mM Natriumacetat
pH 7,0

2.12 Photometrische Bestimmung der RNA

Um die Konzentration der isolierten RNA zu messen, wurden photometrische Bestimmungen durchgeführt. Die entsprechenden Proben wurden in einer 1:100fachen Verdünnung bei verschiedenen Wellenlängen gemessen (260 nm zu 280 nm). Als Leerwert wurde DEPC-H₂O benutzt. Das Messvolumen betrug 100 µl. Bei einer Wellenlänge von 260 nm für RNA entspricht ein gemessener Absorptionswert von 1 bei einer Schichtdicke von 1 cm ungefähr einer RNA Konzentration von 37µg/ml.

Der Quotient aus den gemessenen Absorptionswerten der Wellenlänge für RNA (260nm) und Protein (280) gibt Auskunft über die Reinheit der RNA Probe. Der Quotient sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen, niedrigere Werte deuten auf Verunreinigungen hin.

2.13 Reverse Transkription

RNA kann nicht als Matrize für eine DNA Polymerasekettenreaktion (PCR) dienen, sie muss in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden – durch reverse Transkription.

Für die Reaktion wurden randomisierte Hexamere eingesetzt, die sich an die RNA anlagern und so das Umschreiben in cDNA ermöglichen.

Es wurde das TaqMan[®] Reverse Transcription Reagents-Kit von Applied Biosystems verwendet und nach folgendem Pippetierschema eingesetzt:

- 10 µl 10x RT-Buffer
- 22 µl MgCl
- 20 µl dNTP
- 5 µl Random Hexamers
- 28,5 µl RNase freies Wasser
- 2,5 µl Reverse Transkriptase
- 2 µl RNase Inhibitor
- 10 µl RNA-Wasser-Mix (1µl RNA)

Die Temperatur betrug für die Inkubation, die das Anlagern der Random Hexamers ermöglicht, 25°C für 10 Minuten; anschließend erfolgte die reverse Transkription bei einer Temperatur von 42°C für 60 Minuten und zum Schluss wurde zur Inaktivierung der Reversen Transkriptase für die letzten 5 Minuten mit einer Temperatur von 95°C inkubiert.

2.14 Realtime PCR (TaqMan[®] PCR)

Durch die RT-PCR lässt sich eine quantitative Aussage über die Expression bestimmter cDNA Sequenzen treffen. In diesem Fall wurde die Expression der Gene *ccl2* (MCP-1) und *csf* (M-CSF1) untersucht. Es wurde der TaqMan[®] Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) zusammen mit Primern und Sonden (Assay Mix, siehe unten) nach folgendem Pippetierschema verwendet:

12,5µl Master Mix
1,25µl Assay Mix
6,25µl DEPC-H₂O
5µl cDNA (in den Verdünnungen 1:10, 1:100, 1:1000)

In dieser Arbeit wurden folgende Assay Mixes und Kontrollen verwendet:

<u>Gen</u>	<u>Firma</u>	<u>Produktnummer</u>
<i>Ccl2</i> ; chemokine (C-C motif) ligand 2	Applied Biosystems	Mm99999056_m1
<i>Csf1</i> ; colony stimulating factor 1 (macrophage)	Applied Bisystems	Mm00432688_m1

<u>Produktname</u>	<u>Firma</u>	<u>Produktnummer</u>
Eukaryotic 18S rRNA Endogenous Control (VIC / MGB Probe, Primer Limited)	Applied Biosystems	4319413E

Nach einer zweiminütigen Inkubation bei 50°C wurden 40 Zyklen mit einem Zeitintervall von zehn Minuten bei 95° und einer anschließenden Abkühlung auf 60°C für eine Minute durchgeführt.

Auswertung

Die Auswertung der RT-PCR erfolgte durch das ABI Prism 7700 Sequence Detection System[®] (Applied Biosystems) nach der $\Delta\Delta\text{CT}$ - Methode. Die Software generiert automatisch einen Amplificationplot, der die nach jedem Zyklus gemessenen Floureszenzsignale (ΔRN -Wert) gegen die Zykluszahl aufträgt. Damit kann die Hintergrundaktivität der Sonde (Baseline) und zusätzlich der Schwellenzyklus

(Threshold Cycle [CT]), das heißt, der Zyklus, von dem an ein regelmäßiger exponentieller Verlauf der verschiedenen Kurven zu erwarten ist, bestimmt werden.

Bei der $d\Delta CT$ - Auswertungsmethode wird die 18S RNA als vergleichbares Referenzgen jeder Probe mitbehandelt, um trotz unterschiedlicher Expressionsraten eine vergleichbare Quantifizierung zu erhalten. Die $d\Delta CT$ - Werte werden wie folgt berechnet:

Zielsequenz CT – 18S RNS CT = Δ CT Zielsequenz

KontrollCT – 18S RNA CT = Δ CT Kontrolle

Δ CT Zielsequenz - Δ CT Kontrolle = $d\Delta CT$

3 Ergebnisse

3.1 Einleitung

Zur Untersuchung der Pathogenese hereditärer Neuropathien des peripheren Nervensystems wurden in dieser Arbeit Western Blot Analysen mit Lysaten peripherer Nerven (N. ischiadicus, N. quadriceps, N. saphenus) von Cx32-defizienten Mäusen und entsprechenden Wildtyp-Mäusen auf die Aktivierung verschiedener Signalkaskaden (ERK 1/2, JNK, p38-MAPK, STAT und NFκB) hin untersucht. Die Versuche wurden nach Geschlechtern getrennt vorgenommen. In diesen Analysen konnte ein unterschiedlicher Aktivierungsstatus verschiedener Signalmoleküle in männlichen Cx32^{y/-}- und weiblichen Cx32^{-/-}-defizienten Mäusen gezeigt werden. Deshalb wurde zusätzlich durch eine semiquantitative Echtzeit-PCR (RT-PCR) eine in beiden Geschlechtern unterschiedliche Genexpression Makrophagen-aktivierender Zytokine (MCP-1 und M-CSF) untersucht.

3.2 Ergebnisse zum Aktivierungsstatus verschiedener Signalkaskaden

Proteinlysate von jeweils männlichen und weiblichen Cx32-defizienten Mäusen im Alter von einem bis drei Monaten und die entsprechenden Nervlysate der Wildtyp-Mäuse wurden nebeneinander aufgetragen.

Es ist erforderlich, zentrale Proteinkinasen der zu untersuchenden Signalkaskade in ihrer jeweils phosphorylierten und dephosphorylierten Form zu untersuchen, um eine Aussage über die unterschiedliche Aktivierung dieser Signalkaskade in Zellen zu treffen.

Zu einer genaueren Auswertung der Western Blot Analysen wurde für die Quantifizierung der Intensität verschiedener Banden das Graphikprogramm ImageJ verwendet. Der Quotient aus den Signalintensitäten der Färbungen des phosphorylierten mit dem unphosphorylierten Signalprotein ist auf den Wildtyp normiert und in entsprechenden Diagrammen dargestellt.

3.2.1 Aktivitätsstatus der Signaltransduktionswege STAT 1 α , NF κ B, p38-MAP-Kinase und JNK

Bei der Untersuchung des Aktivitätsstatus dieser Signalkaskaden durch Western Blot Analysen lassen sich keinerlei Unterschiede im Gehalt der unphosphorylierten und der phosphorylierten Form der jeweils untersuchten Signalkinase zwischen Wildtyp und Cx32-defizienten Mäusen oder zwischen beiden Geschlechtern detektieren. Keiner dieser Signaltransduktionswege ist in Cx32-defizienten Mäusen aktiviert (s. Abb. 8-12).

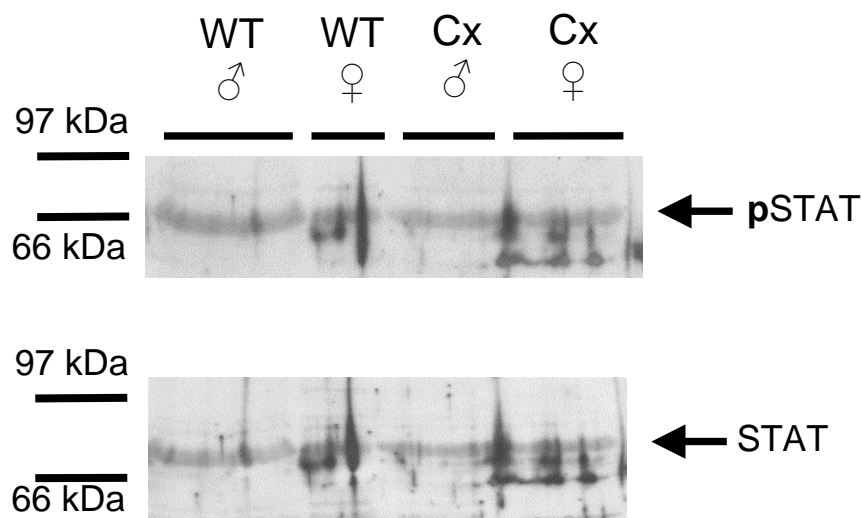


Abbildung 8: Detektion von phosphorylierten STAT-Proteinen in Cx32-defizienten und Wildtypmäusen im Alter von zwei Monaten:

Nach elektrophoretischer Auftrennung wurden entsprechende Nervlysate (hier N. ischiadicus) mit anti-STAT1 α und anti-pSTAT gefärbt. Es lassen sich in der dargestellten Western Blot Analyse keinerlei Unterschiede im Proteingehalt zwischen Cx32-defizienten (Cx) und Wildtypmäusen (WT) detektieren.

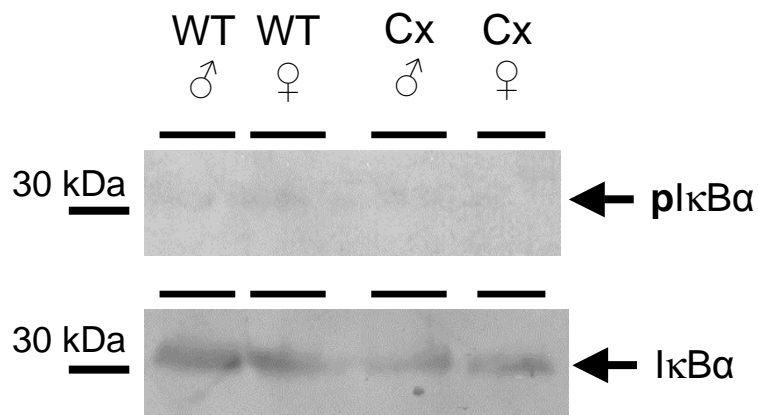


Abbildung 9: Detektion von phosphorylierten IκBα-Proteinen in drei Monate alten Cx32-defizienten und Wildtypmäusen

Nach elektrophoretischer Auftrennung wurden entsprechende Nervlysate (hier N. ischiadicus) gegen anti-IκBα und anti-phospho-IκBα gefärbt; es ist kein erhöhter Gehalt an phosphoryliertem IκBα in Cx32-defizienten Mäusen nachzuweisen.

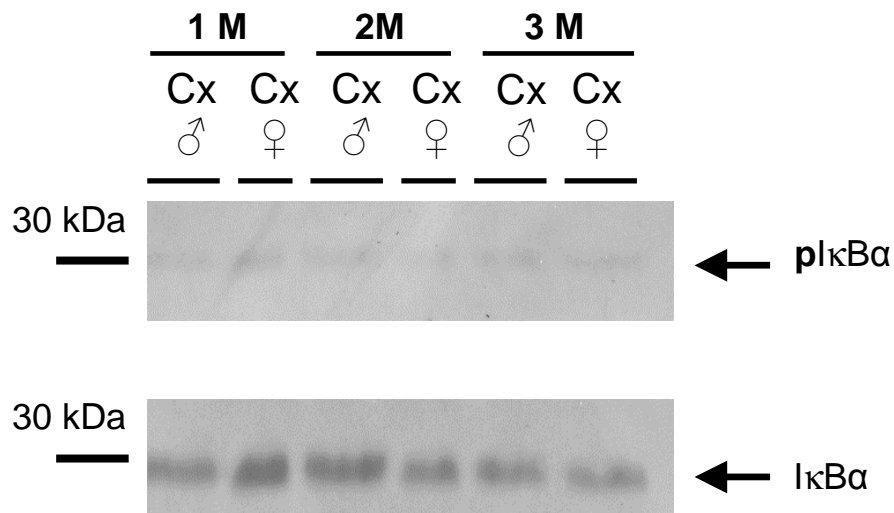


Abbildung 10: Detektion von phosphorylierten IκBα- Proteinen in einen, zwei und drei Monate alten Cx32-defizienten Mäusen

Es sind keine Unterschiede im Gehalt der phospho-IκBα Proteinen zwischen den Altersgruppen oder beiden Geschlechtern zu erkennen (Nervenlysate des N. ischiadicus).

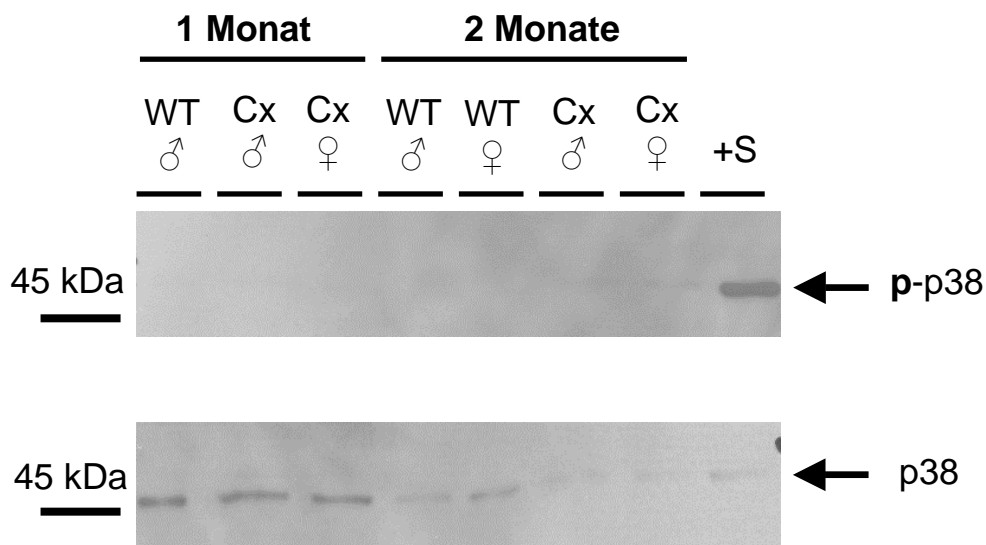


Abbildung 11: Detektion von phosphorylierten p38-MAPK-Proteinen in Cx32-defizienten und Wildtypmäusen im Alter von einem und zwei Monaten

Nach elektrophoretischer Auftrennung wurden entsprechende Nervlysate (N. ischiadicus) gegen anti-p38-MAPK und anti-phospho-p38-MAPK gefärbt. Eine Detektion von phospho-p38-MAPK ist in Cx32-defizienten Mäusen nicht möglich. (S+: Positivkontrolle, s. Material und Methoden).

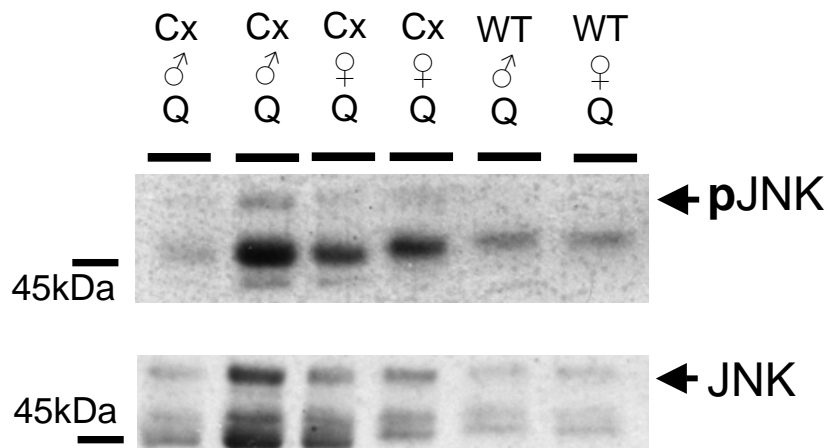


Abbildung 12: Detektion von JNK-Proteinen in einen Monat alten Mäusen

Nach elektrophoretischer Auftrennung wurden die Nervlysate mit anti-JNK und anti-phospho-JNK gefärbt. Es ist keine erhöhte Phosphorylierung in Cx32-defizienten Mäusen im Vergleich zu den Wildtypen nachzuweisen (im unteren Abschnitt JNK und im oberen pJNK; spezifische Banden sind am Rand mit Pfeilen markiert; Q: N. quadriceps).

3.2.2 Aktivierungsstatus der ERK 1/2-Signalkaskade

Während in P₀-heterozygot-defizienten Mäusen ab dem Alter von einem Monat ein erhöhter Gehalt an phosphorylierten ERK 1/2 in Nervlysaten nachweisbar ist, lässt sich in einen Monat alten Cx32-defizienten Mäusen kein erhöhter Gehalt an

phosphoryliertem ERK 1/2 in Nervlysaten detektieren (Abb. 13). ImageJ-Auswertungen zeigen in einen Monat alten Cx32-defizienten Mäusen allgemein sogar ein geringerer Gehalt an pERK 1/2 als im Wildtyp (Abb. 14). Zusätzlich ist in Cx32-defizienten Weibchen eine höhere Menge an pERK 1/2 in den Nervlysaten zu detektieren als in Männchen.

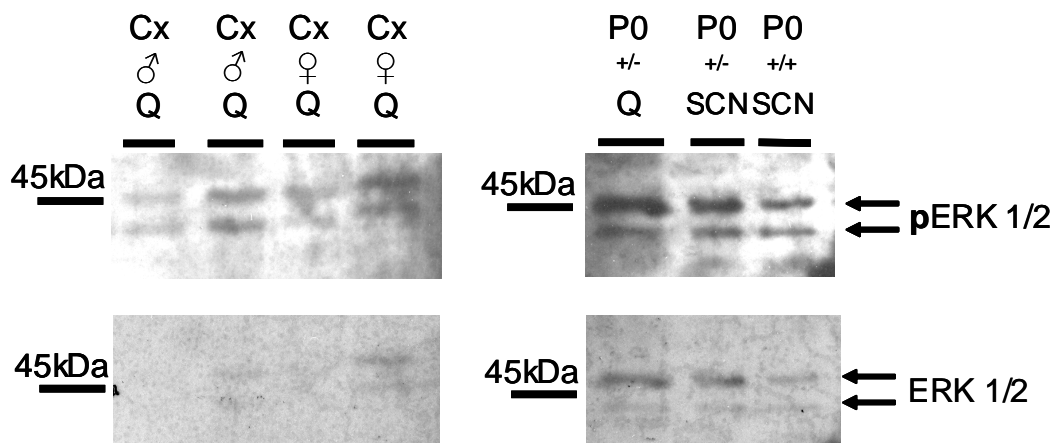


Abbildung 13: Detektion von ERK 1/2 Proteinen in Cx32- und P₀-heterozygot-defizienten Mäusen im Alter von einem Monat

Es ist kein erhöhter Gehalt an phosphoryliertem ERK 1/2 in Cx32-defizienten Mäusen nachweisbar, dagegen aber in P₀^{+/-}-defizienten Mäusen im Vergleich zum Wildtyp. Es handelt sich um dieselbe Membran; (Q: N. quadriceps, SCN: N. ischiadicus).

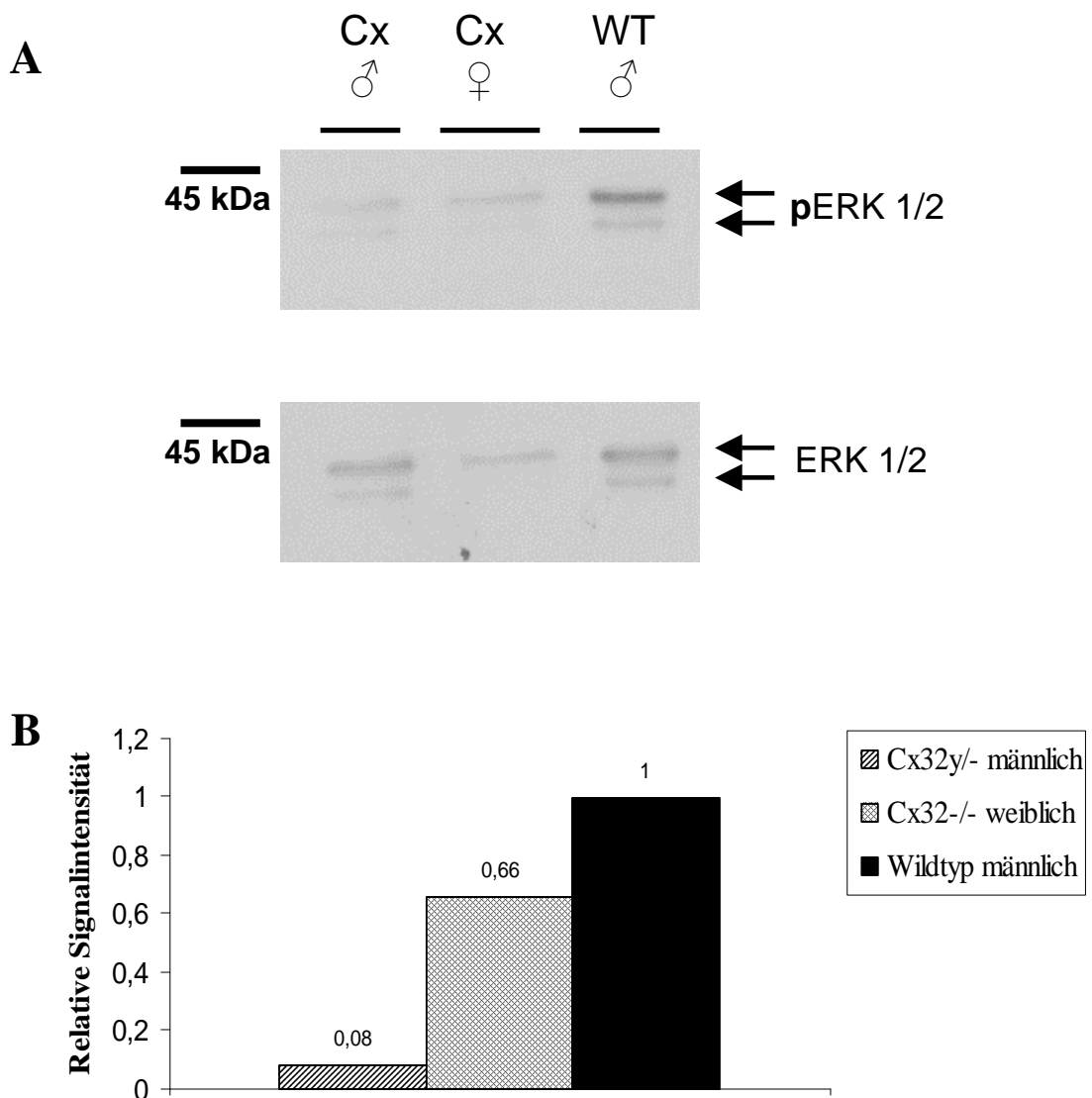


Abbildung 14: Detektion von phosphorylierten ERK-Proteinen in Cx32-defizienten und Wildtypmäusen im Alter von einem Monat

(A) Western Blot: nach elektrophoretischer Auftrennung wurden entsprechende Nervlysate (N. ischiadicus) gegen anti-ERK 1/2 und anti-pERK 1/2 gefärbt. Es zeigt sich ein reduzierter Proteingehalt von pERK 1/2 in Cx32-defizienten Männchen; (B) Auswertung des unter (A) gezeigten Western Blots mittels Analyse durch ImageJ: aufgetragen ist der Quotient der Signale von phospho-ERK 1/2 gegen ERK 1/2-Antikörper-Färbung. Im Cx32-defizienten Männchen ist der Gehalt an p-ERK 1/2 stärker reduziert, im Cx32-defizienten Weibchen im Vergleich zum Wildtyp ebenfalls.

In Nervlysaten von Cx32-defizienten Mäusen im Alter von zwei Monaten konnte ebenfalls keine verstärkte Aktivierung von ERK 1/2 nachgewiesen werden. Der Gehalt an phosphoryliertem ERK 1/2 ist mit dem der Wildtypmäuse vergleichbar. Jedoch lassen sich auch hier Unterschiede zwischen Weibchen und Männchen detektieren. Der

Gehalt an pERK 1/2 ist in weiblichen Cx32-defizienten Mäusen geringer als in entsprechenden Männchen (Abb. 15).

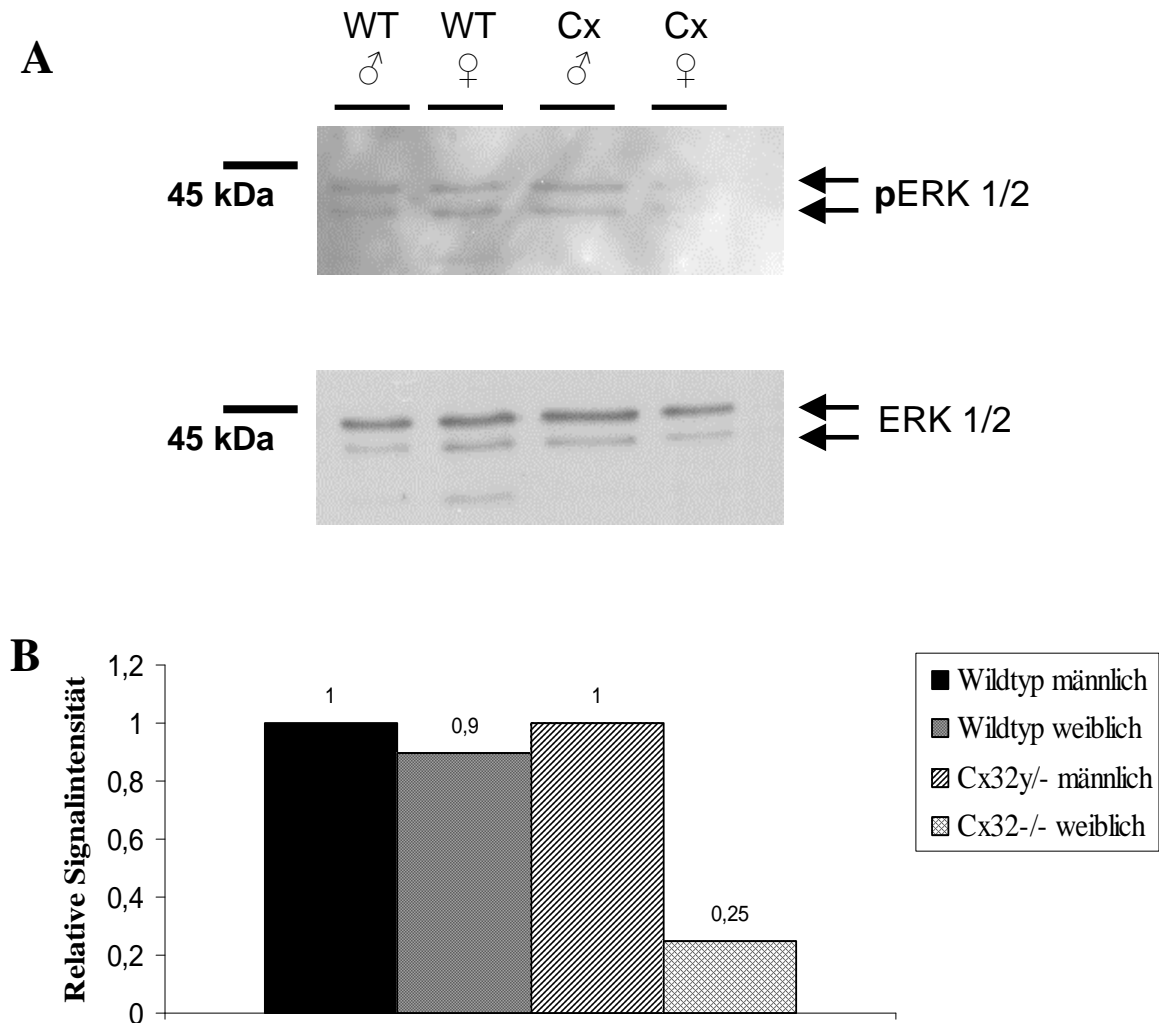


Abbildung 15: Detektion von phosphorylierten ERK-Proteinen in Cx32-defizienten und Wildtypmäusen im Alter von zwei Monaten

(A) Western Blot: bei jeweils gleichem Gehalt an ERK 1/2 lässt sich eine Reduktion des phospho-ERK 1/2 im zweimonatigen Cx32-defizienten Weibchen detektieren; (B) Unter (A) gezeigter Western Blot nach einer Analyse mit ImageJ; es wird der Quotient aus dem Signal nach p-ERK 1/2 Färbung gegen ERK 1/2 Färbung gezeigt, die Reduktion von p-ERK 1/2 lässt sich deutlich erkennen.

In drei Monate alten Cx32-defizienten Mäusen lässt sich ebenso kein erhöhter Gehalt an pERK 1/2 in peripheren Nerven detektieren (s.Abb. 16).

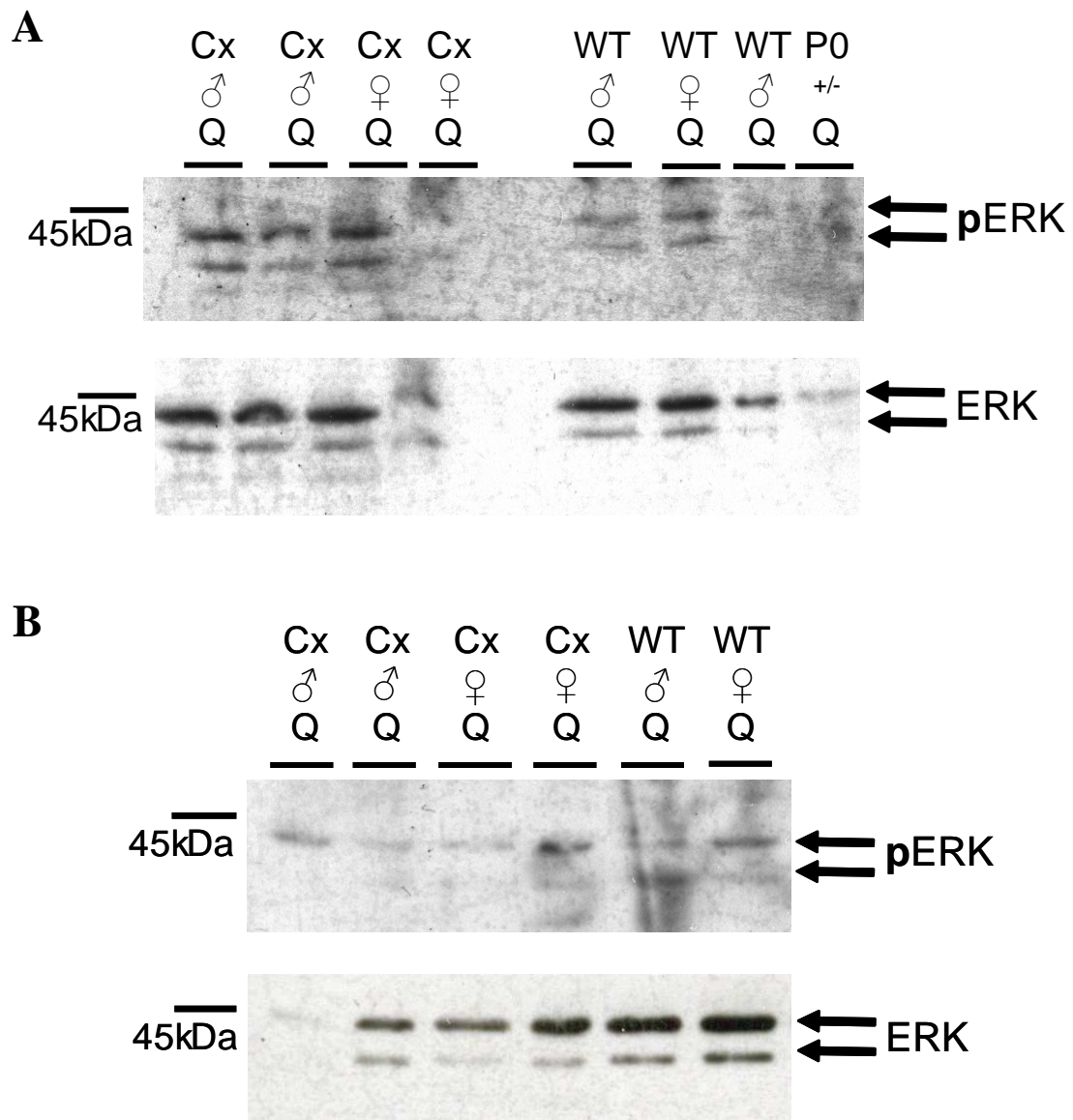


Abbildung 16: Detektion von ERK 1/2-Proteinen in Cx32-defizienten, P₀-heterozygot-defizienten und Wildtyp-Mäusen im Alter von drei Monaten

Es ist keine starke Phosphorylierung von ERK 1/2 in Cx32-defizienten Mäusen erkennbar - im Gegensatz zu P₀-heterozygot-defizienten Mäusen (Q: N. quadriceps).

3.2.3 Aktivierungsstatus der MEK 1/2 in der ERK 1/2 Signalkaskade

Im ERK 1/2-Signaltransduktionsweg wird ERK als MAP-Kinase (mitogen-aktivierte Proteinkinase) von einer MAPK-Kinase phosphoryliert und damit aktiviert. Diese wird als „MAPK and ERK kinase“ (MEK) bezeichnet (Hommes et al. 2003).

Wenn durch Western Blot Analysen der Gehalt an MEK 1/2 und pMEK in Nervlysaten Cx32-defizienter Mäuse detektiert wird, findet also eine Untersuchung des gleichen Signaltransduktionsweges statt, nur in einer anderen Ebene.

In P₀-heterozygot-defizienten Mäusen konnte auch ein erhöhter Gehalt an pMEK 1/2 nachgewiesen und damit die Aktivität des ERK 1/2-Signaltransduktionsweges indirekt bestätigt werden. Dagegen ist in Nervlysaten von Cx32-defizienten Mäusen nur eine transiente Phosphorylierung von MEK 1/2 nachweisbar, jedoch wurden wiederum Unterschiede zwischen weiblichen und männlichen Cx32-defizienten Mäusen deutlich.

Durch Untersuchungen von Nervlysaten Cx32-defizienter Mäuse im Alter von einem Monat lässt sich ein erhöhter Gehalt von phosphoryliertem MEK 1/2 im Vergleich zu Wildtypmäusen durch Western Blots analysieren, wobei hier der Gehalt an pMEK in Cx32-defizienten Weibchen noch höher ist als in Männchen (s. Abb. 17).

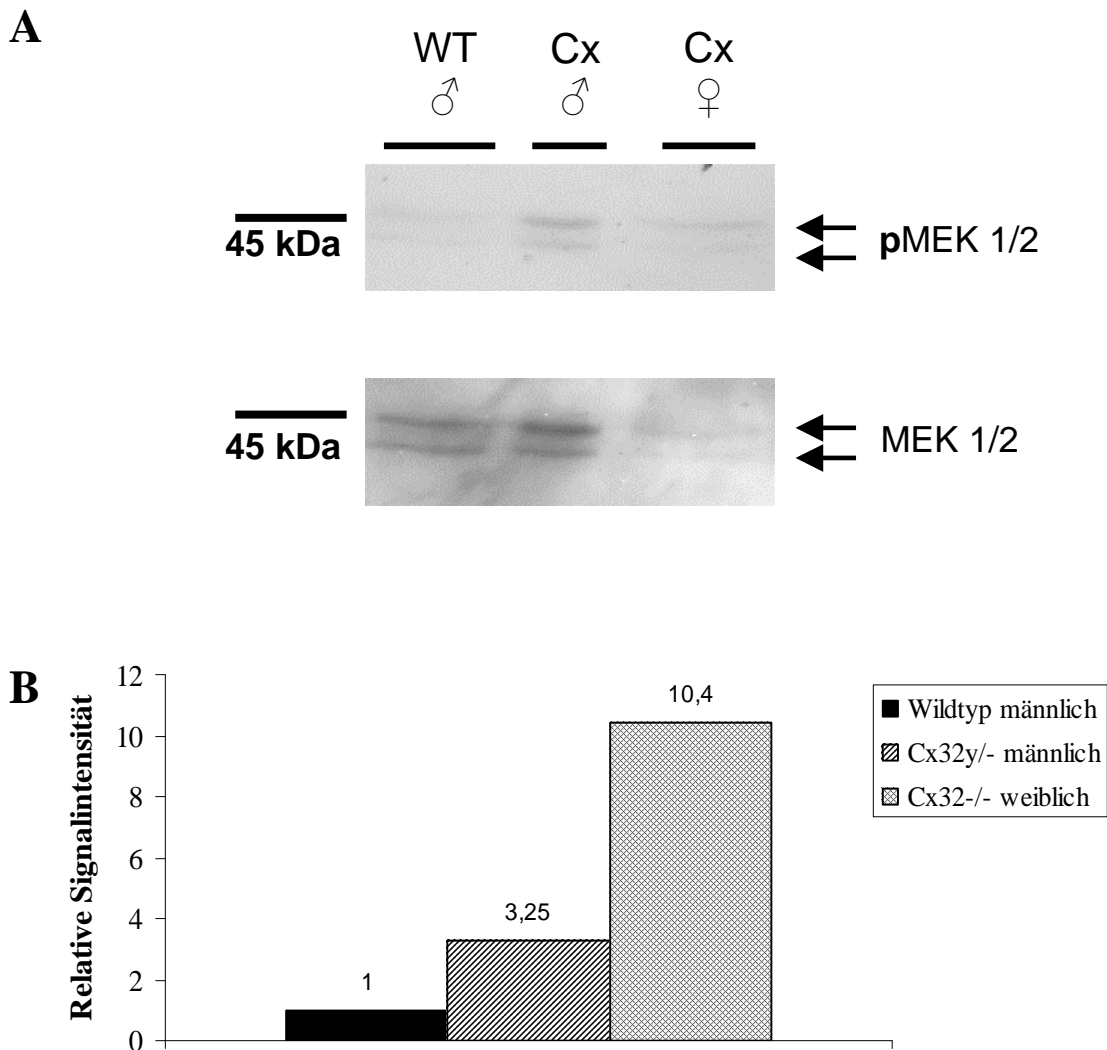


Abbildung 17: Detektion von phosphorylierten MEK-Proteinen von Cx32-defizienten und Wildtypmäusen im Alter von einem Monat

(A) Western Blot: es lässt sich ein erhöhter Gehalt an pMEK 1/2 in Cx32-defizienten Weibchen im Vergleich zum altersentsprechenden Cx32-defizienten Männchen und zum Wildtyp feststellen; (B) Auswertung des oben gezeigten Blot mit Hilfe von ImageJ: im Diagramm dargestellter Quotient der Signalintensitäten der pMEK 1/2-Färbung gegen die MEK 1/2-Färbung, vor allem im Cx32-defizienten Weibchen ist der Gehalt an pospho-MEK 1/2 gegenüber dem Wildtypen erhöht.

Durch Western Blot Analysen von Nervlysaten zwei Monate alter Cx32-defizienter Mäuse lässt sich keine erhöhte Phosphorylierung von MEK 1/2 nachweisen. Jedoch ist der Gehalt an pMEK in zwei Monate alten Cx32-defizienten weiblichen Mäusen im Vergleich zum Männchen stark reduziert. Dies ist besonders in der Auswertung mit ImageJ zu erkennen.

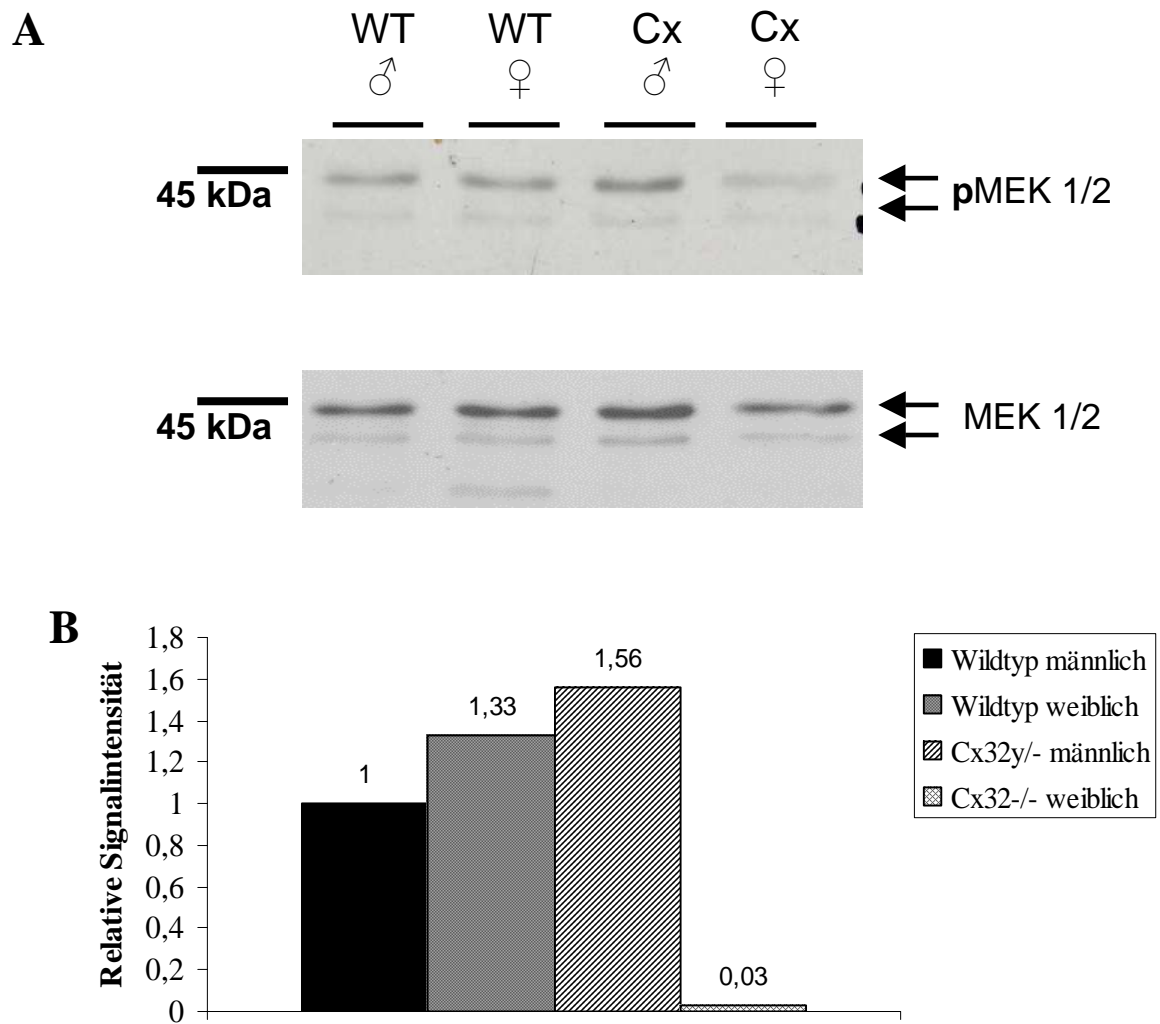


Abbildung 18: Detektion von phosphorylierten MEK-Proteinen in Cx32-defizienten und Wildtypmäusen im Alter von zwei Monaten

(A) Western Blot: es ist eine Reduktion des pMEK 1/2 Gehaltes in weiblichen Cx32-defizienten Mäusen zu sehen; (B) Analyse mit ImageJ, der Quotient der Signalintensitäten von p-MEK 1/2 Färbungen gegen MEK 1/2 Färbungen bestätigen die Reduktion des pMEK 1/2 Gehaltes in weiblichen Cx32-defizienten Mäusen.

Auch für Cx32-defiziente Mäuse im Alter von drei Monaten lässt sich keine Aktivierung von MEK 1/2 weder bei Männchen noch bei Weibchen durch Western Blot Analysen detektieren (s. Abb. 18).

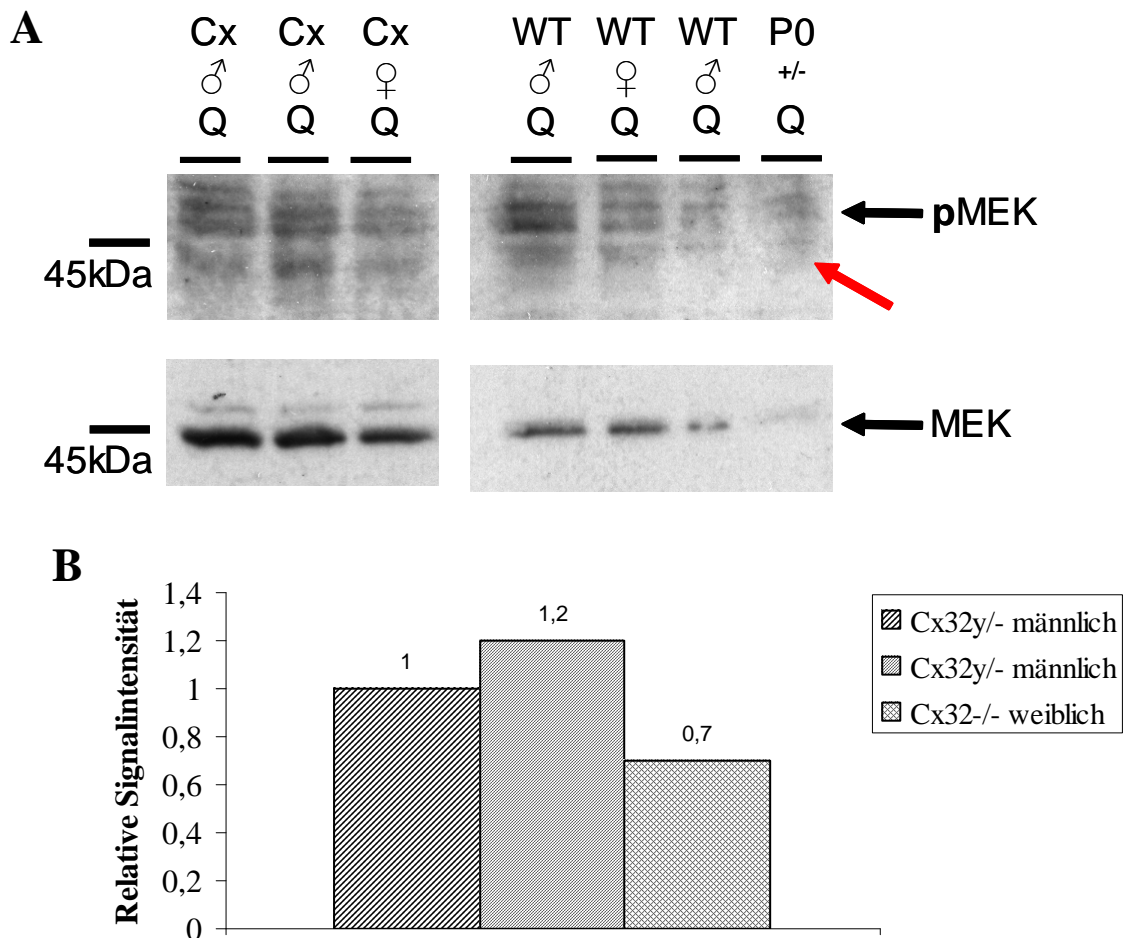


Abbildung 19: Detektion von MEK 1/2 Proteinen in Cx32-defizienten, P₀-heterozygot-defizienten und Wildtyp-Mäusen im Alter von drei Monaten

(A) Es lässt sich nur in P₀^{+/-}-defizienten Mäusen ein erhöhter Proteingehalt an pMEK im Vergleich zum Wildtyp detektieren (roter Pfeil), (in Cx32-defizienten Mäusen ist MEK 1/2 nicht aktiviert). Es handelt sich um eine Membran. (B) ImageJ-Auswertung für die ersten drei Banden des oben gezeigten Blots; sie zeigt einen deutlich reduzierter Gehalt an phospho-MEK 1/2 in drei Monate alten Cx32^{-/-}-defizienten Weibchen.

3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse zur Aktivierung der untersuchten Signalkaskaden

Die Western Blot Analysen aus Nervlysaten von Cx32-defizienten Mäusen lassen in keiner der untersuchten Signalkaskaden (STAT1 α , NF κ B, p38-MAPK, JNK, ERK) einen erhöhten Gehalt der phosphorylierten Signalkinase und damit eine Aktivierung detektieren. Eine Ausnahme bilden einen Monat alte Cx32-defiziente Mäuse. In deren Nervlysaten konnte ein erhöhter Gehalt an pMEK im Vergleich zu gleichaltrigen Wildtypmäusen detektiert werden, allerdings keine ERK 1/2-Aktivierung.

Zusätzlich sind in keinem der untersuchten Signaltransduktionswege außer in der ERK 1/2-Signalkaskade Unterschiede im Aktivierungsstatus zwischen weiblichen und männlichen Cx32-defizienten Mäusen in Nervlysaten detektiert worden. In Nervlysaten Cx32-defizienter Mäuse im Alter von einem Monat konnte ein erhöhter Gehalt der phosphorylierten Form in Weibchen, im Alter von zwei Monaten ein erhöhter Gehalt in Männchen für pERK 1/2 und pMEK gezeigt werden.

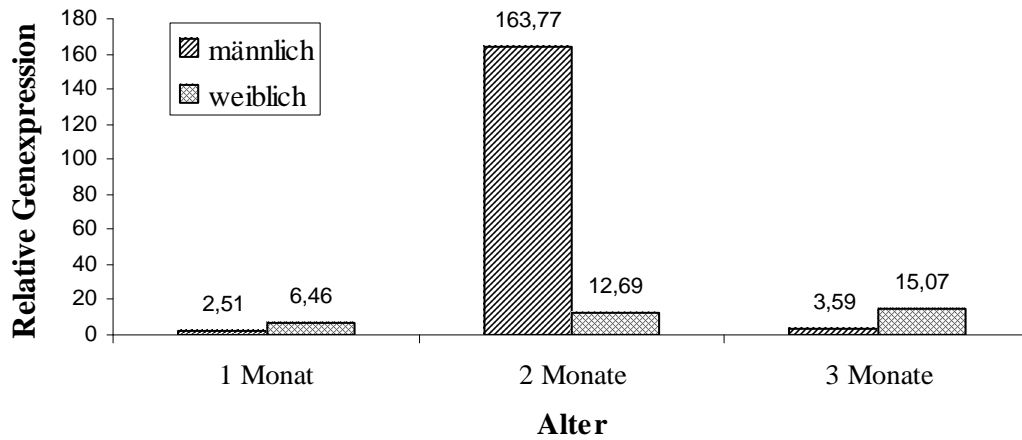
3.4 Ergebnisse der semiquantitativen Realtime PCR

Die Ergebnisse der durchgeführten Western Blots überraschten mit vorher noch nicht beschriebenen Geschlechtsunterschieden in Cx32-defizienten Mäusen in Bezug auf die Signalkinasen ERK 1/2 und MEK 1/2. Um diese Ergebnisse näher zu untersuchen, wurden Realtime PCR für die Zytokine MCP-1 (*ccl2*) und M-CSF (*csf*) durchgeführt. Hier ließen sich deutliche Unterschiede in der Expression von *ccl2* und *csf* in Cx32-defizienten männlichen und weiblichen Mäusen im Vergleich zum Wildtyp nachweisen.

Die Expression von MCP-1 und M-CSF ist in allen untersuchten Altersgruppen erhöht und bestätigen damit die Voruntersuchungen. Für beide Zytokine konnte in zwei Monate alten Cx32-defizienten Männchen eine deutlich erhöhte Genexpression im Vergleich zum gleichaltrigen Weibchen nachgewiesen werden, in drei Monate alten Cx32-defizienten Mäusen allerdings eine höhere Genexpression des Cx32-defizienten Weibchens gegenüber dem gleichaltrigen Männchen. Beide Zytokine werden also in ähnlicher Weise in Cx32-defizienten Mäusen exprimiert, wenn auch die Höhe der Genexpression deutlich differiert (s. Abb. 20).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Ergebnisse der Realtime PCR die Ergebnisse der Western Blot Analysen dahingehend unterstützen, dass Cx32-defiziente Mäuse sowohl in dem Aktivierungsstatus der ERK 1/2-Signalkaskade also auch in der Genexpression der Zytokine MCP-1 und M-CSF geschlechtsspezifische Unterschiede zeigen.

MCP-1 Expression



M-CSF Expression

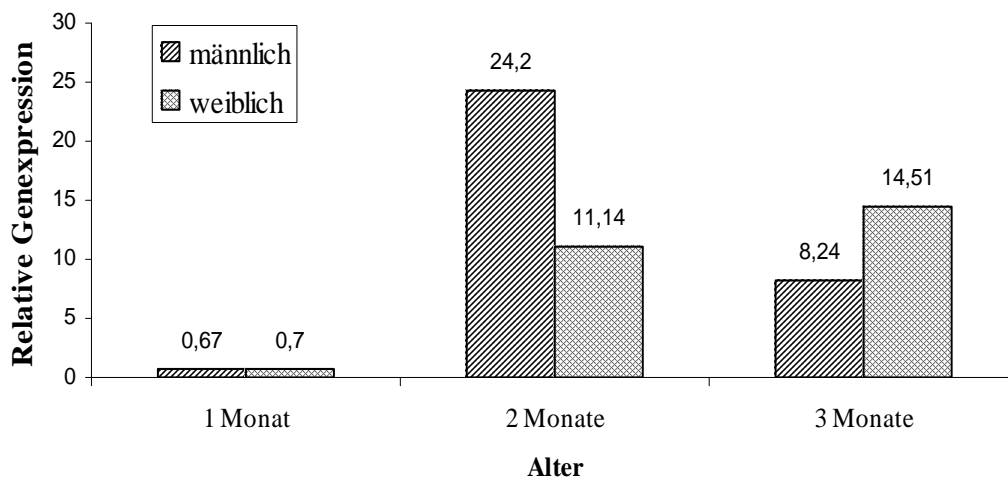


Abbildung 20: Relative Genexpression von Cx32-defizienten im Alter von einem, zwei und drei Monaten für die Zytokine MCP-1 und M-CSF

Die Werte sind auf die Genexpression des altersentsprechenden Wildtyps normiert worden. Die Genexpression für beide Gene ist in den Cx32-defizienten Mäusen gegenüber dem Wildtyp erhöht, außerdem bestehen Unterschiede zwischen weiblichen und männlichen Cx32-defizienten Mäusen.

3.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

Durch die Western Blot Analysen konnte keine Aktivierung eines der untersuchten Signaltransduktionswege nachgewiesen werden. Allerdings konnten für die ERK 1/2-Signalkaskade Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Cx32-defizienten Mäusen gezeigt werden. Die Ergebnisse der durchgeführten quantitativen PCR machen

die erhöhte Genexpression der Zytokine MCP-1 und M-CSF in Cx32-defizienten Mäusen deutlich und zeigen außerdem Unterschiede in der Genexpression zwischen weiblichen und männlichen Cx32-defizienten Mäusen.

In Nervlysaten Cx32-defizienter weiblicher Mäuse im Alter von einem Monat kann ein höherer Gehalt an phosphoryliertem ERK 1/2 und phosphoryliertem MEK im Vergleich zu männlichen Cx32-defizienten Mäusen nachgewiesen werden. Auch in der Realtime PCR zeigt sich eine erhöhte Genexpression für MCP-1 in der weiblichen Cx32-defizienten Maus gegenüber der männlichen. Für beide Geschlechter ist die Genexpression von MCP-1 im Vergleich zum Wildtyp erhöht.

Die Ergebnisse für Cx32-defiziente Mäuse im Alter von zwei Monaten lassen für Weibchen einen geringeren Gehalt an phospho-ERK 1/2 und phospho-MEK gegenüber dem Männchen nachweisen und auch in der Realtime PCR zeigt sich hier eine höhere Genexpression der Zytokine MCP-1 und M-CSF in Männchen im Vergleich zum Weibchen.

Diese Korrelation von erhöhter Genexpression der Zytokine und leicht erhöhtem Gehalt ist in Cx32-defizienten Mäusen im Alter von drei Monaten nicht mehr zu zeigen. In der Realtime-PCR ist ein Anstieg der Genexpression beider Zytokine in Cx32-defizienten Weibchen im Vergleich zum Männchen zu sehen, in denen die Genexpression im Vergleich zu zwei Monate alten Tieren wieder verringert ist. Jedoch scheint in Western Blot Analysen die ERK 1/2-Signalkaskade weiterhin nicht aktiviert zu sein. Es sind keine Unterschiede in der Aktivierung von ERK 1/2 oder MEK zwischen Cx32-defizienten drei Monate alten Weibchen und Männchen nachzuweisen.

Zusammenfassend muss gesagt werden, dass geschlechtsspezifische Unterschiede in Cx32-defizienten Mäusen für den Aktivitätsstatus der ERK 1/2-Signalkaskade gefunden werden konnten, die z. T. mit der gegenüber dem Wildtyp stark erhöhten und ebenfalls in den Geschlechtern differierenden Genexpression der Zytokine übereinstimmen. Allerdings sind diese Unterschiede in den Western Blot Analysen minimal und zum Teil nur durch ImageJ-Auswertungen nachzuvollziehen.

4 Diskussion

4.1 Aktivierungsstatus von ERK 1/2 in P₀-heterozygot- und Cx32-defizienten Mäusen

4.1.1 P₀ und Cx32 erfüllen im peripheren Nervensystem unterschiedliche Funktionen

P₀-heterozygot- und Cx32-defiziente Mäuse entwickeln beide eine periphere Neuropathie und in beiden Mausmodellen konnte eine erhöhte M-CSF- und MCP-1-Expression nachgewiesen werden. Eine mögliche Erklärung für eine unterschiedliche zelluläre Reaktion auf die jeweiligen Mutationen könnte mit der unterschiedlichen Funktion beider Proteine zusammenhängen, die sie in der Myelinscheide des peripheren Nervensystems erfüllen.

P₀ macht mit 50- 60% den größten Proteinanteil der peripheren Myelinscheide aus (Lemke 1993 als Review). Es ist für die Entwicklung der spiralförmigen Myelinschichten und ihrer Kompaktierung sowie damit auch für den Aufbau der „major dense line“ des kompakten Myelins und damit für die Struktur und Aufrechterhaltung der peripheren Myelinscheide äußerst wichtig.

Cx32 wird hingegen neben dem peripheren und zentralen Nervensystem noch in einer Vielzahl anderer Gewebe exprimiert und erfüllt die Funktion eines typischen Gap Junction Proteins (Bruzzone et al. 1996). Diese ermöglichen i. d. R. die Bildung eines interzellulären Kanals, der dem Austausch zellulärer Moleküle dient. Im peripheren Nervensystem ist Cx32 im Gegensatz zu P₀, welches sich in der kompakten Region des Myelins befindet, im nicht-kompakten Teil der Myelinscheide zu finden. Aufgrund dieser Lokalisation innerhalb der Myelinscheide wird Cx32 im peripheren Nervensystem als ein Gap Junction Protein angesehen, das hier einen schnellen *intrazellulären* Kanal durch die verschiedenen Myelinschichten (reflexive Junction) bildet, der für kleine Moleküle und Ionen zwischen dem adaxonalen und periaxonalen Teil der Schwannzelle eine Verbindung darstellt (Balice-Gordon et al. 1998, Meier et al. 2004). Somit übt Cx32 zwar eine andere Funktion als P₀ innerhalb des Myelins aus, ist aber trotzdem für die Funktion der Schwannzelle und damit für die Integration der Myelinscheide von großer Bedeutung.

Cx32 scheint zusätzlich im peripheren Nervensystem eine andere Funktion zu besitzen als in anderen Geweben, in denen es exprimiert wird. Denn Cx32-defiziente Mäuse entwickeln auf das PNS begrenzte Symptome, während andere Gewebe, in denen Cx32 ebenfalls exprimiert wird, trotzdem keinerlei sichtbare Schäden aufweisen (Scherer et al. 1998). Eine Erklärung dafür könnte die Fähigkeit vieler Gewebe sein, multiple Connexin-Arten zu exprimieren und dadurch das fehlende Cx32 funktionell zu ersetzen, wie z.B. Oligodendrozyten, die zusätzlich Connexin45 aufweisen (Kunzelmann et al. 1997).

4.1.2 Mutationen von P₀ und Cx32 lösen unterschiedliche zelluläre Signale aus

P₀-heterozygot- und Cx32-defiziente Mäusen zeigen Ähnlichkeiten im histologischen Bild der peripheren Neuropathie und auch eine erhöhte Zytokinexpression. Bei genauerer Betrachtung fällt allerdings auf, dass Cx32-defiziente Mäuse zusätzliche histologische Merkmale aufweisen, die in P₀^{+/-}-defizienten Mäusen nicht gezeigt werden können. So sind in diesen Cx32-defizienten Mäusen neben den typischen Kennzeichen wie dünnen Myelinscheiden und Zwiebelschalenformationen auch ein deutlich verbreiteter Schwanzzellfortsatz und andere zytoplasmatische Schwellungen im nicht-kompakten Myelin zu sehen. Dieser Befund mag durch die Unterschiedlichkeit der beiden Proteine in Funktion und Lokalisation bedingt sein, da die fehlende Organisation des Zytoplasmas ein Grund für die veränderte oder verringerte Kommunikation der inneren und äußeren Schwanzzellanteile sein könnte. Durch die Mutation im funktionell wichtigen Protein Cx32 ist der Gap Junction Kanal möglicherweise in seiner Funktion beeinträchtigt.

Eine ERK 1/2-Aktivierung im Zusammenhang mit einer gesteigerten Genexpression von MCP-1 in P₀^{+/-}-defizienten Mäusen könnte als eine -möglicherweise indirekte-zelluläre Reaktion auf die Mutation gesehen werden, in deren Folge die Erkrankung entsteht. In Cx32-defizienten Mäusen konnte keine ERK 1/2-Aktivierung nachgewiesen werden, also scheint die Schwanzzelle auf diese Mutation andere zelluläre Stressantworten zu besitzen. Dies mag der Tatsache Rechnung tragen, dass die beiden Proteine unterschiedliche Funktionen erfüllen.

Die Aktivierung von ERK 1/2 ist für sich allein gesehen sicherlich nicht die einzige zelluläre Reaktion der Schwanzzelle auf den Gendefekt im P₀. Zellkommunikation ist äußerst komplex und lässt sich nicht auf einzelne Signalkaskaden begrenzen, die in linearer Weise hintereinander ablaufen. Vielmehr handelt es sich um vielschichtige Prozesse, in denen Signalmoleküle mehrere Funktionen übernehmen und auf unterschiedlichste Weise miteinander in Verbindung stehen. Somit ist die Vermittlung von Stress ebenfalls als ein Zusammenspiel vieler molekularer Mechanismen zu betrachten, die in unserem Fall am Ende gemeinsame Folgen haben: eine erhöhte Genexpression von MCP-1 oder sogar die Auslösung einer peripheren Neuropathie mit aktivierten Makrophagen und demyelinisierten Nervenfasern.

Der ERK-Signaltransduktionsweg ist in zahlreiche elementare Zellprozesse eingebundene eine Signalkaskade, wie z.B. in Zellproliferation, -Transformation, -Differenzierung und Apoptose. Es sind vielfältige Proteininteraktionen bekannt, die eine ERK-Aktivierung steuern, regulieren oder beeinflussen können (Kolch, 2000). Auch vorgeschaltete Signale könnten eine ERK-Phosphorylierung und damit -Aktivierung bewirken, wie bspw. Raf-Kinase oder MEK (Yeung et al. 1999, Kolch 2000). Zwar konnte keine ERK 1/2-Aktivierung in Cx32-defizienten Mäusen nachgewiesen werden, dennoch können gleiche Komponenten einer Signalkette in beiden Mausmutanten aktiviert sein, die nur auf unterschiedliche Weise weitergeführt werden und am Ende verschiedene Signalwege aktivieren. Protein-Kinase C alpha (PKC α), die eine zentrale Rolle in einer ganzen Reihe von Signalwegen einnimmt (Swannie und Kaye 2002, Idris et al. 2001), kann bspw. eine Aktivierung von ERK bewirken (Kirchner et al. 2004). Inwieweit dies der Fall ist und welche anderen Signalmoleküle in diesen Mausmutanten eine ERK-Aktivierung auslösen, müssen weitere Studien zeigen.

Wenn die Schwanzzelle durch ihren Gendefekt in eine Art Stress gerät und damit eine andere Informationsverarbeitung aufweist, ist ferner nicht ausgeschlossen, dass das Umfeld der Zelle mit einer veränderten Signalverarbeitung reagiert, da auch innerhalb eines Gewebes Zell-Zellkommunikation besteht. Zusätzlich mag allein die strukturelle Veränderung im Myelin andere Signale auf molekularer Ebene verursachen, z. B. in Makrophagen oder Fibroblasten.

4.1.3 Keine ERK 1/2 Aktivierung in Cx32-defizienten Mäusen in Bezug auf einen gemeinsamen Mechanismus der Aktivierung von Makrophagen in Mausmodellen für CMT

Die vorliegenden Daten können die Hypothese der immunvermittelten Neuropathie als weit verbreitetes Phänomen in Myelinmutanten mit einheitlichem Pathologiemechanismus (Mäurer et al. 2002) nicht bestätigen.

Zwar wurden in P_0 -heterozygot- und Cx32-defizienten Mäuse eine erhöhte Anzahl von Makrophagen im peripheren Nerv sowie eine erhöhte Genexpression von MCP-1 gezeigt. Nach die Detektion der ERK 1/2 Aktivierung in $P_0^{+/-}$ -defizienten Mäusen konnte vermutet werden, einen weiteren Teil der gemeinsamen Pathogenese beider Mausmodellen nachgewiesen zu haben. Jedoch kann für Cx32-defiziente Mäuse diese These nicht bestätigt werden. Somit sind in $P_0^{+/-}$ - und Cx32-defizienten Mäusen unterschiedliche Faktoren bzw. Signalkaskaden zur Induktion des MCP-1-Gens vorhanden. Ein gemeinsamer Pathomechanismus beginnt erst mit einer erhöhten Genexpression von MCP-1 in den peripheren Nerven beider Mausmodelle.

Ob in anderen Mausmodellen für CMT mit erhöhter Genexpression von MCP-1 ebenfalls eine Aktivierung von ERK 1/2 gefunden werden kann, ist Gegenstand neuer Forschungen. Dies würde die Aktivierung der ERK 1/2-Signalkaskade in den gemeinsamen Pathomechanismus der Erkrankung mit einschließen und eventuell die Entwicklung eines Medikamentes vorantreiben, welches in der Lage ist, diese aktivierte Signalkaskade spezifisch zu blocken. Damit wäre man in der Lage, die Erkrankung trotz des vorhandenen Gendefekts zu verhindern. Die Pharmaindustrie hat sich in den letzten Jahren um die Entwicklung von Inhibitoren bemüht, die in der Lage sind, bestimmte Signalkaskaden spezifisch zu blocken. Dabei handelt es sich um Signaltransduktionswege, die eine wesentliche Rolle in der Pathogenese spielen und mit deren Blockade ein therapeutischer Effekt oder sogar eine Heilung erzielt werden soll. Mit dem MEK-Inhibitor CI-1040 konnte man z.B. außergewöhnlich positive Effekte in der Bekämpfung vieler Tumoren (in vitro und in vivo) erzielen, so dass sich dieser momentan in der klinischen Testphase befindet (Kramer et al. 2004, Rapp et al. 2006, Schreck und Rapp 2006).

4.2 Unterschiedlicher Aktivierungstatus der ERK-Signalkaskade in männlichen und weiblichen Cx32-defizienten Mäusen

Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen auf einen unterschiedlichen Aktivierungsstatus des ERK-Signaltransduktionsweges in Cx32-defizienten männlichen und weiblichen Mäusen hin. Beide Signalkinasen, ERK 1/2 und MEK 1/2, sind in ihrem Aktivitätsstatus in gleicher Weise verändert. Zusätzlich wurde eine geschlechtsspezifisch unterschiedlich veränderte Genexpression von MCP-1 und M-CSF aufgezeigt.

Bei genauerer Betrachtung kann eine Korrelation von erhöhter Zytokinexpression und höherem Gehalt an pERK vermutet werden. In den verschiedenen Altersgruppen stimmen die Ergebnisse der Western Blot Analysen und der RT-PCR auch in Bezug auf die Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Cx32-defizienten Mäusen überein. Ein Zusammenhang zwischen erhöhter Genexpression und ERK-Aktivierung konnte bereits in P₀-heterozygot-defizienten Mäusen nachgewiesen werden (Stefan Fischer, bisher nicht veröffentlicht).

Da die Genexpression von MCP-1 und M-CSF in männlichen und weiblichen Cx32-defizienten Mäusen stark differiert und im Wildtyp gleich hoch erscheint, muss es sich um einen Unterschied handeln, der durch die Mutation und/oder deren Folgen bedingt ist.

4.2.1 Primär unterschiedliche Genexpression in männlichen und weiblichen Mäusen

Cx32 ist auf dem X-Chromosom kodiert, welches in Weibchen zweimal vorhanden ist. Unter Umständen reagieren weibliche Mäuse auf X-chromosomale Gendefekte anders als männliche, da der Gendefekt doppelt vorhanden ist, und sich so auch Folgemechanismen, z. B. auf den Defekt hin ausgeschüttete Signalmoleküle (MCP-1, ggf. M-CSF) stärker auswirken.

Eine unterschiedliche Reaktion weiblicher und männlicher Cx32-defizienter Mäuse auf die Mutation kann auch durch eine primär unterschiedliche zelluläre Ausgangslage verursacht sein. Yang et al. (2006) berichten über eine Fülle von Beispielen für eine geschlechtlich dimorphe Genexpression bei Mäusen, in Geweben wie z. B. Muskel,

Leber, Fettgewebe oder Hirngewebe. Dabei handelt es sich um eine *gewebsspezifisch* unterschiedliche Genexpression zwischen männlichen und weiblichen Mäusen, also auch um eine unterschiedliche Expression in Genen, die für gewebsspezifische biologische Funktionen von Bedeutung sind. Zusätzlich konnte der Beweis einer in den Geschlechtern unterschiedlichen genetischen und transkriptionalen Regulation für gewebsspezifische Gene erbracht werden (Yang et al. 2006). Bisher beschriebene geschlechtlich dimorphe Gene weichen in ihrer unterschiedlichen Expression nicht so stark voneinander ab wie Gene, die für sexuelle Differenzierung oder Reproduktivität eine Rolle spielen. Also scheinen sich die Mechanismen einer geschlechtlich dimorphen Genexpression auf zellulärer Ebene abzuspielen, ohne offensichtliche phänotypische Unterschiede auf ein entsprechendes Gewebe bezogen zwischen beiden Geschlechtern zu bewirken.

Mit diesen Erkenntnissen erscheint es möglich, dass auch im peripheren Nervensystem funktionell wichtige Gene in männlichen und weiblichen Mäusen unterschiedlich exprimiert werden, ohne dass sichtbare Unterschiede in der Gewebestruktur zwischen Männchen und Weibchen erkennbar sind. Also kann auch hier eine primär unterschiedliche Ausgangslage zellulärer Mechanismen und der Zellkommunikation durch eine unterschiedliche Genexpression vorhanden sein, die auf eine Mutation folglich männliche und weibliche Mäuse unterschiedlich reagieren lässt. Dies ist möglicherweise ein Erklärung für die veränderte Aktivierung der ERK-Signalkaskade und eine unterschiedliche Genexpression von MCP-1 und M-CSF zwischen männlichen und weiblichen Cx32-defizienten Mäusen.

4.2.2 Einfluss von hormonellen Unterschieden zwischen weiblichen und männlichen Mäusen

Der unterschiedliche hormonelle Hintergrund mag eine weitere Erklärung für unterschiedliche zelluläre Reaktion Cx32-defizienter Weibchen und Männchen auf die Mutation sein. Progesteron, das weiblich Steroidhormon, wird u. a. in Gliazellen des peripheren Nervensystems synthetisiert (Koenig et al. 1995). Unlängst konnte gezeigt werden, dass Progesteron im peripheren Nervensystem an der Reifung und dem Wachstum von Axonen beteiligt ist und das Ersetzen und die Regeneration der

Myelinscheide von traumatisierten Nervenfasern stimuliert (Koenig et al. 2000). Als klassisches Sexualhormon besitzt es einen sexuellen Dimorphismus, der sich sogar auch auf das periphere Nervensystem bezieht. Denn in Nagetieren ist der Gehalt an Progesteron im Ischiasnerv in weiblichen Mäusen höher als in männlichen. In weiblichen Mäusen ist ebenso die Anzahl von um die regenerierende Nervenfasern liegenden Myelinlagen signifikant höher als in männlichen Mäusen, was auf den erhöhten Progesterongehalt im Nerven zurückgeführt werden kann (Koenig et al. 2000).

Es ist möglich, dass Progesteron auch in Cx32-defizienten Mäusen einen Einfluss auf die Pathogenese der CMTX besitzt. Denn in einem Mausmodell für CMT konnte nach künstlicher Verletzung von Nerven durch Kälte unter Gabe von Progesteron eine beschleunigte Reformation der Myelinscheide im peripheren Nerven festgestellt werden (Sereda et al. 2003). Zwar zeigen sich keinerlei histologische Unterschiede zwischen weiblichen und männlichen Cx32-defizienten Mäusen im Erkrankungsbild, aber eine durch die Mutation bedingte geschlechtlich verschieden erhöhte Genexpression von MCP-1 und M-CSF könnte auf zellulärer Ebene die Auswirkung neuroprotektiver Eigenschaften von Progesteron sein.

Weiterhin existieren intrazelluläre Hormonrezeptoren, die in der Lage sind, direkte Veränderungen der Genexpression vorzunehmen. Ein unterschiedlicher hormoneller Hintergrund weiblicher und männlicher Cx32-defizienter Mäuse könnte auch auf diesem Wege eine unterschiedliche Genexpression von MCP-1 oder ERK 1/2 und MEK 1/2 vermitteln. Hinzu kommt, dass viele dieser Hormonrezeptoren ihre Signale auch über MAP-Kinasen weitergeben oder durch diese in ihrer Aktivität reguliert werden können (Vina et al. 2006, Faivre et al. 2005). Für den Progesteronrezeptor (PR) ist gezeigt worden, dass er eine MAPK-abhängige Phosphorylierung benötigt, um seine Signale weitergeben zu können (Qui et al. 2003, Lange 2004 als Review).

Ferner kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob es sich nicht einfach um einen zeitlichen Unterschied in der Reaktion des Nervensystems auf die Mutation oder den zellulären Stress handelt. Möglicherweise gleichen männliche Cx32-defiziente Mäuse einen verringerten Anstieg der Genexpression von MCP-1 im peripheren Nerven im Vergleich zum Cx32-defizienten Weibchen zu einem späteren Zeitpunkt aus. Über die zeitliche Dynamik der Zytokinexpression ist nicht genügend bekannt. Auch im Hinblick

auf den unterschiedlichen Aktivitätsstatus von ERK 1/2 sind weitere Studien an älteren Cx32-defizienten Mäusen nötig, um einen lang anhaltenden Unterschied zellulärer Signalmechanismen in Männchen und Weibchen nachzuweisen.

5 Zusammenfassung

P₀-heterozygot- und Cx32-homozygot-defiziente Mäuse stellen suffiziente Mausmodelle für hereditäre periphere Neuropathien dar. Es konnte eine erhöhte Anzahl an Makrophagen und eine erhöhte Genexpression Makrophagen-aktivierender Zytokine, vor allem MCP-1 und M-CSF, in peripheren Nerven dieser Mäuse nachgewiesen werden. Zusätzlich ließ sich in Nerven P₀-heterozygot-defizienter Mäuse eine Aktivierung des ERK 1/2-Signaltransduktionsweges und durch Inhibitorstudien ein direkter Zusammenhang mit der erhöhten Genexpression beider Zytokine zeigen.

In dieser Arbeit wurde und mit Hilfe von Western Blot Analysen eine mögliche ERK 1/2-Aktivierung in peripheren Nerven Cx32-defizienter Mäuse untersucht, um den Mechanismus der Makrophagen-Aktivierung in Cx32-defizienten Mäusen aufzuzeigen. Zu diesem Zweck wurden periphere Nerven Cx32-defizienter weiblicher und männlicher Mäuse im Alter von einem bis drei Monate präpariert, lysiert und durch Western Blot Analysen mehrfach mit spezifischen Antikörpern gegen verschiedene Signalkinasen wie JNK, IκB, p38-MAPK, STAT, ERK 1/2 und MEK gefärbt.

Es konnte keine Aktivierung des ERK 1/2 Signaltransduktionswegs nachgewiesen werden und auch keine Aktivierung einer der anderen untersuchten Signaltransduktionswege. Der Mechanismus der Makrophagen-Aktivierung in Cx32-defizienten Mäusen unterscheidet sich von dem in P₀-heterozygot-defizienten Mäusen, obwohl beide Mausmodelle einige Ähnlichkeiten in der Pathogenese der Erkrankung aufweisen. Auf molekularer Ebene scheint die Mutation in Cx32-defizienten Mäusen andere zelluläre Reaktionen auszulösen als in P₀-heterozygot-defizienten Mäusen.

Zusätzlich ließen sich durch die in dieser Arbeit durchgeführten Western Blot Analysen Unterschiede in weiblichen und männlichen Cx32-defizienten Mäusen in Bezug auf den Gehalt an phosphoryliertem ERK 1/2 und MEK in peripheren Nerven nachweisen. Es wurden Echtzeit-PCR für MCP-1 und M-CSF durchgeführt, in denen eine unterschiedlich hohe Genexpression beider Zytokine zwischen männlichen und weiblichen Cx32-defizienten Mäusen im Alter von einem bis drei Monaten gezeigt werden konnte. Ob diese Ergebnisse Ausdruck einer generell unterschiedlichen Genexpression weiblicher und männlicher Mäuse sind, durch zelluläre Wirkungen von Sexualhormonen zustande kommen oder eine unterschiedliche Reaktion weiblicher und

männlicher Cx32-defizienter Mäuse auf die Mutation sind, bleibt Gegenstand weiterer Forschungen.

Literaturverzeichnis

Abrams CK, Seunghoon OH (2000) Mutations in Connexin32: the molecular and biophysical bases for the X-linked form of Charcot-Marie-Tooth disease. *Brain Research Reviews* 32:203-214

Ahn M, Moon C, Lee Y, Koh CS, Kohyama K, Tanuma N, Matsumoto Y, Kim HM, Kim SR, Shin T (2004) Activation of extracellular signal-regulated kinases in the sciatic nerves of rats with experimental autoimmune neuritis. *Neurosci Lett* 372(1-2):57-61

Anzini P, Neuberg DHH, Schachner M, Nelles E, Willecke K, Zielasek J, Toyka KV, Suter U, Martini R (1997) Structural abnormalities and deficient maintenance of peripheral nerve myelin in mice lacking the gap junction protein Connexin32. *Journal of Neuroscience* 17(12), 4545-4551

Arroyo EJ, Scherer SS (2000) On the molecular architecture of myelinated fibers. *Histochem Cell Biol* 113, 1-18

Auer-Grumbach M, Wagner K, Fazekas F, Löscher WN, Strasser-Fuchs S, Hartung HP (1999) Hereditäre motorisch-sensible Neuropathien (Charcot-Marie-Tooth Syndrom) und verwandte Neuropathien. *Nervenarzt* 70:1052-1061

Balice-Gordon RJ, Bone LJ, Scherer SS (1998) Functional gap junctions in the Schwann cell myelin sheath. *J. Cell Biol* 142, 1095-1104

Berger P, Young P, Suter U (2002) Molecular cell biology of Charcot-Marie-Tooth disease. *Neurogenetics* 4:1-15

Berger P, Niemann A, Suter U (2006) Schwann cells and the pathogenesis of inherited motor and sensory neuropathies (Charcot-Marie-Tooth disease). *Glia*. 54(4):243-57

Berghoff M, Samsam M, Müller M, Kobsar I, Toyka KV, Kiefer R, Mäurer M, Martini R (2005) Neuroprotective effect of the immune system in a mouse model of severe dysmyelinating hereditary neuropathy: enhanced axonal degeneration following disruption of the RAG-1 gene. *Mol. Cell. Neurosci.* 28: 118- 127

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

Birouk N, LeGuern E, Maisonobe T (1998) X-linked Charcot-Marie-Tooth disease with connexin 32 mutations. Clinical and electrophysiologic study. *Neurology* 50:1047-1082

Bone LJ, Deschenes SM, Balice-Gordon RJ, Fischbeck KH, Scherer SS (1997) Connexin32 and X-linked Charcot-Marie-Tooth Disease. *Neurobiology of Disease* 4, 221-230

- Brone D, Steck AJ (2006) Periphäre Neuropathien. *Schweiz Med Forum* 6:209-214
- Bruzzone R, White, Paul DL (1996) Connections with connexins: the molecular basis of direct intercellular signaling. *Eur.J.Biochem.* 238, 1-27
- Carenini S, Mäurer M, Werner A, Blazyca H, Toyka KV, Schmid CD, Raivich G, Martini R (2001) The Role of Macrophages in Demyelinating Peripheral Nervous System of Mice Heterozygously Deficient in P0. *The Journal of Cell Biology*, 152 (2) 301–308
- Cerghet M, Skoff RP, Bessert D, Zhang Z, Mullins C Ghandour MS (2006) Proliferation and death of oligodendrocytes and myelin proteins are differentially regulated in male and female rodents. *Journal of Neuroscience*, 26(5):1439-1447
- Chandross KJ (1998) Nerve injury and inflammatory cytokines modulate gap junctions in the peripheral nervous system. *Glia* 24:21-31
- Chen ZJ (2005) Ubiquitin signalling in the NF- κ B pathway. *Nature Cell Biology* 7, No8 758-765
- Colucci-D'Amato, Perrone-Capano C, Di Porzio U (2003) Chronic activation of ERK and neurodegenerative diseases. *BioEssay* 25:1085-1095
- Comalada M, Valledor AF, Sanchez-Tillo E, Umberto I, Xaus J, Celadal A (2003) Macrophage colony-stimulating factor-dependent macrophage proliferation is mediated through a calcineurin-independent but immunophilin-independent mechanism that mediates the activation of external regulated kinases. *Eur. J. Immunol.* 33: 3091–3100
- Darnell JEJ (1997) STATs and gene regulation. *Science* 277, 1630-1635
- Dell'Albani P, Santangelo R, Torrisi L, Nicoletti VG, Giuffrida Stella AM (2003) Role of the JAK/STAT signal transduction pathway in the regulation of gene expression in CNS. *Neurochemical Research* 24 (1) 53-64
- Deschenes SM, Walcott JL, Wexler TL, Scherer SS, Fischbeck KH (1997) Altered trafficking of mutant connexin32. *J Neurosci* 17(23):9077-84
- Dobrovolskaia MA, Kozlov SV (2005) Inflammation and cancer: when NF- κ B amalgamates the perilous partnership. *Curr Cancer Drug Targets* (5):325-44
- Dyck PJ, Lambert EH (1968) Lower motor and primary sensory neuron diseases with peroneal muscular atrophy: I. Neurologic, genetic, and electrophysiologic findings in hereditary polyneuropathies. *Arch Neurol* 18:603-618
- Dyck PJ, Lambert EH (1968) Lower motor and primary sensory neuron disease with peroneal muscular atrophy: II. Neurologic, genetic, and electrophysiologic findings in various neuronal degenerations. *Arch Neurol* 18:619-625

- Faivre E, Skildum A, Pierson-Mullany L, Lange CA (2005) Integration of progesterone receptor mediated rapid signaling and nuclear actions in breast cancer cell models: role of mitogen-activated protein kinases and cell cycle regulators. *Steroids* 70(5-7):418-26
- Ferzaz B, Koenig HL, Ressouches A (1989) Axonal regeneration in *Trembler* mouse, a schwann cell mutant. *Comptes-rendus de l'Académie ce Série III Paris* 309 :377-382
- Fischer S, Kleinschnitz C, Müller M, Kobsar I, Ip CW, Rollins BJ, Martini R (2008) Monocyte chemoattractant protein-1 is a pathogenic component in a model for a hereditary peripheral neuropathy. *Mol Cell Neurosci.* 37:359–366
- Foltz IN, Schrader JW (1997) Activation of the stress-activated protein kinases by multiple hematopoietic growth factors with the exception of interleukin-4. *Blood* 89(9):3092-6
- Garbay B, Heape AM, Sargueil F, Cassagne C (2000) Myelin synthesis in the peripheral nervous system. *Progress in Neurobiology* 61, 267-304
- Giese KP, Martini R, Lemke G, Soriano P, Schachner M (1992) Mouse P0 gene disruption leads to hypomyelination, abnormal expression of recognition molecules, and degeneration of myelin and axons. *Cell* 71(4):565-76
- Giese KP, Martini R, Lemke G, Soriano P, Schachner M (1992) Disruption of the P0 gene in mice leads to hypomyelination, abnormal expression of recognition molecules, and degeneration of myelin and axons. *Cell* 71:565–576
- Goebeler M, Kilian K, Gillitzer R, Kunz M, Yoshimura T, Bröcker EB, Rapp UR, Ludwig S (1999) The MKK6/p38 stress kinase cascade is critical for Tumor Necrosis Factor- α -induced expression of Monocyte-Chemoattractant Protein-1 in endothelial cells. *Blood* 93 (3) 857-865
- Grehl H, Rautenstrauß B (1997) Hereditäre motorisch-sensible Neuropathien. *Deutsches Ärzteblatt* 94 (51):1275-1278
- Guennon R, Schumacher M, Robert F, Delespierre B, Guézou M, Eychenne B, Akura Y, Robes P, Baulieu (1997) Neurosteroids: expression of functional 3 β -hydroxysterodi dehydrogenase by rat sensory neurons and Schwann cells. *European J of Neuroscience* 9:2236-2247
- Gutierrez H, Haloe VA, Dolcet X, Davies A (2005) NF-kB signalling regulates the growth of neural processes in the developing PNS and CNS. *Development* 132, 1713-1726
- Hahn AP, Bolton EF, White CM, Brown WF, Tuuha SC, Tan CC, Ainsworth PJ (1999) Genotype/phenotype correlations in X-linked dominant Charcot-Marie-Tooth disease. *Ann NY Acad. Sci.* 883:366-382

Harrisingh MC, Perez-Nadales E, Parkinson DB, Malcolm DS, Mudge AW, Lloyd AC (2004) The Ras/Raf/ERK signalling pathway drives Schwann cell dedifferentiation. *EMBO J.*,23(15):3061-71

Hattori H, Yamamoto M, Yoshihara T, Koike H, Nakagawa M, Yoshikawa H, Ohnishi A, Hayasaka K, Onodera O, Baba M, Yasuda H, Saito T, Nakashima K, Kira J, Kaji R, Oka N, Sobue G (2003) Demyelinating and axonal features in Charcot-Marie-Tooth disease with mutations in myelin-relating proteins (PMP22, MBP, Cx32): a clinicopathological study of 205 Japanese patients. *Brain* 126:134-151

Heynkes R, Kozjek G, Trdub O, Willecke K (1986) *FEBS Lett.* 205, 56-60

Ho GJ, Drego R, Hakimian E, Masliah E (2005) Mechanisms of cell signaling and inflammation in Alzheimer's disease. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 4(2):247-56

Hommel DW, Peppelenbosch MP, Van Deventer SJH (2003) Mitogen activated protein (MAP) kinase signal transduction pathways and novel anti-inflammatory targets. *Gut* 52:144-151

Huang DR, Wang J, Kivisakk P, Rollins BJ, Ransohoff RM (2001) Absence of monocyte chemoattractant protein 1 in mice leads to decreased local macrophage recruitment and antigen-specific T helper cell type 1 immune response in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Exp. Med.* 193(6) 713–725

Idris I, Gray S, Donnelly R (2001) Protein kinase C activation: isozyme-specific effects on metabolism and cardiovascular complications in diabetes. *Diabetologia* 44(6): 659-73

Ip WK, Wong CK, Lam CWK (2006) Interleukin (IL)-4 and IL-13 up-regulate monocyte chemoattractant protein-1 expression in human bronchial epithelial cells: involvement of p38 mitogen-activated protein kinase, extracellular signal-regulated kinase1/2 and Janus kinase-2 but not c-Jun NH2-terminal kinase1/2 signalling pathways. *Clin Exp Immunol*, 145:162–172

Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ (2002) *Immunologie*. 5. Auflage, Spektrum, Akad. Verlag

Johnson GL, Lapadat R (2002) Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 298:1911-1912

Kaminska B (2005) MAPK signalling pathways as molecular targets for anti-inflammatory Therapy - from molecular mechanisms to therapeutic benefits. *Biochimica et Biophysica Acta* 1754 (2005) 253 – 262

Kaplan AI, Deshpande DM, Scott E, Krishnan C, Carmen JS, Shats I, Martinez T, Drummond J, Dike S, Pletnikov M, Keswani SC, Moran TH, Pardo CA, Calabresi PA, Kerr DA (2005) IL-6 induces regionally selective spinal cord injury in patients with the neuroinflammatory disorder transverse myelitis. *The Journal of Clinical Investigation* 115(10):2731-2741

Kenney AM, Kocsis JD (1998) Peripheral axotomy induces long-term c-Jun amino-terminal kinase-1 activation and activator protein-1 binding activity by c-Jun and junD in adult rat dorsal root ganglia In vivo. *J Neurosci.* 18(4):1318-28

Kiefer R, Kieseier BC, Stoll G, Hartung HP (2001) The role of macrophages in immune-mediated damage to the peripheral nervous system. *Progress in Neurobiology* 64:109–127

King TJ, Lampe PD (2004) Mice deficient for the gap junction protein Connexin32 exhibit increased radiation-induced tumorigenesis associated with elevated mitogen-activated protein kinase (p44/Erk1, p42/Erk2) activation. *Carcinogenesis* 25 (5) .669-680

Kirchner S, Boldt S, Kolch W, Haffner S, Kazak S, Janosch P, Holler E, Andreesen R, Eissner G (2004) LPS resistance in monocytic cells caused by reverse signaling through transmembrane TNF (mTNF) is mediated by the MAPK/ERK pathway. *J Leukoc Biol* 75(2):324-31

Kleopa KA, Orthman JL, Enriquez A, Paul DL, Scherer SS (2004) Unique distributions of the gap junction proteins Connexin29, Connexin32 and Connexin47 in oligodendrocytes. *Glia* 47,346-357

Kleopa KA, Scherer SS (2006) Molecular genetics of X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *Neuromolecular Med* 8(1-2):107-22

Koenig HL, Schumacher M, Ferzaz B, Do Thi NA, Ressouches A, Guennoun R, Jung-Testas I, Robel P, Akwa Y, Baulieu EE (1995) Progesterone synthesis and myelin formation by Schwann cells. *Science* 268:1500-1503

Koenig HL, Gong WH, Pelissier P (2000) Role of progesterone in peripheral nerve repair. *Reviews of Reproduction* 5:189-199

Kobsar I, Mäurer M, Ott T, Martini R (2002) Macrophage-related demyelination in peripheral nerves of mice deficient in the gap junction protein Connexin32. *Neuroscience Letters* 320, 17-20

Kobsar I, Berghoff M, Samsam M, Wessig C, Mäurer M, Toyka KV, Martini R (2003) Preserved myelin integrity and reduced axonopathy in Connexin32-deficient mice lacking the recombination activating gene-1. *Brain* 126, 804-813

Kobsar I, Hasenpusch-Theil K, Wessig C, Muller HW, Martini R (2005) Evidence for macrophage-mediated myelin disruption in an animal model for Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 1A. *J Neurosci Res* 81(6):857-64

Kolch W, Philipp A, Mischak H, Dutil EM, Mullen TM, Feramisco JR, Meinkoth JL, Rose DW (1996) Inhibition of Raf-1 signaling by a monoclonal antibody, which interferes with Raf-1 activation and with Mek substrate binding. *Oncogene* 13(6): 1305-14

- Kolch W (2000) Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem. J* 351: 289-305
- Kramer BW, Götz R, Rapp UR (2004) Use of mitogenic cascade blockers for treatment of C-Raf induced lung adenoma in vivo: CI-1040 strongly reduces growth and improves lung structure. *BMC cancer* 4:24;1471-2407
- Kumar NM, Gilula NB (1986) Cloning and characterization of human and rat liver cDNAs coding for a gap junction protein. *J. Cell Biol.* 103, 767-776.
- Kumar NM, Gilula NB (1992) Molecular biology and genetics of gap junction channels. *Semin. Cell Biol.* 3, 3- 16.
- Kumar NM, Gilula NB (1996) The gap junction communication channel. *Cell.* 9;84(3):381-8
- Kunzelmann P, Blumcke I, Traub O, Dermietzel R, Willecke K (1997) Coexpression of connexin45 and -32 in oligodendrocytes of rat brain. *J Neurocytol* 26(1):17-22
- Kyriakis JM, Banerjee P, Nikolakaki E, Dai T, Rubie EA, Ahmad MF, Avruch J, Woodgett JR (1994) The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature* 369:156–160
- Lange CA (2004) Making Sense of cross-talk between steroid hormone receptors and intracellular signaling pathways: who will have the last word? *Molecular Endocrinology* 18(2):269-278
- Lemke G (1993) The molecular genetics of myelination: an update. *Glia* 7(4):263-71
- Lewis RA (2000) The challenge of CMTX and Connexin32 mutations. *Muscle Nerve* 23: 147-149
- Lyon, M.F (1963) Gene action in the X-chromosome of the mouse. *Nature*, 100:372
- Mäurer M, Schmid CD, Bootz F, Zielasek J, Toyka KV, Oehen S (2001) Bone marrow transfer from wild-type mice reverts the beneficial effect of genetically mediated immune deficiency in myelin mutants. *Mol Cell Neurosci* 17:1094±101
- Mäurer M, Kobsar I, Berghoff M, Schmid CD, Carenini S, Martini R (2002) Role of immune cells in animal models for inherited neuropathies: facts and visions. *J. Anat.* 200:405–414
- Mäurer M, Müller M, Kobsar I, Leonhard C, Martini R, Kiefer R (2003) Origin of pathogenic macrophages and endoneurial fibroblast-like cells in an animal model of inherited neuropathy. *Molecular and Cellular Neuroscience* 23:351–359
- Maier M, Berger P, Suter U (2002) Understanding Schwann cell-neurone interactions: the key to Charcot-Marie-Tooth disease? *J.Anat.* 200:357-366

- Martini R, Zielasek J, Toyka KV, Giese KP, Schachner M (1995b) Protein zero (P0)-deficient mice show myelin degeneration in peripheral nerves characteristic of inherited human neuropathies. *Nature Genet.*, 11:281–286
- Martini R, Schachner M (1997) Molecular Bases of myelin formation as revealed by investigations on mice deficient in glial cell surface molecules. *Glia* 19:298-310
- Martini R, Carenini S (1998) Formation and maintenance of the myelin sheath in the peripheral nerve: roles of cell adhesion molecules and the gap junction protein Connexin 32. *Microscopy Research and Technique* 41:403–415
- Martini R (2001) The effect of myelinating Schwann cells on axons. *Muscle Nerve* 24, 456-466
- Martini R, Toyka KV (2004) Immune-mediated components of hereditary demyelinating neuropathies: lessons from animal models and patients. *Lancet Neurol* (8):457-65
- Meier C, Dermietzel R, Davidson KGV, Yasumura T, Rash JE (2004) Connexin32-containing gap junctions in Schwann cells at the Internodal zone of partial myelin compaction and in Schmidt-Lanterman incisures. *J. Neuroscience* 24(13)3186-3198
- Nagy JI, Ionescu AV, Lynn BD, Rash JE (2003) Coupling of Astrocyte Connexins Cx26, Cx30, Cx43 to Oligodendrocyte Cx29, Cx32, Cx47: Implications From Normal and Connexin32 Knockout Mice. *Glia* 44:205–218
- Nelles E, Bützler C, Jung D, Temme A, Gabriel HD, Dahl U, Traub O, Stümpel F, Jungermann K, Zielasek J, Toyka KV, Dermietzel R, Willecke K (1996) Defective propagation of signals generated by sympathetic nerve stimulation in the liver of connexin32-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 9565-9570
- Nicholson G, Nash J (1993) Intermediate nerve conduction velocities define X-linked Charcot–Marie–Tooth neuropathy families. *Neurology* 43:2558–2564
- Nicholson GA (2006) The dominantly inherited motor and sensory neuropathies: clinical and molecular advances. *Muscle Nerve* 33, 589-597
- Nicholson SM, Gomés D, Néchaud B, Bruzzone R (2001) Altered gene expression in Schwann cells of Connexin32 knockout animals. *J Neurosci Res* 66:32-36
- Nicholson SM, Ressot C, Gomés D, Andrea PD, Perea J, Duval N, Bruzzone R (1999) Connexin32 in the peripheral nervous system. Functional analysis of mutations associated with X-linked Charcot-Marie-Tooth syndrome and implications for the pathophysiology of the disease. *Ann N Y Acad Sci* 883:168-85
- Obata K, Yamanaka H, Dai Y, Mizushima T, Fukuoka T, Tokunaga A, Noguchi K (2004) Activation of extracellular signal-regulated protein kinase in the dorsal root ganglion following inflammation near the nerve cell body. *Neuroscience* 126:1011–1021

- Ouyang DY, Wang1 YY, Zheng1 YT (2005) Activation of c-Jun N-terminal kinases by ribotoxic Stresses. *Cellular & Molecular Immunology* 2(6):419-425
- Paul DL (1986) Molecular cloning of cDNA for rat liver gap junction protein. *J. Cell Bid.* 103, 123-134.
- Quarles RH (2005) Comparison of CNS and PNS myelin proteins in the pathology of myelin disorders. *Journal of the Neurological Sciences* 228:187–189
- Qui M, Olsen A, Faivre E, Horwitz KB, Lange CA (2003) Mitogen-activated protein kinase regulates nuclear association of human progesterone receptors. *Mol Endocrinol* 17:628-642
- Rapp UR, Götz R, Albert S (2006) BuCy RAFs drive cells into MEK addiction. *Cancer Cell* 9(1):9-12
- Ressot C, Bruzzone R (2000) Connexin channels in Schwann cells and the development of the X-linked form of Charcot-Marie-Tooth disease. *Brain Research Review* 32, 192-202
- Robinson MJ, Cobb MH (1997) Mitogen-activated protein kinase pathways. *Current Opinion in Cell Biology* 9:180-186
- Rozear MP, Pericak-Vance MA, Fischbeck K, Stajich JM, Gaskell Jr PC, Krendel DA, Graham DG, Dawson DV, Roses AD (1987) Hereditary motor and sensory neuropathy, X-linked: a half century follow-up. *Neurology* 37:1460 –1465
- Saez JC, Berthoud VM, Branes MC, Martinez AD, Beyer EC (2003) Plasma membrane channels formed by connexins: their regulation and functions. *Physiol Rev* 83(4):1359-400
- Saklatvala J (2004) The p38 MAP kinase pathway as a therapeutic target in inflammatory disease. *Current Opinion in Pharmacology* 4:372-377
- Schara U, Mortler W (2003) Neuromuskuläre Erkrankungen. *Monatsschr Kinderheilkd* 151:1221–1239
- Scherer SS, Deschenes SM, Xu YT, Grinspan JG, Fischbeck KH, Paul DL (1995) Connexin32 is a myelin-related protein in the PNS and CNS. *J. Neurosci.* 15, 8281-8294
- Scherer SS, Xu VT, Nelles E, Fischbeck K, Willecke K, Bone LJ (1998) Connexin32-null mice develop demyelinating peripheral neuropathy. *Glia* 28:8-20
- Scherer SS, Bone LJ, Deschenes SM, Abel A, Balice-Gordon RJ, Fischbeck KH (1999) The role of the gap junction protein connexin32 in the pathogenesis of X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *Novartis Found Symp* 219:175–185

- Scherer SS, Xu XT, Messing A, Willecke K, Fischbeck KH, Bone Jeng LJ (2005) Transgenic expression of human Connexin32 in myelinating schwann cells prevents demyelination in Connexin32-null mice. *The Journal of Neuroscience* 25(6):1550 – 1559
- Scherer SS (2006) Finding the causes of inherited neuropathies. *Arch Neurol* 63(6):812-6
- Schreck R, Rapp UR (2006) Raf kinases: Oncogenesis and drug discovery. *Int. J. Cancer* 119, 2261-2271
- Shy ME (2004) Charcot-Marie-Tooth disease: an update. *Curr Opin Neurol* 17:579-658
- Schmid CD, Stienekemeier M, Oehen S, Bootz F, Zielasek J, Gold R, Toyka KV, Schachner M, Martini R (2000) Immune deficiency in mouse models for inherited peripheral neuropathies leads to improved myelin maintenance. *The Journal of Neuroscience* 20(2):729–735
- Sereda MW, zu Hörste GM, Suter U, Uzma N, Nave KA (2003) Therapeutic administration of progesterone antagonist in a model of Charcot-marie-Tooth disease (CMT-1A). *Nature Medicine* 9(12):1533-1537
- Shibata Y, Kumai M, Nishii K, Nakamura K (2001) Diversity and molecular anatomy of gap junctions. *Med Electron Microsc* 34:153–159
- Shuai K, Liu B (2003) Regulation of JAK-STAT signalling in the immune system. *Nat Rev Immunol* 3 (11) 900-911
- Siebert H, Sachse A, Kuziel WA, Maeda N, Bruck W (2000) The chemokine receptor CCR2 is involved in macrophage recruitment to the injured peripheral nervous system. *J Neuroimmunol.* 110(1-2):177-85
- Sohl G, Willecke K (2003) An update on connexin genes and their nomenclature in mouse and man. *Cell Commun Adhes.* 10(4-6):173-80
- Subang MC, Richardson PM (2001) Influence of injury and cytokines on synthesis of monocyte chemoattractant protein-1 mRNA in peripheral nervous tissue. *Eur J Neurosci* 13:521±8
- Swannie HC, Kaye SB (2002) Protein kinase C inhibitors. *Curr Oncol Rep* 4(1): 37-46
- Taskinen HS, Roytta M (2000) Increased expression of chemokines (MCP-1, MIP-1alpha, RANTES) after peripheral nerve transection. *J Peripher Nerv Syst* 5: 75±81
- Theis M, Söhl G, Eiberger J, Willecke K (2005) Emerging complexities in identity and function of glial connexins. *Trends in Neuroscience* 28 No 4

- Toews AD, Barrett C, Morell P (1998) Monocyte chemoattractant protein 1 is responsible for macrophage recruitment following injury to sciatic nerve. *J Neurosci Res* 1998, 53: 260±7
- Venkatesan BA, Mahimainathan L, Ghosh-Choudhury N, Gorin Y, Bhandari B, Valente AJ, Abboud HE, Choudhury GG (2006) PI 3 kinase-dependent Akt kinase and PKC ϵ independently regulate interferon- γ -induced STAT1 α serine phosphorylation to induce monocyte chemotactic protein-1 expression. *Cellular Signalling* 18:508–518
- Vina J, Sastre J, Pallardo FV; Gambini J, Borras C (2006) Role for mitochondrial oxidative stress to explain the different longevity between genders: protective effect of estrogens. *Free Radic Res.* 40(12): 1359-65
- Wang HL, Chang WT, Yeh TH, Wu T, Chen MS, Wu CY (2004) Functional analysis of connexin-32 mutants associated with X-linked dominant Charcot-Marie-Tooth disease. *Neurobiology of Disease* 15, 361-370
- Wang Ip C, Kroner A, Fischer S, Berghoff M, Kobsar I, Mäurer M, Martini R (2006) Role of immune cells in animal models for inherited peripheral neuropathies. *Neuromolecular Med* 8(1-2):175-90
- Warner LE, Hilz MJ, Appel SH, Killian JM, Kolodny EH, Karpati G, Carpenter S, Watters GV, Wheeler C, Witt D, Bodell A, Nelis E, van Broeckhoven C, Lupski JR (1996) Clinical phenotypes of different MPZ (P0) mutations may include Charcot-Marie-Tooth 1B, Dejerine-Sottas, and congenital hypomyelination. *Neuron* 17:435–449
- Wei CJ, Xu X, Lo CW (2004) Connexins and Cell Signaling in Development and Disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 20:811-38
- Willecke K, Temme A, Teubner B, Ott T (1999) Characterization of targeted connexin32-deficient mice: a model for the human Charcot-Marie-Tooth (X-type) inherited disease. *Ann N Y Acad Sci.* 14;883:302-9
- White TW, Paul DL (1999) Genetic diseases and gene knockouts reveal diverse connexin functions. *Annu Rev Physiol.* 61:283-310
- Wong M-H, Filbin MT (1996) Dominant-negative effect on adhesion by myelin P0 protein truncated in its cytoplasmic domain. *J Cell Biol* 134:1531–1541
- Yang X, Schadt EE, Wang S, Wang H, Arnold AP, Ingram-Drake L, Drake TA, Lusis AJ (2006) Tissue-specific expression and regulation of sexually dimorphic genes in mice. *Genome Research*
- Yeager M (1998) Structure of cardiac gap junction intercellular channels. *J Struct Biol.* 121(2):231-45
- Yeager M, Unger VM, Falk MM (1998) Synthesis, assembly and structure of gap junction intercellular channels. *Curr Opin Struct Biol.* 8(4):517-24

Yeung K, Seitz T, Li S, Janosch P, McFerran B, Kaiser C, Fee F, Katsanakis KD, Rose DW, Mischak H, Sedivy JM, Kolch W (1999) Suppression of Raf-1 kinase activity and MAP kinase signalling by RKIP. *Nature* 401: 173-177

Zhou L, Giffin JW (2004) Demyelinating neuropathies. *Curr Opin Neurol* 16:307-313

Zielasek J, Martini R, Toyka KV (1996) Functional abnormalities in P0-deficient mice resemble human hereditary neuropathies linked to P0 gene mutations. *Muscle Nerve* 19(8):946-52

Zrouri H, Goascogne CL, Li WW, Pierre M, Courtin F (2004) The role of MAP kinases in rapid gene induction after lesioning of the rat sciatic nerve. *European Journal of Neuroscience* 20, 1811-1818

Anhang

Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. rer. nat. R. Martini für die Überlassung des Promotionsthemas sowie für die Betreuung und stete Unterstützung auch über die weite Entfernung hinweg.

Ganz besonders möchte ich Stefan Fischer für seine Geduld bei der methodischen Einarbeitung und die vielfache Hilfestellung zur Fertigung dieser Arbeit danken, weiterhin der gesamten Arbeitsgruppe für das freundliche Klima im Labor.

Ein spezieller Dank richtet sich an Familie Erben, die mich so herzlich bei sich aufgenommen hat und mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand, sowie an meine Familie für ein sorgenfreies Medizinstudium und die allzeit erfahrene Unterstützung.

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name Juliane Greeske
Geburtsdatum 13. November 1981 in Duisburg
Adresse Bleichstr. 20
17489 Greifswald

Schulische Ausbildung

1988 - 1992 Evangelische Grundschule Baerl, Duisburg
1992 - 2001 Gymnasium Aldolfinum Moers
Schuljahr 1998/99 Fyffe High School in Alabama, USA
2001 Allgemeine Hochschulreife

Universitäre Ausbildung

2001 - 2007 Studium der Humanmedizin an der Ernst-Moritz-
Arndt Universität Greifswald
08/2003 Ärztliche Vorprüfung (Physikum)
08/2006 – 07/2007 Praktisches Jahr
1. Abschnitt Pädiatrie, Sana Krankenhaus Rügen GmbH
2. Abschnitt Innere Medizin, Universität Greifswald
3. Abschnitt Chirurgie, Universität Greifswald und
University of Sydney, Australien
12/2007 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung;
02/2008 Erlangung der Approbation

Wissenschaftliche Tätigkeit

05-11/2007 Stipendiatin des Graduiertenkollegs 520
„Immunmodulation“ an der Julius-Maximilian
Universität Würzburg

Greifswald, Februar 2008