

Aus der Arbeitsgruppe *Molecular and Translational Neurology*
(Leiter: Prof. Dr. med. M. W. Sereda)
des Max-Planck-Instituts für experimentelle Medizin
in Göttingen

**Identifizierung von *In-vivo*-
Interaktionspartnern von PMP22 im
peripheren Nerven der Ratte**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Friederike Antonia Arlt

aus

Aachen

Göttingen 2021

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück

Betreuungsausschuss

Betreuer: Prof. Dr. med. M. W. Sereda

Co-Betreuer: Prof. Dr. med. H. Urlaub

Prüfungskommission

Referent: Prof. Dr. med. M. W. Sereda

Co-Referent: Prof. Dr. med. H. Urlaub

Promotor: Prof. Dr. R. Dressel

Datum der mündlichen Prüfung: 21.03.2023

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel „Identifizierung von *In-vivo*-Interaktionspartnern von PMP22 im peripheren Nerven der Ratte“ eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den

.....

(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	IV
Tabellenverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VI
1 Einleitung	1
1.1 Charcot-Marie-Tooth-Erkrankungen und die Charcot-Marie-Tooth-Erkrankung 1A	1
1.1.1 Epidemiologie und Klassifikation der Charcot-Marie-Tooth-Erkrankungen	1
1.1.2 Klinische, histologische und elektrophysiologische Befunde bei der Charcot-Marie-Tooth-Erkrankung 1A.....	1
1.1.3 Ursache der Charcot-Marie-Tooth-Erkrankung 1A.....	3
1.1.4 Pathophysiologie der Charcot-Marie-Tooth-Erkrankung 1A	3
1.1.5 Therapieansätze der Charcot-Marie-Tooth-Erkrankung 1A	4
1.2 PMP22	4
1.2.1 Das <i>PMP22</i> -Gen sowie Lokalisation und Regulation der PMP22-Expression	4
1.2.2 PMP22-Struktur.....	6
1.2.3 PMP22 und seine Bedeutung für das Myelin und die Schwann-Zelle im peripheren Nervensystem	7
1.3 Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen	15
1.3.1 Co-Immunopräzipitation und Massenspektrometrie.....	16
1.3.2 Immunopräzipitation von Membranproteinen und dabei bekannte Schwierigkeiten	17
1.3.3 Proteinquervernetzung	20
1.4 Aufgabenstellung dieser Arbeit	21
2 Material und Methoden	23
2.1 Material.....	23
2.2 Versuchstiere	33
2.2.1 Tierhaltung und Zucht	33
2.2.2 Kennung der Tiere und Identifikation der Tiere	33
2.2.3 Tötung der Versuchstiere, Probengewinnung und Präparation des <i>N. ischiadicus</i> ..	33
2.3 Probenverarbeitung und kryogenes Mörsern.....	34
2.4 Proteinquervernetzung	35
2.5 Proteinkonzentrationsbestimmung.....	35
2.6 Solubilisierung.....	36
2.7 Western Blot	37
2.7.1 Western-Blot-Prinzip	37
2.7.2 Probenvorbereitung.....	37
2.7.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	37

2.7.4	Immunoblot.....	39
2.7.5	FAST-Green-Färbung.....	39
2.7.6	Spezifischer Proteinnachweis	39
2.7.7	Strippen der Transfermembran	40
2.8	Vergleich der Bindungseffektivität der Anti-PMP22-Antikörper	41
2.9	Proteinquantifizierung mittels Coomassie-Gel-Färbung	41
2.10	Protein-G-gekoppelte- <i>Dynabeads</i> , Titration.....	42
2.11	Immunopräzipitation.....	43
2.11.1	Probenvorbereitung.....	43
2.11.2	Protein-G-gekoppelte <i>Dynabeads</i> , Vorbereitung.....	44
2.11.3	Klärung von Homogenisaten mit Kaninchen-IgGs.....	44
2.11.4	Klärung von Homogenisaten mit leeren Protein-G-gekoppelten <i>Dynabeads</i>	44
2.11.5	Immunopräzipitation.....	45
2.11.6	Quantitative und qualitative Analyse mittels Western Blot.....	45
2.12	Massenspektrometrie	46
2.12.1	Massenspektrometrie-Prozedere.....	46
2.12.2	Analyse der Massenspektrometrie-Daten	46
3	Ergebnisse	49
3.1	Vorversuche zur Proteinquervernetzung und Solubilisierung	49
3.1.1	Proteinquervernetzung durch BS3 bildete PMP22-haltige hochmolekulare Spezies	49
3.1.2	Die verwendeten Detergenzien zeigten unterschiedliche Effektivität zur Solubilisierung von PMP22.....	50
3.1.3	Die Effektivität der Proteinquervernetzung stieg mit zunehmender BS3-Konzentration an.....	52
3.2	Vorversuch zur Antikörperbindungseffektivität der Anti-PMP22-Antikörper.....	55
3.3	Der erste Immunopräzipitationsversuch mit BS3 zeigte kein PMP22-spezifisches Signal im Western Blot.....	56
3.4	Optimierung der Versuchsbedingungen für die Immunopräzipitation von PMP22.....	58
3.4.1	Der Anti-PMP22-Antikörper von Sigma und die Kaninchen-IgGs mussten in unterschiedlichen Mengen in der Immunopräzipitation eingesetzt werden.....	59
3.4.2	Die Inkubation mit Protein-G-gekoppelten <i>Dynabeads</i> führte zu einer mengenabhängigen Reduktion der Proteinmenge	60
3.5	Die optimierte Immunopräzipitation mit BS3 zeigte ein spezifisches PMP22- und ein spezifisches MPZ-Signal im Western Blot	62
3.6	Die Immunopräzipitationen von PMP22 ohne BS3 zeigten unterschiedliche Ergebnisse.....	63
3.7	In beiden Immunopräzipitationsverfahren, mit und ohne Proteinquervernetzung, wurden mittels Massenspektrometrie spezifisch angereicherte Proteine identifiziert.....	65
3.8	Die in den Immunopräzipitationen mit und ohne BS3 angereicherten Proteine zeigten Übereinstimmungen	69
4	Diskussion.....	75

4.1	Proteinquervernetzung und Solubilisierung von PMP22.....	75
4.2	Die nicht erfolgreiche Immunopräzipitation von PMP22 und daraus resultierende Optimierungen der Versuchsbedingungen.....	77
4.3	Die Bedeutung der in dieser Arbeit gezeigten Immunopräzipitationen von PMP22 mit und ohne Proteinquervernetzung	80
4.4	Die potentiellen <i>In-vivo</i> -Interaktionspartner von PMP22 und deren Implikationen für die Pathophysiologie der Charcot-Marie-Tooth-Erkrankung 1A.....	81
4.5	Limitationen der hier gezeigten Daten zu potentiellen <i>In-vivo</i> -Interaktionspartnern von PMP22	88
4.5.1	Der fehlende direkte Nachweis von mit PMP22 proteinquervernetzten Proteinen ..	88
4.5.2	Die Anzahl der Massenspektrometrie-Messungen und Abundanz der detektierten Proteine	93
4.5.3	Ausblick auf folgende Experimente	94
5	Zusammenfassung	95
6	Literaturverzeichnis	97

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Sekundärstruktur von PMP22	7
Abbildung 1.2: Mögliche Interaktionsformen von PMP22 und MPZ im Myelin.....	10
Abbildung 1.3: Arbeitsmodell für die Rolle von PMP22 als Regulator der PI3K/AKT/mTOR- und Ras/MEK/ERK-Signalkaskade	13
Abbildung 1.4: Zelluläre und molekulare Krankheitsmechanismen der mit PMP22- Mutationen assoziierten Neuropathien.....	14ff
Abbildung 1.5: Vereinfachte Darstellung der stadienhaften Solubilisierung von Lipid- Doppelschichten von Biomembranen	18
Abbildung 2.1: <i>Cryo-Grinder</i> und Akkuschauber für die mechanische Lyse von Ratten- Ischias-Nerven.....	34
Abbildung 3.1: Proteinquervernetzung mit BS3 und Glutaraldehyd	49
Abbildung 3.2: Solubilisierung von PMP22 mit und ohne Proteinquervernetzung.....	51
Abbildung 3.3: BS3-Titration vor und nach Solubilisierung	53ff
Abbildung 3.4: Anti-PMP22-Antikörper-Effektivität im Western Blot	56
Abbildung 3.5: PMP22-IP mit Proteinquervernetzung.....	57ff
Abbildung 3.6: Mengenvergleich des Anti-PMP22-Antikörpers und der Kaninchen-IgGs	59
Abbildung 3.7: Protein-G-gekoppelte <i>Dynabeads</i> -Titration.....	61ff
Abbildung 3.8: PMP22-IP mit Proteinquervernetzung nach Optimierung der Versuchsbedingungen	62ff
Abbildung 3.9: PMP22-IPs ohne vorherige Proteinquervernetzung.....	65
Abbildung 3.10: MS-Ergebnis der PMP22-IP mit Proteinquervernetzung.....	66ff
Abbildung 3.11: MS-Ergebnis der PMP22-IP ohne Proteinquervernetzung	68
Abbildung 3.12: Potentielle Protein-Interaktionspartner von PMP22	70
Abbildung 3.13: GO-Term-Analyse der potentiellen PMP22-Protein-Interaktionspartner.	73
Abbildung 4.1: Schematische Darstellung der CFLN-1 modulierenden Signalwege in Schwann-Zellen.....	84
Abbildung 4.2: Schematische Darstellung der Proteinquervernetzung und damit verbundene Modifikationen von Proteinstrukturen.....	89
Abbildung 4.3: Schematische Darstellung der Bindestellen von BS3 und dem Anti-PMP22- Antikörper am PMP22-Molekül.....	92

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Verbrauchsmaterialien	23
Tabelle 2.2: Chemikalien	24ff
Tabelle 2.3: Zusammensetzungen des Phosphatpuffers PBS (<i>phosphate-buffered saline</i>)..	25
Tabelle 2.4: Zusammensetzung des Tris-Puffers	25
Tabelle 2.5: Zusammensetzung der 10% SDS-Stammlösung.....	26
Tabelle: 2.6: Zusammensetzungen der Laufpuffer für SDS-PAGE(Natriumdodecylsulfat- Gelelektrophorese)-Gele	26
Tabelle 2.7: Rezepte für SDS-PAGE-Gele	26ff
Tabelle 2.8: Zusammensetzungen der 5x LD (<i>loading dye</i>) für SDS-PAGE	27
Tabelle 2.9: Zusammensetzungen der Transferpuffer für Western Blots	27
Tabelle 2.10: Zusammensetzungen der Waschpuffer und Blocklösungen für Western Blots	27ff
Tabelle 2.11: Zusammensetzungen der Stripping-Lösungen für Western Blots	28
Tabelle 2.12: Zusammensetzungen der FAST-Green-Lösungen.....	28
Tabelle 2.13: Zusammensetzungen verschiedener Probenpuffer.....	29
Tabelle 2.14: Zusammensetzungen verschiedener IP-Puffer.....	29ff
Tabelle 2.15: Zusammensetzungen der Färbelösungen für Coomassie-Färbungen.....	30
Tabelle 2.16: Enzyme, Nukleinsäuren und Reaktionskomplettsysteme	30
Tabelle 2.17: Antikörper	30ff
Tabelle 2.18: Geräte.....	31ff
Tabelle 2.19: Software	32
Tabelle 2.20: Detergenzname und Anteil des Detergenz am Solubilisierungspuffer in %..	36
Tabelle 2.21: Verdünnungsverhältnisse der für Western Blots verwendeten Primär- und Sekundärantikörper	40
Tabelle 2.22: eingesetzte Dynabeads-Mengen in der Protein-G-gekoppelten-Dynabeads- Titration	43

Abkürzungsverzeichnis

AKT	<i>v-akt murine thymoma viral oncogene homolog-1</i> , murines Thymom-V-Akt-Onkogen-Homolog-1
ApoD	<i>apolipoprotein D</i> , Apolipoprotein D
APS	<i>ammonium peroxodisulfate</i> , Ammoniumperoxodisulfat
aqua bidest.	<i>double distilled water</i> , doppelt destilliertes H ₂ O
aqua dest.	<i>distilled water</i> , destilliertes H ₂ O
ATP1A1	<i>sodium-potassium-transporting ATPase</i> , subunit α -1, α -1-Untereinheit der Na ⁺ /K ⁺ -ATPase
BP	<i>biological pathway</i> , biologischer Prozess
BS3	<i>bisulfosuccinimidylsberate</i> , Bissulfosuccinimidylsberat
CAD11	<i>cadherin-11</i> , Cadherin-11
CC	<i>cellular compartment</i> , zelluläres Kompartiment
CFLN1	<i>cofilin-1</i> , Cofilin-1
CHAPS	<i>cholamidopropyl-dimethylammonio-propanesulfonate</i> , Cholamidopropyl-dimethylammoniumpropansulfonat
CMT	Charcot-Marie-Tooth <i>disease</i> , Charcot-Marie-Tooth-Erkrankung
CMT1A	Charcot-Marie-Tooth <i>disease type 1A</i> , Charcot-Marie-Tooth-Erkrankung Typ 1A
Co-IP	<i>co-immunoprecipitation</i> , Co-Immunopräzipitation
DDM	<i>dodecyl-β-D-maltoside</i> , Dodecyl- β -D-maltosid
DTT	<i>1,4-dithiothreitol</i> , 1,4 Dithiothreitol
EC1	<i>extracellular domain 1</i> , extrazelluläre Domäne 1
EC2	<i>extracellular domain 2</i> , extrazelluläre Domäne 2
ECL	<i>enhanced chemoluminescence</i> , signalverstärkte Chemolumineszenz
ERK	<i>extracellular signal regulated kinase</i> , extrazelluläre Signal regulierte Kinase
EZM	<i>extracellular matrix</i> , extrazelluläre Matrix
F-Aktin	<i>filamentous actin</i> , filamentöses Aktin
FCF	<i>for coloring food</i> , zur Lebensmittelfärbung
GO-Term	<i>gene ontology term</i> , Gen-Ontologie-Terminus
HNPP	<i>hereditary neuropathy with liability to pressure palsies</i> , hereditäre Neuropathie mit Neigung zu Druckläsionen
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> , Meerrettich-Peroxidase
IgG	<i>immunoglobulin G</i> , Immunglobulin G
IP	<i>immunoprecipitation</i> , Immunopräzipitation
JAM-C	<i>junctional adhesion molecule C</i> , junktionales Adhäsionsmolekül C
KEGG	kyoto encyclopedia of genes and genomes, Kyoko Enzyklopädie der Gene und Genome
LC	<i>liquid chromatography</i> , Flüssigkeitschromatographie

LD	<i>loading dye</i> , farbstoffhaltiger Ladepuffer
LFQ	<i>label free quantification</i> , markierungsfreie Quantifizierung
LIMK	<i>LIM kinase</i> , LIM-Kinase
MAG	<i>myelin-associated glycoprotein</i> , Myelin-assoziiertes Glykoprotein
MEK	<i>mitogen-activated protein kinase kinase</i> , Mitogen-aktivierte Protein Kinase-Kinase
MF	<i>molecular function</i> , molekulare Funktion
MLA	<i>myelin like assembly</i> , Myelin-artiges Aggregat
MPZ	<i>myelin protein zero</i> , Myelin Protein Null
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i> , Boten-Ribonukleinsäure
MS	<i>mass spectrometry</i> , Massenspektrometrie
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i> , Rapamycin-Zielstruktur im Säugetier
N.	<i>Nervus</i>
NCV	<i>nerve conduction velocity</i> , Nervenleitgeschwindigkeit
NHS-Ester	<i>N-hydroxysuccinimide ester</i> , N-hydroxysuccinimid-Ester Verbindungen
NRG-1	<i>neuregulin 1</i> , Neuregulin-1
P2X7	<i>P2X purinoreceptor 7</i> , P2X-Purinorezeptor 7
PAK	<i>p21-activated kinase</i> , p21-aktivierte Kinase
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i> , phosphatgepufferte Salzlösung
PI3K	<i>phosphatidylinositol-3-kinase</i> , Phosphoinositid-3-Kinase
PMP22	<i>peripheral myelin protein 22</i> , peripheres Myelinprotein 22
PNS	<i>peripheral nervous system</i> , peripheres Nervensystem
PRX	<i>periaxin</i> , Periaxin
PVDF	<i>polyvinylidene fluoride</i> , Polyvinylidenfluorid
RAC	<i>ras-related botulinum toxin substrate 1</i> , Ras-assoziiertes Botulinum Toxin-Substrat 1
Ras	<i>rat sarcoma</i> , Ratten-Sarkom
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> , Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SSH1	<i>slingshot-1 phosphatase</i> , Phosphatase Slingshot-1
TAZ	<i>transcriptional coactivator with PDZ binding motif</i> , transkriptionaler Co-Aktivator mit PDZ-bindendem Motiv
TBS	<i>Tris(hydroxymethyl)-aminomethan buffered saline</i> , Tris(hydroxyaminomethyl)-aminomethan gepufferte Salzlösung
TBS-T	<i>Tris(hydroxymethyl)-aminomethan buffered saline with Tween20</i> , Tris(hydroxyaminomethyl)-aminomethan gepufferte Salzlösung mit Tween20
TEMED	<i>tetramethylethylene diamine</i> , Tetramethylethylendiamin

TM	<i>transmembrane domain</i> , Transmembrandomäne
Tris	<i>Tris(hydroxymethyl)-aminomethan</i> , Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
YAP	<i>yes-associated protein</i> , yes-assoziiertes Protein
ZNS	<i>central nervous system</i> , zentrales Nervensystem

1 Einleitung

Im peripheren Nervensystem (PNS) gibt es im Gegensatz zum zentralen Nervensystem (ZNS) eine einzige Gliazelle, die als Schwann-Zelle bezeichnet wird und welche die Funktionen der verschiedenen Gliazellen des ZNS übernimmt. So sind Schwann-Zellen u. a. für die Myelinisierung von Axonen des PNS zuständig. Defekte der Schwann-Zellen und/oder der Myelinisierung können daher Ursachen für Erkrankungen des PNS sein, die man als periphere Neuropathien bezeichnet.

1.1 Charcot-Marie-Tooth-Erkrankungen und die Charcot-Marie-Tooth-Erkrankung 1A

1.1.1 Epidemiologie und Klassifikation der Charcot-Marie-Tooth-Erkrankungen

Die Charcot-Marie-Tooth-Erkrankungen (CMTs, auch als hereditäre motorisch-sensorische Neuropathien bezeichnet) stellen eine Gruppe aus hereditären Neuropathien des PNS dar. Sie haben eine Prävalenz von 1:2500 (Skre 1974; Ionasescu 1995) und ihr häufigster Subtyp ist die CMT1A (Skre 1974; Mostacciolo et al. 1991; Schenone et al. 2011). Diese macht dabei ca. 50 – 60% aller CMT-Erkrankungen aus (Lupski et al. 1991; Ionasescu 1995) und ist somit die häufigste angeborene Neuropathie des PNS. Die CMT1A gehört zu der großen Gruppe der primär demyelinisierenden CMT-Neuropathien (CMT1), die ursprünglich den primär axonalen Formen der CMT-Erkrankungen (CMT2) gegenübergestellt wurde (Shy et al. 2005; Nave et al. 2007). Durch Weiterentwicklung der Einteilung der CMT-Erkrankungen und in Anbetracht des bei der CMT1A nachweisbaren sekundären axonalen Schadens spricht man jedoch nicht von einer rein demyelinisierenden Neuropathie. Diagnostisch lässt sich die Demyelinisierung histologisch sowie insbesondere elektrophysiologisch nachweisen (siehe 1.1.2), womit auch der Ursprung und Nutzen dieser Einteilung erkennbar ist.

1.1.2 Klinische, histologische und elektrophysiologische Befunde bei der Charcot-Marie-Tooth-Erkrankung 1A

In der klinischen Ausprägung sowie bezüglich des Alters bei Erstmanifestation der Erkrankung zeigt die CMT1A eine starke Variabilität (Ionasescu 1995; Birouk et al. 1997;

Lupski und Chance 2005). Hauptsächlich präsentiert sie sich im Jugend- und jungen Erwachsenenalter mit symmetrischer, distal betonter Muskelschwäche und -atrophie der unteren Extremität (Sereda und Nave 2006), die langsam progredient ist (Birouk et al. 1997) und in der klinisch-neurologischen Untersuchung u. a. als Deformierung der Füße mit Hohlfuß- und Krallenzehenbildung sowie später als Beeinträchtigung des Gehens in Form des Steppergangs auffällt (Lupski und Chance 2005). Die obere Extremität ist meistens weniger stark betroffen als die untere. Sensible Defizite kommen vor (Shy et al. 2005), bleiben jedoch oft von den Patienten unbemerkt. Auffällig sind weiterhin Abschwächungen der Muskeleigenreflexe (Shy et al. 2005; Schenone et al. 2011).

Histologisch zeigen sich in Querschnitten von Nervenbiopsien betroffener Patienten sowie von entsprechenden Nerven aus Tiermodellen der CMT1A segmentale Demyelinisierungen insbesondere großkalibriger Axone, ein axonaler Verlust sowie Zwiebelschalenformationen (Sereda und Nave 2006; Nave et al. 2007). Diese Zwiebelschalenformationen entsprechen demyelinisierten Axonen, die mit konzentrischen Lagen aus Schwann-Zellmembranen umrandet sind (Shy et al. 2005) und sind auf eine pathologische Überexpression von glialem NRG-1 (Neuregulin-1), einem u. a. für die Schwann-Zell-Entwicklung relevanten Wachstumsfaktor, zurückzuführen (Fledrich et al. 2019). In früheren Entwicklungsstadien bzw. jüngeren Patienten fallen hingegen neben aktiver Demyelinisierung v. a. hypermyelinisierte Axone auf (Gabreëls-Festen et al. 1995). In dermalen Nervenbiopsien von CMT1A-Patienten fanden sich zudem einheitlich verkürzte Längen der Internodien (Saporta et al. 2009).

Elektrophysiologisch stellt sich die Demyelinisierung als reduzierte NCV (*nerve conduction velocity*) von < 38 m/s am *N. (Nervus) ulnaris* dar, welche regelhaft schon früh bei CMT1A-Patienten nachweisbar ist (Kaku et al. 1993; Manganelli et al. 2016). Sogar bei klinisch asymptomatischen Patienten mit der für die Erkrankung typischen Genmutation (siehe 1.1.3) lässt sich eine reduzierte NCV messen (Kaku et al. 1993; Manganelli et al. 2016). Die CMAPs (*compound motor action potentials*), die elektrophysiologisch neben der NCV und weiteren Parametern bestimmt werden, zeigen sich als Ausdruck des sekundären axonalen Schadens in Kongruenz zur klinisch feststellbaren Muskelatrophie und -schwäche bei betroffenen Patienten reduziert (Krajewski et al. 2000).

1.1.3 Ursache der Charcot-Marie-Tooth-Erkrankung 1A

Ursächlich für die CMT1A ist in der Regel eine Duplikation des Gens, das für PMP22 (*peripheral myelin protein 22*) codiert (Lupski et al. 1991; Raeymaekers et al. 1991; Kaku et al. 1993). Hierbei handelt es sich größtenteils um heterozygote DNA-Duplikationen von 1,4 Mio. Basenpaaren auf Chromosom 17p11.2 – 12, welche autosomal dominant vererbt werden (Ionasescu 1995). Die Duplikation entsteht außerdem sporadisch durch unvollständiges Crossing-over während der Meiose im Rahmen der Spermatogenese (Raeymaekers et al. 1991; Palau et al. 1993), da die betroffene Genregion von stark homologen Wiederholungssequenzen flankiert wird, die als Hotspots für diese Mutationsentstehung gelten (Pentao et al. 1992; Reiter et al. 1996). Das für PMP22 codierende Gen befindet sich neben anderen Genen in dieser Duplikationsregion (Matsunami et al. 1992; Pentao et al. 1992; Timmerman et al. 1992; Valentijn et al. 1992). Für die hereditäre Neuropathie mit Neigung zu Druckläsionen (HNPP) ist genau die reziproke Deletion der beschriebenen Genregion verantwortlich (Adlkofer et al. 1997). So kommt es bei der HNPP zum Verlust eines *PMP22*-Allels und zur 0,5-fachen Gendosis von PMP22 (Chance et al. 1993; Stögbauer et al. 2000). Für andere Subtypen der CMT-Erkrankungen wie die CMT1E und einige Fälle der CMT3 (Dejerine-Sottas-Syndrom) sind hingegen Punktmutationen im *PMP22*-Gen als Ursachen der Erkrankungen beschrieben worden (Roa et al. 1993).

1.1.4 Pathophysiologie der Charcot-Marie-Tooth-Erkrankung 1A

Man geht bei der CMT1A sowie bei der HNPP von einer Gendosis-Erkrankungen aus, wobei erst die Dosiserhöhung einer 1,5-fachen Genexpression von *PMP22* zur CMT1A-Pathologie führt (Chance et al. 1992; Lupski et al. 1992; Nave et al. 2007; Pantera et al. 2019), während die Dosiserniedrigung einer 0,5-fachen Genexpression von *PMP22* den HNPP-Phänotyp bedingt (Chance et al. 1993; Adlkofer et al. 1997; Gabriel et al. 1997). Ein von Hirt et al. (2015) publizierter Fallbericht zeigte zudem, dass die genetische Kombination aus einem Allel mit *PMP22*-Duplikation und einem *PMP22*-deletierten Allel in zwei verwandten Individuen keinen für die CMT1A oder HNPP typischen neuropathischen Phänotyp verursachte. Die Autoren beschrieben die elektrophysiologischen und klinischen Normalbefunde der betroffenen Geschwister als Folge einer regelrechten Gendosis von PMP22 (Hirt et al. 2015). Der genaue Pathomechanismus der CMT1A-Erkrankung, der von der erhöhten Gendosis zur frühen Hypermyelinisierung und segmentalen Demyelinisierung sowie zum sekundären axonalen Schaden insbe-

sondere großkalibriger Nervenfasern führt, wird trotz langjähriger Erforschung noch intensiv diskutiert. So gibt es verschiedene Hypothesen zur Krankheitsentstehung, die später im Zusammenhang mit der noch nicht entschlüsselten Funktion von PMP22 beschrieben werden sollen (siehe 1.2.3). Allerdings steht der Theorie, die CMT1A als eine (reine) Gendosis-Erkrankung zu verstehen, inzwischen ein vollständig anderes pathomechanistisches Konzept der Erkrankung gegenüber. So schlägt Li (2017) vor, dass es sich bei der CMT1A um eine durch hohe Variabilität der *PMP22*-Expression bedingte Neuropathie handelt, der eine gestörte Genomstruktur und dadurch veränderte intra- und interchromosomale Interaktionen zugrunde liegen könnten.

1.1.5 Therapieansätze der Charcot-Marie-Tooth-Erkrankung 1A

Die CMT1A lässt sich bisher nicht kurativ behandeln. Gemeinsam mit den Bemühungen die Pathophysiologie der CMT1A zu entschlüsseln (siehe Kapitel 1.2.3) werden präklinische Therapieansätze entwickelt, die auf das Eingreifen in die identifizierten oder vermuteten molekularen Mechanismen der Erkrankung abzielen (Shy 2006; Fledrich et al. 2019). Neben der Überexpression von PMP22 scheinen insbesondere die von dem Wachstumsfaktor NRG-1 abhängigen Signalwege hierbei eine Rolle zu spielen. So zeigte die Reduktion der PMP22-Expression und der glialen NRG-1-Expression sowie eine Substitution von axonalem NRG-1 in PMP22-überexprimierenden Tiermodellen der CMT1A eine effektive Linderung des neuropathischen Phänotyps (Perea et al. 2001; Sereda et al. 2003; Passage et al. 2004; Fledrich et al. 2014; Zhao et al. 2018; Fledrich et al. 2019; Prukop et al. 2019). Außerdem wurde die Anwendung anti-neuro-inflammatorischer Wirkstoffe wie Kurkuma, ASS und Coenzym-Q sowie von Vitamin C und trophischen Faktoren wie Neurotrophin-3 erprobt (Passage et al. 2004; Vigo et al. 2005). Es handelt sich bei den Genannten allerdings um Therapieversuche, die auf den Menschen größtenteils bisher nur unzureichend anwendbar sind. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit der Suche nach neuen Therapieansätzen.

1.2 PMP22

1.2.1 Das *PMP22*-Gen sowie Lokalisation und Regulation der *PMP22*-Expression

Im humanen Genom findet sich das für PMP22 codierende Gen auf Chromosom 17p11.2 und ist 40 kb groß (Li et al. 2013). Es besteht bei Menschen wie bei Ratten aus sechs

Exons, von denen fünf in den codierenden Anteil des *PMP22*-Gens entfallen (Li et al. 2013) und das erste, nicht codierende Exon in zwei alternativ gespleißten Varianten als Exon1a und Exon1b vorkommt (Spreyer et al. 1991; Welcher et al. 1992; Jetten und Suter 2000). *PMP22* wird in erster Linie von den myelinisierenden Schwann-Zellen des PNS exprimiert, wobei die Expression mit der Bildung von Myelin während der Entwicklung des *N. ischiadicus* korreliert (Snipes et al. 1992; Bosse et al. 1994; Jetten und Suter 2000) und im Rahmen von Schwann-Zell-Dedifferenzierung bei Nervendurchtrennung oder axonaler Degeneration herunterreguliert wird (Spreyer et al. 1991; Welcher et al. 1991). Es ist Bestandteil der Myelinscheide im kompakten Myelin und macht als zweithäufigstes Protein nach MPZ (*myelin protein zero*) ca. 2 – 5% der Gesamtmenge an Myelinproteinen im peripheren Nerven aus (Spreyer et al. 1991; Welcher et al. 1991). Auch außerhalb des PNS wird *PMP22* exprimiert (Baechner et al. 1995; Parmantier et al. 1995; Ohsawa et al. 2006). Seine biologische Hauptfunktion übt es vermutlich im PNS aus, da sich *PMP22*-Mutationen lediglich dort manifestieren (Rossor et al. 2017).

Die Expression und Synthese von *PMP22* wird innerhalb enger Grenzen und mithilfe verschiedener prätranskriptioneller sowie posttranslationaler Mechanismen reguliert (Pantera et al. 2019). Neben den verschiedenen Promotoren sind *Enhancer*-Regionen vor dem *Pmp22*-Gen identifiziert worden, die das Expressionsmuster maßgeblich beeinflussen (Maier et al. 2002; Maier et al. 2003; Jones et al. 2012; Lopez-Anido et al. 2016; Pantera et al. 2018). Auch sind einzelne Transkriptionsfaktoren, welche die Expression von *PMP22* im Tiermodell regulieren, bekannt: *SOX10* (*SRY-box containing gene 10*) und *EGR2* (*early growth response 2*) fördern als allgemeine Induktoren von Myelinisierungsgenen auch die Transkription von *Pmp22* (Jones et al. 2011; Pantera et al. 2019), weiterhin scheinen *YAP/TAZ* (*yes-associated protein/transcriptional coactivator with PDZ binding motif*), *TEAD1* (*TEA domain family member 1*) sowie *LXR* (*liver X receptor*)-Transkriptionsfaktoren hierfür relevant zu sein (Jang et al. 2012; Inglese et al. 2014; Lopez-Anido et al. 2016; Dranchak et al. 2018). Außerdem spielt der Acetylierungsstatus von H3K27 (der Aminosäure Lysin, die an Stelle 27 des Histons H3 vorkommt) für die Expression von *Pmp22* eine Rolle (Lopez-Anido et al. 2016). Auf Ebene der RNA(*ribonucleic acid*)-Prozessierung wird die *Pmp22*-Expression durch alternatives Splicing und den Einfluss von si(*small interfering*)-RNAs reguliert (Verrier et al. 2009; Visigalli et al. 2016).

1.2.2 PMP22-Struktur

PMP22 ist ein 22 kDa großes Protein, welches aus vier Transmembrandomänen besteht und zur Familie der Claudin/PMP22/EMP(*epithelial membrane protein*)-Proteine gehört (D'Urso und Müller 1997; Jetten und Suter 2000). Es wird zunächst als *Core*-Protein von 18 kDa synthetisiert und posttranslational durch eine N-Glykosylierung modifiziert (Welcher et al. 1991; Pareek et al. 1993). Der N- und C-Terminus von PMP22 befinden sich intrazellulär, während die zwei als EC1 (*extracellular domain 1*) und EC2 (*extracellular domain 2*) bezeichneten extrazellulären Domänen als *Loops* nach außen orientiert sind (D'Urso und Müller 1997). Obwohl bisher keine definitive Beschreibung der Ultrastruktur von PMP22 existiert, sind Teile der Struktur mithilfe von CD(*circular dichroism*)- und NMR(*nuclear magnetic resonance*)-Spektroskopie sowie von softwarebasierten Homologie-Modellen eindeutiger geworden. So gehen die meisten Autoren davon aus, dass PMP22 zum Großteil aus Helices besteht und die erste Transmembrandomäne des Proteins eine lange α -Helix ist, während die übrigen Transmembrandomänen ein gemeinsames ungeordnetes Helix-Bündel bilden, welches von der ersten Transmembrandomäne räumlich getrennt ist (Mobley et al. 2007; Myers et al. 2008; Sakakura et al. 2011; Li et al. 2013; Mittendorf et al. 2014). Hierbei scheint die korrekte Anordnung der Helices zueinander für die Funktionalität des Proteins von Bedeutung zu sein, da mehrere einen neuropathischen Phänotyp verursachende Mutationen von *PMP22* zur fehlerhaften Transmembran-Organisation der Helices führen (Mittendorf 2014). Die EC1 und EC2 besitzen außerdem Metallionen-bindende Eigenschaften an bis zu sieben verschiedenen Stellen, die für die Zinkbindungs-Kapazität von PMP22 verantwortlich sein könnten (Myers et al. 2008). Diese Eigenschaft erscheint relevant, da eine ausreichende Zinkzufuhr als für die Entwicklung und den Erhalt peripherer Nerven der Ratte essentiell gilt (Unal et al. 2005). Zwischen der zweiten und dritten Transmembrandomäne wurde eine Palmitoylierung an Cys85 beschrieben, welche die Formgebung und Bewegung epithelialer Zellen in Kultur beeinflusst und somit für Interaktionen von PMP22 mit Signalproteinen für Zellmigrationsprozesse von Bedeutung sein könnte (Zoltewicz et al. 2012). Die Glykosylierungsstelle von PMP22 findet sich an Asn41 der EC1, welche als L2/HNK1(*hereafter designated L2*)-Kohlenhydrat-Epitop gilt, das u. a. für zelluläre Adhäsionsprozesse relevant ist (Hammer et al. 1993; Snipes et al. 1993). PMP22 beinhaltet vier Cysteine mit freien SH-Gruppen, von denen zwei sich in der EC2 befinden. Auf der Grundlage eines Claudin-15-Homologie-Modells deklarierten Mittendorf et al. (2014) eine intramolekulare Disulfidbrücke zwischen diesen

beiden Cysteinen, deren biologische Bedeutung jedoch noch unklar ist. Die Abbildung 1.1 zeigt eine schematische Darstellung der Sekundärstruktur von PMP22.

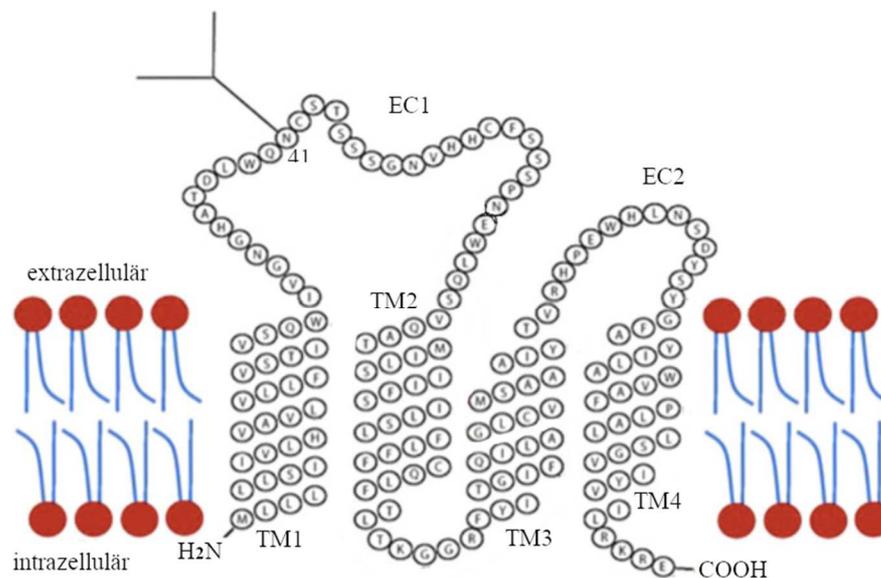


Abbildung 1.1: **Sekundärstruktur von PMP22:** PMP22 besteht aus vier Transmembrandomänen (TM1 – 4) und hat zwei extrazelluläre Domänen (EC1 und EC2), an Asn41 befindet sich eine Glykosylierungsstelle (Wang et al. 2017). Die Verwendung der Abbildung erfolgt mit freundlicher Genehmigung von John Wiley & Sons.

1.2.3 PMP22 und seine Bedeutung für das Myelin und die Schwann-Zelle im peripheren Nervensystem

Die neuropathischen Phänotypen von *PMP22*-Mutationsträgern (Duplikation wie bei der CMT1A, Deletion wie bei der HNPP oder Punktmutationen wie bei der CMT1E) verdeutlichen die Funktion von PMP22 für die Bildung und Aufrechterhaltung intakten Myelins im PNS. Trotz jahrelanger intensiver Forschung ist die genaue biologische Funktion von PMP22 jedoch weiterhin unklar. Im Folgenden soll der aktuelle Stand zur biologischen Funktion von PMP22 zusammen mit den damit verbundenen pathophysiologischen Theorien für die PMP22-assoziierten Neuropathien dargestellt werden.

1.2.3.1 PMP22 und Apoptose

PMP22-überexprimierende Schwann-Zellkulturen zeigen eine erhöhte Apoptoserate im Vergleich zu Schwann-Zellen ohne PMP22-Überexpression (D'Urso und Müller 1997; Zoidl et al. 1997; Hanemann et al. 1998; Nobbio et al. 2004). *In vivo* fanden Sancho et al.

(2001) hingegen die vermehrte Apoptose nur bei gealterten Schwann-Zellen und nicht zum Zeitpunkt der floriden Demyelinisierung. Im Gegensatz hierzu zeigten Fledrich et al. (2019) jedoch eine verringerte Apoptoserate im PMP22-überexprimierenden Schwann-Zellen und diskutierten als Ursache ein Überwiegen des anti-apoptotisch wirkenden glialen NRG-1-Effekts über der pro-apoptotisch wirkenden PMP22-Überexpression (Fledrich et al. 2019). Ein monokausaler Zusammenhang zwischen PMP22-Überexpression und dadurch veränderter Apoptoserate von Schwann-Zellen scheint daher für das pathophysiologische Verständnis der CMT1A nicht plausibel.

1.2.3.2 PMP22 und Protein-Überladung der Schwann-Zelle

Die Synthese und der Transport von Wildtyp-PMP22 hat bereits eine geringe Effizienz, da nur ca. 20% des translatierten PMP22 an die Plasmamembran gelangen (Pareek et al. 1993). Daher könnten sowohl die Überexpression von PMP22 als auch *PMP22*-Punktmutationen zu einer Überforderung und Dysfunktion der Protein-Synthese- und -Abbaumaschinerie der Schwann-Zelle führen. Tatsächlich erhöhen pathogene PMP22-Varianten die Fehlfaltungsrate von PMP22 und vermindern den Transport von PMP22 zur Plasmamembran (Naef und Suter 1999; Tobler et al. 1999; Colby et al. 2000; Tobler et al. 2002; Schleich et al. 2015). Es konnte eine vermehrte Protein-Aggregatbildung, ein veränderter Endosomenverkehr sowie eine verminderte Aktivität des Proteasoms in Schwann-Zellkulturen bzw. Tiermodellen mit verschiedenen *Pmp22*-Mutationen gezeigt werden (Notterpek et al. 1999; Niemann et al. 2000; Fortun et al. 2003; Fortun et al. 2006). Pathogene PMP22-Varianten bilden nämlich stabilere Komplexe mit bestimmten Proteinen des intrazellulären Proteintransportsystems aus als Wildtyp-PMP22, was zu einer Retention dieser pathogenen PMP22-Varianten im endoplasmatischen Retikulum (ER) führt und so erhöhten ER-Stress bei *Pmp22*-Mutationsträgern induzieren könnte (Dickson et al. 2002; Hara et al. 2014). In PMP22-überexprimierenden Mausmodellen wurde als Kompensation der proteasomalen Dysfunktion eine erhöhte Autophagierate der Schwann-Zellen diskutiert (Fortun et al. 2006). Li et al. (2013) merkten jedoch an, dass diese Mechanismen der zellulären Fehlfunktionen in Zellen bzw. Tieren mit Punktmutationen oder mit einer großen Anzahl an *Pmp22*-Kopien (mehr als sieben) gezeigt wurden. Sie spielen somit eventuell für die humane gendosisbedingte CMT1A eine untergeordnete Rolle, da hier i. d. R. (nur) drei Kopien des *PMP22*-Gens vorliegen (Li et al. 2013).

1.2.3.3 PMP22 und die intrazelluläre Kalziumkonzentration der Schwann-Zelle

Schwann-Zellen aus Tiermodellen mit *Pmp22*-Duplikation zeigen eine erhöhte basale Kalzium-Konzentration infolge eines vermehrten Kalziumeinstroms von extrazellulär (Nobbio et al. 2009). Dieser ist durch die mit der *Pmp22*-Duplikation assoziierten Überexpression von P2X7 (P2X-Purinorezeptor 7), einem Purinorezeptor und Kalziumkanal, bedingt (Nobbio et al. 2009). Pharmakologische Inhibitionen von P2X7 führt *in vitro* und *in vivo* zu einer verbesserten Myelinisierung im CMT1A-Rattenmodell (Nobbio et al. 2009; Sociali et al. 2016). Es konnte außerdem ein vermehrter Kalziumeinstrom in Schwann-Zellen mit heterozygoter *Pmp22*-Punktmutation gezeigt werden, die durch eine Interaktion von PMP22 mit dem Kalziumsensorprotein STIM1 (*stromal interaction molecule 1*) im ER bedingt sein könnte (Vanoye et al. 2019). Die Zusammenschau der beschriebenen Beobachtungen legt nahe, dass *Pmp22*-Mutationen über verschiedene Mechanismen zu erhöhten intrazellulären Kalziumkonzentrationen führen, die wiederum für die CMT-Pathophysiologie relevant erscheinen.

1.2.3.4 PMP22 und die von Myelinproteinen abhängige Myelinarchitektur

PMP22 interagiert mit MPZ (D'Urso et al. 1999; Hasse et al. 2004) und wird räumlich sowie zeitlich mit MPZ co-exprimiert (Hagedorn et al. 1999; Notterpek et al. 1999). MPZ ist mit 70 – 80% Anteil am Gesamtprotein im Myelin des peripheren Nervens das häufigste Myelinprotein im PNS (Jahn et al. 2009; Patzig et al. 2011; Siems et al. 2020). Es ist über transhomophile Interaktionen essentiell für die Kompaktierung des Myelins in den Internodien (Filbin et al. 1990; Giese et al. 1992) und gilt dort als das wichtigste Adhäsionsprotein (Shapiro et al. 1996; Carenini et al. 1999; Arroyo und Scherer 2000; Shy 2006). Eine veränderte Gendosis oder fehlerhafte Faltung von PMP22 könnte daher über die Interaktion mit MPZ die Myelinstöchiometrie sowie -struktur stören. Weiterhin konnte eine essentielle Rolle von PMP22 zur *In-vitro*-Bildung myelinartiger Strukturen, die als MLAs (*myelin like assemblies*) bezeichnet wurden, gezeigt werden (Mittendorf et al. 2017). Diese MLAs ähneln in ihrer Struktur und Form dem kompakten Myelin des peripheren Nervens (Mittendorf et al. 2017). Hierfür essentiell scheinen sowohl die EC1, die wahrscheinlich transhomophile Interaktionen von PMP22 im kompakten Myelin ermöglicht, als auch die EC2 zu sein, von der man ausgeht, dass sie den Interaktionsort von PMP22 mit MPZ darstellt (Hasse et al. 2004; Mittendorf et al. 2017). Diese Beobachtung unterstreicht einerseits die Bedeutung von PMP22 für die korrekte Ausbildung und den Erhalt der Myelinarchitektur und könnte andererseits auf eine Adhäsionsmolekülfunktion

von PMP22 hinweisen (Mittendorf et al. 2017). Die Abbildung 1.2 stellt die genannten möglichen intermolekularen Interaktionen von MPZ und PMP22 im Myelin schematisch dar.

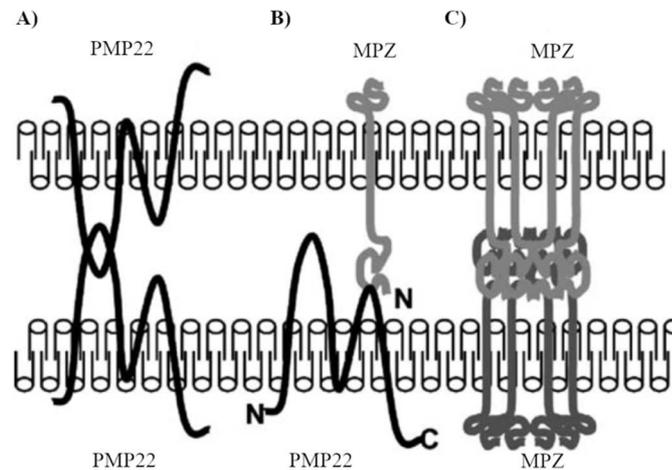


Abbildung 1.2: **Mögliche Interaktionsformen von PMP22 und MPZ im Myelin:** (A) transhomophile Interaktion von PMP22. (B) transheterophile Interaktion von MPZ und PMP22. (C) transhomophile Interaktion von MPZ. N: N-Terminus des Proteins; C: C-Terminus des Proteins (Hasse et al. 2004). Die Verwendung der Abbildung erfolgt mit freundlicher Genehmigung von Elsevier.

Die Rolle von PMP22 als Adhäsionsprotein und die damit verbundene Funktion als integraler Bestandteil von funktionierenden Zell-Zell-Kontakten bzw. Zell-Matrix-Kontakten war Gegenstand zahlreicher Publikationen, die ebenfalls auf die Funktion von PMP22 als strukturgebendes und -erhaltendes Protein der intakten Myelinschicht bzw. der korrekten strukturellen Interaktion zwischen Axon und Schwann-Zelle hindeuten (Sahenk et al. 1999; Notterpek et al. 2001; Roux et al. 2004; Roux et al. 2005; Amici et al. 2006; Zoltewicz et al. 2012; Kinter et al. 2013). Es wurde zudem bei fehlerhafter Gendosis von PMP22 in heterozygot *Pmp22*-defizienten Mäusen eine erhöhte Permeabilität der Myelinschicht in peripheren Nerven gezeigt (Guo et al. 2014; Hu et al. 2016). Als mögliche Pathogenese wurden hier gestörte Interaktionen von PMP22 mit MAG (*myelin-associated-glycoprotein*) und JAM-C (*junctional adhesion molecule C*) sowie eine erhöhte Aktivität der PAK (*p21-activated kinase*) mit konsekutiver dysfunktionaler Polymerisation von F(filamentöses)-Aktin diskutiert (Guo et al. 2014; Hu et al. 2016). MAG und JAM-C sind Proteine, die *Tight*- und Adhärenz-Kontakte sowie transmembrane Adhärenzen regulieren. In PMP22-überexprimierenden Nerven wurde die Myelinpermeabilität bisher jedoch noch nicht untersucht.

1.2.3.5 PMP22 und die Aktin-vermittelten Funktionen der Schwann-Zelle

In PMP22-defizienten Schwann-Zellkulturen findet man gestörte Mechanismen der Zellformgebung und Zellmigration (Lee et al. 2014), für die das Zytoskelett-Protein Aktin essentiell ist (Jessen und Mirsky 2005). Die F-Aktin-Polymerisation zeigt sich auch in Tiermodellen mit *Pmp22*-Punktmutation gestört (Kun et al. 2012). Aktin ist weiterhin für die richtige Ausbildung der Ultrastruktur von kompaktem Myelin wichtig (Court et al. 2009). Diese Beobachtungen lassen eine funktionelle Verbindung von Aktin und PMP22 vermuten. Zudem ist Aktin am Einbau von Cholesterol in die *lipid rafts* des Myelins beteiligt; für diesen Cholesterol-Einbau ist PMP22 auf noch unverstandene Weise essentiell (Lee et al. 2014). Das legt die Vermutung nahe, dass bei fehlerhafter PMP22-Genodis die Myelinstöchiometrie nicht nur hinsichtlich der Proteinanteile (siehe Kapitel 1.2.3.4) fehlerhaft ist, sondern auch bezüglich der Membranlipide wie Cholesterol gestört sein könnte.

1.2.3.6 PMP22 und der Lipidstoffwechsel der Schwann-Zelle sowie deren Implikationen für die von Lipiden abhängige Myelinarchitektur

Cholesterol ist ein essentieller Bestandteil vom Myelin und das Ausschalten der Cholesterolbiosynthese in der Schwann-Zelle verhindert eine normale Myelinbildung (Saher et al. 2009). Es scheint dabei u. a. den Transport von MPZ aus dem ER ins kompakte Myelin zu regulieren (Saher et al. 2009). In PMP22-überexprimierenden Tiermodellen wurde eine Expressionsreduktion mehrerer Gene des Lipid- und Cholesterolstoffwechsels gezeigt (Giambonini-Brugnoli et al. 2005; Vigo et al. 2005; Fledrich et al. 2012; Fledrich et al. 2018). Diese verringerte Expression von Cholesterol- und Lipidstoffwechselgenen bzw. eine verringerte Cholesterolbiosynthese führt in Schwann-Zell- bzw. Schwann-Zell-DRG(*dorsal root ganglia*)-Co-Kulturen zur Demyelinisierung von Axonen (Berciano et al. 1998; Fledrich et al. 2018). Es scheint daher ein Zusammenhang zwischen der PMP22-Überexpression und dem gestörten Lipidstoffwechsel der Schwann-Zelle zu bestehen, der zum fehlerhaften Aufbau des Myelins und so zum neuropathischen Phänotyp führt (Fledrich et al. 2018). PMP22 scheint sogar direkt an der Regulation des Lipidstoffwechsels sowie des Cholesteroltransports von Schwann-Zellen (über Interaktion mit ABCA1(*ATP-binding cassette transporter ABCA1*)) beteiligt zu sein (Zhou et al. 2019).

1.2.3.7 PMP22 und der interzelluläre Energiestoffwechsel zwischen Axon und Schwann-Zelle

Neben dem Lipidstoffwechsel könnte auch der Energiemetabolismus der Schwann-Zelle infolge einer veränderten Gendosis von PMP22 gestört sein. So scheint die Axon-Glia-Interaktion bei *Pmp22*-Mutationsträgern nicht nur strukturell (wie durch gestörte MAG-vermittelte Adhäsion) (Sahenk et al. 1999; Kinter et al. 2013), sondern auch funktionell hinsichtlich des interzellulären Stoffaustauschs fehlerhaft zu sein. In distalen Nervenfasern von CMT1A-Patienten wurde eine erhöhte Akkumulation von Mitochondrien beobachtet (Saporta et al. 2009) sowie eine Korrelation von dysregulierter Expression der Glutathion-S-Transferase und den neuropathischen Symptomen der CMT1A-Patienten gezeigt (Fledrich et al. 2012).

1.2.3.8 PMP22 und die Schwann-Zelldifferenzierung

Eine weitere Pathophysiologie-Theorie basiert auf der Annahme, eine veränderte Gendosis von PMP22 führe zu einer gestörten Schwann-Zellentwicklung und einer dadurch bedingten Dysmyelinisierung (Fledrich et al. 2014). Hiernach gebe es ein kritisches Zeitfenster, währenddessen die richtige Gendosis von PMP22 essentiell dafür sei, die Myelinisierung von Axonen durch die Schwann-Zelle gemeinsam mit der korrekten Schwann-Zelldifferenzierung zu programmieren (Fledrich et al. 2014). So führt der komplette Verlust des *Pmp22*-Gens bei Mäusen zum verzögerten Myelinisierungsbeginn und schwerer segmentaler Demyelinisierung mit axonalem Verlust, während ein einzelnes *Pmp22*-Allel für die Initiierung der Myelinisierung zwar ausreicht, aber zur Ausbildung instabilen Myelins führt (Adlkofer et al. 1995; Adlkofer et al. 1997). Die 1,5-fache Gendosis von PMP22 verändert den Beginn der Myelinisierung nicht, führt aber zu Dysmyelinisierung, Hypermyelinisierung sowie segmentaler Demyelinisierung und ebenfalls zu späterem axonalem Verlust (Li et al. 2013). Diejenigen Axone, die in der Hochphase der Myelinisierung durch die erhöhte Gendosis von PMP22 fälschlicherweise nicht myelinisiert wurden, könnten im Sinne eines persistierenden Schwann-Zellentwicklungsdefekts später zugrunde gehen (Fledrich et al. 2014; Fledrich et al. 2018). Dem Entwicklungsdefekt der Schwann-Zellen infolge der veränderten PMP22-Gendosis liegt eine Dysbalance zwischen dem PI3K/AKT/mTOR (*phosphatidylinositole-3-kinase/v-Akt murine thymoma viral oncogene homolog-1/mammalian target of rapamycin*)-Signalweg und dem Ras/MEK/ERK (*rat sarcoma/mitogen-activated protein kinase kinase/extracellular signal regulated kinase*)-Signalweg (kurz MEK/ERK-

Signalweg) zugrunde (Fledrich et al. 2014). Aktiviertes AKT (phosphoryliert an den Serinen 308 und 478) gilt sowohl im ZNS als auch im PNS als Regulator der Myelindicke und des axonalen *Wrappings* (Flores et al. 2008; Domènech-Estévez et al. 2016). Dauerhaft aktiviertes AKT führt so zur Hypermyelinisierung myelinisierter Axone und zur Bildung von konzentrischen Schwann-Zellmembranen um nicht-myelinisierte Nervenfasern (Domènech-Estévez et al. 2016). Eine Funktion als hinreichender Initiator der Myelinisierung im PNS wurde jedoch nicht beobachtet (Domènech-Estévez et al. 2016). Der MEK/ERK-Signalweg gilt als Vermittler der Schwann-Zelldifferenzierung im Rahmen von Waller'scher Degeneration nach Nervenverletzungen (Napoli et al. 2012) und als molekulares Korrelat der Ausbildung von Zwiebelschalenformationen infolge einer pathologisch erhöhten glialen NRG-1-Expression bei hereditären Neuropathien wie der CMT1A (Fledrich et al. 2019). In Ischias-Nerven von CMT1A-Ratten wurde eine deutliche Reduktion von aktiviertem AKT sowie eine vermutlich vom glialen NRG-1 unabhängige zusätzliche Erhöhung von ERK nachgewiesen bzw. diskutiert (Fledrich et al. 2014; Fledrich et al. 2019). Die Abbildung 1.3 zeigt ein Arbeitsmodell für die Rolle von PMP22 als Regulator der genannten Signalkaskaden.

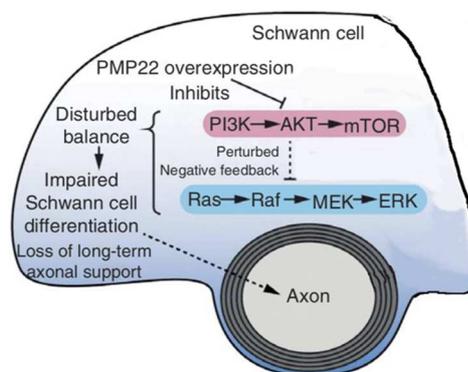


Abbildung 1.3: **Arbeitsmodell für die Rolle von PMP22 als Regulator der PI3K/AKT/mTOR- und Ras/MEK/ERK-Signalkaskade:** Durch verringerte PI3K/AKT/mTOR-Aktivität bei PMP22-Überexpression kommt es zu gestörten Negativ-Feedback-Mechanismen im Ras/MEK/ERK-Signalweg, die Dysbalance (*disturbed balance*) in der Aktivität der beiden Signalwege führt zu einer gestörten Schwann-Zelldifferenzierung (*impaired Schwann cell differentiation*) und somit zu einem langfristigen axonalen Verlust (*loss of long-term axonal support*) (Fledrich et al. 2014). Die Verwendung der Abbildung erfolgt mit freundlicher Genehmigung von Springer Nature.

In Zusammenschau deuten diese Beobachtungen auf eine von der PMP22-Genetose abhängige Aktivierung der gegenläufigen Signalkaskaden hin. Wie genau PMP22 diese Signalwege beeinflussen könnte, ist jedoch offen. Denkbar wären Interaktionen mit

Proteinen, welche die genannten Proteinkaskaden beeinflussen wie PTEN (*phosphatase and tensin homolog*), DLG1 (*disks large homolog 1*), PDK1 (*3-Phosphoinositide-dependent protein kinase*) oder 14-3-3-Proteine. Die Abbildung 1.4 zeigt eine vereinfachte Zusammenfassung der für diese Arbeit relevanten molekularen und zellulären Krankheitsmechanismen der mit *PMP22*-Mutationen assoziierten Neuropathien. Sie verdeutlicht außerdem, an welcher Stelle die Identifizierung von Interaktionspartnern von *PMP22* dem Verständnis der Pathophysiologie dienen würde.

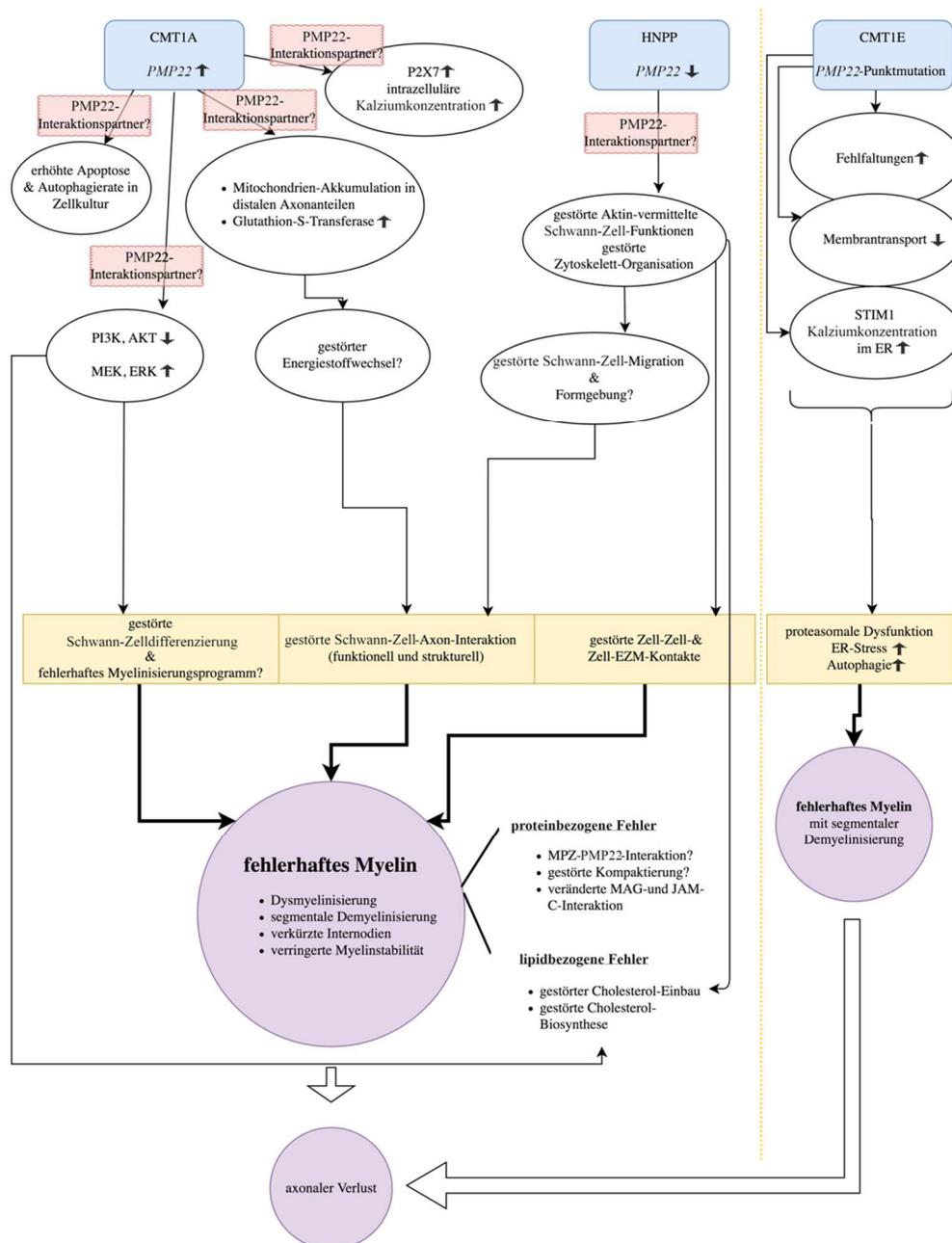


Abbildung 1.4: **Zelluläre und molekulare Krankheitsmechanismen der mit *PMP22*-Mutationen assoziierten Neuropathien:** CMT1A, HNPP und CMT1E (blau hinterlegt). Die möglichen Protein-Interaktionspartner von *PMP22* (rot hinterlegte Rechtecke) führen über die genannten zellulären und

molekularen Fehlfunktionen (weiß hinterlegte Ovale) zu den Pathophysiologie-Grundtheorien (gelb hinterlegte Rechtecke). Es kommt zur Bildung fehlerhaften Myelins mit unterschiedlichen Folgen (Demyelinisierung, Dysmyelinisierung, verkürzte Internodien, verringerte Myelinstabilität, segmentale Demyelinisierung bei CMT1E), was wiederum zum axonalen Verlust führt (dickere, weiße Pfeile). Die Charakteristika des fehlerhaften Myelins unterscheiden sich hinsichtlich proteinbezogener und lipidbezogener Fehler. Die schwarzen Pfeile zeigen Konsequenzen der Fehlfunktionen an. Die gelb gestrichelte Linie verdeutlicht die unterschiedlichen Pathophysiologie-Mechanismen der vermutlich gendosisbedingten CMT1A und HNPP im Gegensatz zur durch Punktmutationen bedingten CMT1E.

1.3 Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen

Die Identifizierung von Protein-Protein-Interaktionen ist ein wichtiges Instrument, um die biologischen Funktionen von Proteinen und Proteinkomplexen zu verstehen. Um diese Protein-Protein-Interaktionen zu analysieren, stehen verschiedene methodische Ansätze zur Verfügung (Ngounou Wetie et al. 2013). So können sie beispielsweise mithilfe von binären Methoden wie Hefe-Zwei-Hybrid-Systemen (Fields und Sternglanz 1994; Suter et al. 2008; Williamson und Sutcliffe 2010) und *Split*-Ubiquitin-Systemen (Johnsson und Varshavsky 1994) oder mit fluoreszenzbasierten (Zal 2008) oder Protein-Chip-Techniken (Spisák und Guttman 2009) untersucht werden (Ramisetty und Washburn 2011). Um komplexe Interaktionssysteme von Proteinen, sog. Protein-Interaktome oder Protein-Komplexe, zu untersuchen, existieren weitere Methoden, die oft auf der affinitätsbasierten Anreicherung der Zielproteine mit anschließender massenspektrometrischer Identifizierung der Bestandteile dieser Protein-Komplexe basieren (Aebersold und Mann 2003; Ramisetty und Washburn 2011; Turriziani et al. 2016). Je nach Fragestellung und Quelle des Zielproteins muss die passende Methode zur Untersuchung der Protein-Protein-Interaktionen ausgewählt werden. Ein Vorteil der affinitätsbasierten Methoden gegenüber beispielsweise den Hefe-Zwei-Hybrid-Systemen besteht darin, dass das Zielprotein aus seiner natürlichen Umgebung herausgelöst und idealerweise mit seinen posttranslationalen Modifikationen bzw. Splicing-Varianten und Interaktionspartnern erfasst wird, die in einem Hefesystem nicht nachzuahmen sind (Aebersold und Mann 2003). Die Massenspektrometrie (MS) ermöglicht im Anschluss die Identifizierung sogar mehrerer Protein-Interaktionspartner.

1.3.1 Co-Immunopräzipitation und Massenspektrometrie

Die am häufigsten eingesetzte Methode aus der Gruppe der affinitätsbasierten Proteinanreicherungen zur Identifizierung von Protein-Protein-Interaktionspartnern ist die Co-Immunopräzipitation (Co-IP) (Yang et al. 2008; Ning et al. 2014). Die Immunopräzipitation (IP) wird (neben ihrem Einsatz zur Anreicherung von Nucleinsäuren) als Mittel zur Untersuchung von differenzierter Expression, Molekulargewicht und posttranslationaler Modifikation von Proteinen sowie zur Identifikation von Protein-Protein-Interaktionen genutzt (Kaboord und Perr 2008). Bei der IP wird ein Zielprotein mithilfe eines gegen dieses Protein gerichteten Antikörpers aus einer beliebigen Proteinquelle wie beispielsweise einem Gewebehomogenisat oder Zellysat gebunden (Kaboord und Perr 2008; Bonifacino et al. 2016). Um den Antikörper samt Antigen aus der Proteinquelle zu präzipitieren, werden *Beads* verwendet, die mit ihrer Protein-A- oder Protein-G-Beschichtung spezifisch an das Fc-Fragment des Antikörpers binden (Bonifacino et al. 2016). Protein A ist ein Bestandteil aus der Bakterienwand von *Staphylococcus aureus*, während Protein G aus der Zellwand von Streptokokken stammt. Zusammen mit dem Zielprotein werden in der Regel weitere Proteine co-präzipitiert. Man spricht daher von Co-IP. Das Ergebnis der IP kann dann auf unterschiedliche Arten analysiert werden. Beispielsweise kann eine Gelelektrophorese erfolgen, um die im Eluat enthaltenen Proteine anhand ihrer Masse aufzutrennen. Der Immunoblot ermöglicht anschließend den Nachweis bereits bekannter einzelner Proteine (Kaboord und Perr 2008). Alternativ kann der Co-IP eine MS folgen, die sich besonders eignet, um unbekannt potentielle Interaktionspartner des Zielproteins zu identifizieren (Gridley et al. 2005; Kaboord und Perr 2008).

Die MS wurde von John B. Fenn und Koichi Tanaka in den 1980ern erstmals beschrieben und ihre Entwicklung 2002 mit dem Nobelpreis für Chemie honoriert. Sie wird zur Analyse von neuen Proteinen, posttranslationalen Proteinmodifikationen, Protein-Strukturen (insbesondere größerer Proteinkomplexe), dynamischen Veränderungen von Proteinkomplexen und Protein-Protein-Interaktionen genutzt (Aebersold und Mann 2003). Bei der MS macht man sich die Möglichkeit der Ionisation von Atomen bzw. Molekülen sowie deren Ablenkung in einem Magnetfeld zunutze, um auf die (durch die Ionisation quasi unveränderte) zugehörige Masse des Atoms bzw. Moleküls zu schließen. Das Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z) von Peptidfragmenten, die durch die Ionisationsquelle des Massenspektrometers generiert werden, wird bestimmt und über den Vergleich

mit Datenbanken einem (oder mehreren) Peptid(en) und schließlich Proteinen zugeordnet (Aebersold und Mann 2003; Köcher und Superti-Furga 2007).

1.3.2 Immunopräzipitation von Membranproteinen und dabei bekannte Schwierigkeiten

Die IP (mit anschließender MS) als Mittel zur Untersuchung von Interaktionspartnern von Membranproteinen stellt eine besondere Herausforderung dar (Ngounou Wetie et al. 2013). Im Vergleich zu den löslichen Proteinen des Zytosols ist die für die IP notwendige Anreicherung der oft sehr hydrophoben Membranproteine komplizierter (Seddon et al. 2004). Hierbei spielen neben der Hydrophobie die meist geringe Menge der Membranproteine, die Menge und Struktur der Lipide in der Membran, die Präparation der Membran sowie der Ursprung der Membran eine Rolle (Palsdottir und Hunte 2004; Seddon et al. 2004; Ngounou Wetie et al. 2013; Duquesne et al. 2016). Allen übrigen Problemen voran steht allerdings der notwendige Einsatz von Detergenzien, welche die Struktur und/oder die Funktion des Proteins und damit sowohl Interaktionen mit anderen Proteinen als auch die mit dem spezifischen für die IP eingesetzten Antikörper (zer)stören können (le Maire et al. 2000; Privé 2007; Yang et al. 2014; Lee et al. 2018). Detergenzien sind Moleküle, die aus einer hydrophoben Kohlen-Wasserstoff-Kette und einer – je nach Detergenz – unterschiedlich aufgebauten polaren Kopfgruppe bestehen, anhand derer man sie in unterschiedliche Klassen einteilen und nicht-ionische, anionische, kationische sowie zwitterionische Detergenzien unterscheiden kann (Seddon et al. 2004; Linke 2009). Sie dienen in erster Line dazu, hydrophobe Moleküle wie Membranproteine in wässrige Lösungen zu bringen, da sie eine molekulare Brücke zwischen hydrophiler Lösung und hydrophobem Protein ausbilden. Strukturell wird diese Brücke durch die Bildung von sphärischen Aggregaten, den Mizellen, ermöglicht (Linke 2009). Neben Mizellen werden ringförmige oder lamellare Membraneinzelschichten aus Detergenzien und Membranbestandteilen gebildet (le Maire et al. 2000). Diese Eigenschaften der Detergenzien stellen die Grundlage für die Solubilisierung von Membranen dar, indem Membranbestandteile in die Mizelle bzw. die ringförmige oder lamellare Einzelschicht aufgenommen werden, wie es in Abbildung 1.5 schematisch dargestellt ist. Daher müssen neben der Membrangewinnung und -präparation alle Parameter, die diese Mizellenbildung beeinflussen, bei dem Versuch, Membranen und ihre Bestandteile zu solubilisieren, ausreichend beachtet und ggf. in unterschiedlicher Ausführung empirisch miteinander verglichen werden. Eine inkomplette Solubilisierung oder auch der Einsatz von zu viel Detergenz kann die

Ergebnisse der späteren Analyse von Eigenschaften der Membranbestandteile (z.B. im Hinblick auf Protein-Protein-Interaktionen) verfälschen (Lichtenberg et al. 2013; Duquesne et al. 2016).

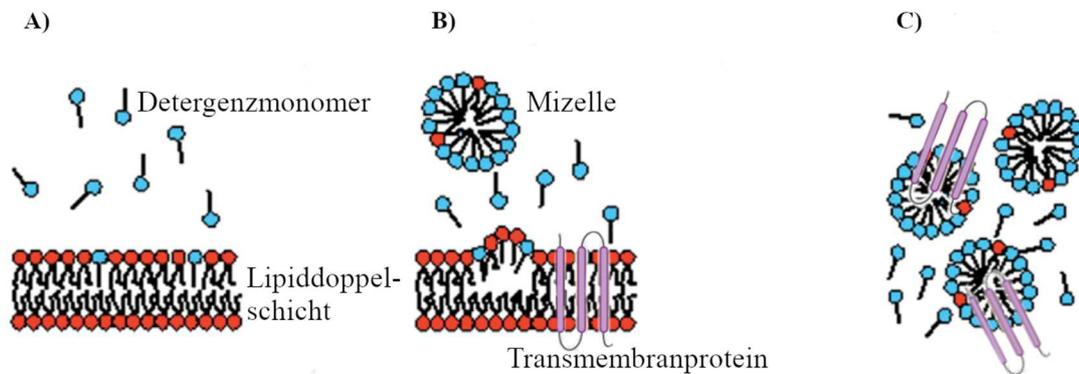


Abbildung 1.5: Vereinfachte Darstellung der stadienhaften Solubilisierung von Lipid-Doppelschichten von Biomembranen: (A) Zunächst liegen neben der Lipid-Doppelschicht (rot) nur Detergenz-Monomere (blau) vor, die sich mit steigender Konzentration zu Mizellen zusammenlagern. (B) Je nach Konzentration, Temperatur, Zeit und pH-Wert beginnen die Detergenzien Mizellen zu bilden und einzelne Lipide der Lipiddoppelschicht zu integrieren. In lila ist ein Transmembranprotein beispielhaft dargestellt. (C) Vollständige Solubilisierung der Membran und der Transmembranproteine liegt vor, wenn alle Bestandteile in die Detergenz-Mizellen aufgenommen wurden (Lichtenberg et al. 2013, Foobar 2006¹). Die Verwendung der Abbildungen erfolgt mit freundlicher Genehmigung von Elsevier bzw. über die Regelung der Creative-Commons-Lizenz CC BY-SA 3.0. Die Abbildungen wurden durch die Kombination beider modifiziert.

Die Frage nach dem richtigen Detergenz lässt sich nicht pauschal beantworten, sodass es zu Beginn eines Membransolubilisierungsvorhabens sinnvoll ist, mehrere Detergenzien miteinander zu vergleichen und hierbei möglichst zumindest einen Vertreter aus den verschiedenen Detergenzgruppen einzuschließen (Duquesne et al. 2016). Die Parameter der Membransolubilisierung (wie Temperatur, Zeit und Detergenzkonzentration), die geringen Protein-Ausgangsmengen sowie die IP-immanenten Limitationen (wie eine ausreichende Affinität des Antikörpers) beeinflussen das Ergebnis einer IP von Membranproteinen, sodass diese Methode ein sehr fehleranfälliges biochemisches Experiment darstellt. Dennoch kann eine Vielzahl von Arbeiten belegen, dass Membranprotein-IPs erfolgreich durchführbar und zur Identifizierung von Membranprotein-Protein-Interaktionen geeignet sind (D'Urso et al. 1999; Amici et al. 2006; Puts et al. 2010; Bavassano et al. 2013; Guo et al. 2014; Fowler et al. 2016; Lee et

¹ ursprünglicher Name der Abbildung: *Schematic representation of the different types of interaction between polytopic membrane proteins and the cell membrane*, erstmals publiziert am 29.06.2006 unter CC BY-SA 3.0 URL: <https://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0/deed.en>; [URL abgerufen am 20.11.2020].

al. 2018; Zhou et al. 2019). Auch Myelinproteine wie das Zielprotein dieser Arbeit, PMP22, wurden bereits mit verschiedenen IP-Protokollen aus Nerven-Homogenisaten bzw. Zellkulturen angereichert (D'Urso et al. 1999; McLaughlin et al. 2002; Amici et al. 2006; Bello-Morales et al. 2011; Guo et al. 2014). Zur Solubilisierung von PMP22 wurde hierbei – im Einklang mit den Ergebnissen von Sedzik et al. (1998), Sedzik und Tsukihara (2000) sowie Sedzik et al. (2002) – meist SDS (Natriumdodecylsulfat) oder ein anderes denaturierendes Detergenz aus der gleichen Gruppe verwendet (D'Urso et al. 1999; Amici et al. 2006; Guo et al. 2014; Poitelon et al. 2018). Der Einsatz von SDS zu diesem Zweck ist aufgrund seiner denaturierenden Eigenschaften umstritten (Sedzik et al. 2002). Das Herauslösen der Membranproteine wie PMP22 aus ihrer natürlichen Umgebung, gerade unter den durch SDS geschaffenen denaturierenden Bedingungen, trägt zur hohen Prävalenz falsch-positiver Ergebnisse bei der Suche nach Interaktionspartnern von Membranproteinen bei (Poitelon et al. 2018). Ursächlich hierfür sind wahrscheinlich die Kombination aus Lyse der Zelle und Solubilisierung der Membranbestandteile und damit verbundene Phänomene wie Mizellenbildung, Reorganisation von Vesikeln, hydrophobe Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Proteinen sowie Fehlfaltungen nach Exposition mit dem denaturierenden Agens. So wurde die mittels Co-IP postulierte direkte Interaktion von PMP22 und $\alpha 6\beta 4$ -Integrin (Amici et al. 2006) durch Co-Lokalisationsexperimente widerlegt und die bei der Aufbereitung des Ausgangsmaterials entstehenden Artefakte als ursächlich für diese Fehlannahme einer direkten Protein-Protein-Interaktion diskutiert (Poitelon et al. 2018). Andere Detergenzien allein zeigten jedoch bisher unzureichende Wirksamkeit zur Solubilisierung von PMP22 (Sedzik und Tsukihara 2000).

Bei der Planung eines IP-Experiments für die Ermittlung von Protein-Protein-Interaktionen von Membranproteinen wie PMP22 ergibt sich daher eine Schwierigkeit, die hier als Detergenz-Dilemma bezeichnet wird. Das Detergenz-Dilemma beschreibt die Notwendigkeit, große Mengen des Zielproteins (mithilfe womöglich denaturierender Detergenzien) aus der Membran herauszulösen, um es affinitätsbasiert anreichern zu können, während gleichzeitig ein möglichst nativer biologischer Zustand der Membran zur Identifizierung von Protein-Protein-Interaktionspartnern bewahrt werden soll. Diese beiden Voraussetzungen eines gelungenen IP-Experiments von Membranproteinen widersprechen sich jedoch methodisch.

1.3.3 Proteinquervernetzung

Bei der Proteinquervernetzung werden bestimmte Proteinanteile, die sich in räumlicher Nähe zueinander befinden, intra- und/oder intermolekular kovalent miteinander verbunden. Die Anwendung der Proteinquervernetzung ist alltäglich in der proteomischen Forschung (Sinz 2010; Rappsilber 2011) und es existieren viele verschiedene Proteinquervernetzungsreagenzien. Letztere sind Moleküle, die in der Regel aus zwei reaktiven Gruppen und einem dazwischenliegenden Abstandshalter bestehen (Sinz 2006; Rappsilber 2011). Auf beiden Seiten können so kovalente Proteinverbindungen aufgebaut werden, die als stabile Proteinbrücke zwischen benachbarten Proteinen oder Proteinanteilen desselben Proteins fungieren. Die reaktiven Gruppen der Proteinquervernetzungsreagenzien reagieren in Abhängigkeit ihrer eigenen Struktur mit verschiedenen funktionellen Gruppen von Proteinen. Die Gruppe der Amin-reaktiven Proteinquervernetzern und unter diesen die NHS-Ester (N-hydroxysuccinimid-Ester-Verbindungen) sind die am weitesten verbreiteten Proteinquervernetzungsreagenzien (Sinz 2006; Chavez und Bruce 2019). Die NHS-Ester gehen Peptidbindungen mit primären bzw. sekundären Aminen ein, wie sie am N-Terminus oder in Lysin-Seitenketten von Proteinen vorkommen (Sinz 2006; Sinz 2007; Rappsilber 2011). Strukturell werden homobifunktionale, heterobifunktionale, *zero-length*-Proteinquervernetzer und trifunktionale Proteinquervernetzer unterschieden. Die meisten gängigen Proteinquervernetzungsreagenzien sind homobifunktional, da sie an beiden Seiten die gleiche reaktive Gruppe tragen (Sinz 2006; Chavez und Bruce 2019). Weiterhin variiert – je nach Proteinquervernetzer – die Länge des Abstandshalters zwischen den beiden reaktiven Gruppen, welche über den Abstand entscheidet, der zwischen zwei Proteinen bzw. Proteinanteilen liegen kann, um miteinander quervernetzt werden zu können (Rappsilber 2011). Lange Abstandshalter, wie beispielsweise bei BS3 (Bissulfosuccinimidylsuberat), sind zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen sinnvoll (O'Reilly und Rappsilber 2018). Je nach Fragestellung sind unterschiedliche Proteinquervernetzer geeignet. Die Effektivität der Proteinquervernetzung ist dabei abhängig von der Struktur und der Membrangängigkeit des Proteinquervernetzers, von der Struktur der interagierenden Proteine sowie von der Zugänglichkeit der Amine der Zielproteine (Ramisetty und Washburn 2011; Chavez und Bruce 2019). Die Proteinquervernetzung muss daher für jedes experimentelle Vorhaben mithilfe des Vergleichs verschiedener Konditionen z.B. hinsichtlich der Menge an Proteinquervernetzern etabliert werden (Sinz 2006; Rappsilber 2011).

Das Hinzufügen eines Proteinquervernetzungsschritts stellt aus verschiedenen Gründen ein vielversprechendes Instrument zur Identifizierung von Protein-Protein-Interaktionen mittels IP und anschließender MS dar, da die Proteinquervernetzung mehreren der genannten Schwierigkeiten dieser Methoden vorbeugen kann (Meyer und Selbach 2015). So löst sie zum einen das oben beschriebene Detergenz-Dilemma, indem die Protein-Protein-Interaktionen vor der Membransolubilisierung mittels Proteinquervernetzung „eingefroren“ werden. Das erlaubt den anschließenden Einsatz stringenter Aufreinigungsmethoden wie die Benutzung denaturierender Detergenzien, da die Protein-Protein-Interaktionen durch kovalente Proteinbindungen trotzdem erhalten bleiben (Tardiff et al. 2007; Puts et al. 2010; Fang et al. 2012). Außerdem werden mithilfe von Proteinquervernetzung auch transiente und schwache Protein-Protein-Interaktionen bewahrt, die durch die Anwendung konventioneller IP-MS-Methoden nicht zu detektieren wären (Vasilescu et al. 2004; Guerrero et al. 2006; Wang et al. 2019). Die Identifizierung von falsch-positiven Ergebnissen kann weiterhin verringert werden, indem bei der Analyse der MS-Daten nur Peptide berücksichtigt werden, die durch ein Proteinquervernetzungsmolekül tatsächlich miteinander verbunden sind (Chavez et al. 2015; Liu et al. 2015; Tran et al. 2016; Schweppe et al. 2017). Die Anwendung der speziellen Kombination aus Proteinquervernetzung, Co-IP und MS zur Identifizierung von Protein-Protein-Interaktionen hat sich so bereits in anderen Arbeiten bewährt (Makowski et al. 2016; Raasakka et al. 2019; Wang et al. 2019).

1.4 Aufgabenstellung dieser Arbeit

Um der Entschlüsselung der biologischen Funktion von PMP22 näherzukommen und somit neue therapeutische Ansatzpunkte zur Behandlung der mit *PMP22*-Mutationen assoziierten peripheren Neuropathien, insbesondere der darunter häufigsten CMT1A, zu ermitteln, soll in dieser Arbeit eine Methode zur Identifizierung von *In-vivo*-Protein-Interaktionspartnern von PMP22 etabliert werden. Als Ausgangsmaterial soll auf den größten peripheren Nerven, den *N. ischiadicus*, von Wildtyp-Ratten zurückgegriffen werden, da einerseits für diese Tiere auch ein Tiermodell der CMT1A-Erkrankung existiert (Sereda et al. 1996) und andererseits so eine möglichst große Menge an PMP22 für das Vorhaben zur Verfügung steht. Methodisch soll das Verfahren der Co-IP mit anschließender MS angewendet werden. Um den Einsatz denaturierender Detergenzien zur Solubilisierung zu ermöglichen und um transiente sowie schwache Interaktionen von

PMP22 zu bewahren, soll die IP-MS mit einem vorherigen Proteinquervernetzungsschritt analog zu den Arbeiten von Subbotin und Chait (2014) und Wang et al. (2019) verknüpft werden. Hierfür soll zunächst die Proteinquervernetzung für PMP22 im Ratten-Ischias-Nerven-Homogenisat unter Verwendung von BS3 (ein aminreaktives, weit verbreitetes Reagenz mit recht langem Abstandshalter) und Glutaraldehyd (aufgrund seiner reaktiven Eigenschaften) etabliert werden. Es soll weiterhin die Solubilisierung der im Ratten-Ischias-Nerven-Homogenisat enthaltenen PMP22-Moleküle mit und ohne vorherigen Proteinquervernetzungsschritt etabliert werden. Hierfür sind verschiedene Detergenzien und deren notwendige Mengen zu vergleichen. Hinsichtlich der IP-MS und deren Auswertung soll zwischen proteinquervernetzten und nicht-proteinquervernetzten Proben unterschieden werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Tabelle 2.1: Verbrauchsmaterialien

Aluminiumfolie	Melitta, Minden, DE
Einmalhandschuhe	Hartmann, Heidenheim, DE
Eppendorf-Gefäße	Eppendorf, Hamburg, DE
Röhrchen, konisch 15 ml	Cellstar, NY, USA
Röhrchen, konisch 50 ml	Corning, NY, USA
Filterpapier 3 mm	Whatman, GE Healthcare Life Science, Freiburg, DE
Gradientengele Mini-PROTEAN TGX 4 – 20%	BioRad, Hercules, CA, USA
Kosmetiktücher	Wepa Professional, Arnsberg, DE
Laborlöffel	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Mikrospatel-Löffel	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
pH-Wert-Teststreifen	Merck, Darmstadt, DE
Pipettenspitzen D1000, D200, D100, D20, D10	Diamond Gilson, Middleton, WI, USA
Pipettenspitzen gestopft, 1000 µl, 200 µl, 100 µl, 20 µl, 10 µl	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Präparationsbesteck	Fine Science Tools, Heidelberg, DE
PVDF(Polyvinylidenfluorid)-Membran	Amersham Hybond, GE Healthcare Life Science, Freiburg, DE
sterile Spatel	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Stickstoff, flüssig	Messer-Griesheim, Krefeld, DE
Trockeneis	Messer-Griesheim, Krefeld, DE
Zellkulturschalen	Corning, NY, USA
Zentrifugenröhrchen	Beckmann Coulter GmbH, Krefeld, DE

Tabelle 2.2: **Chemikalien**

Acrylamid	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, DE
Ammoniumperoxiddisulfat (APS)	Merck, Darmstadt, DE
Ammoniumsulfat	Merck Darmstadt, DE
β -Mercaptoethanol (EtSH)	Merck, Darmstadt, DE
Bromophenolblau	Serva, Heidelberg, DE
Bissulfosuccinimidylsuberat (BS3) <i>No Weigh Format Number 21585</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Coomassie Brilliant Blue G250	Biomol, Hamburg, DE
Cholamidopropyl-dimethylammoniumpropan-sulfonat (CHAPS)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Dodecyl- β -D-maltosid (DDM)	Roth, Karlsruhe, DE
1,4-Dithiotreitol (DTT)	GibcoBRL, Karlsruhe, DE
Essigsäure, 100%	Merck, Darmstadt, DE
Ethanol (EtOH)	Merck, Darmstadt, DE
FAST Green FCF (<i>for coloring food</i>)	Sigma-Adlrich, Schnelldorf, DE
Glutaraldehyd 25% in wässriger Lösung	Electron-Microscopy-Science, München, D
Glycerin	Merck, Darmstadt, DE
Glyzin	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, DE
Isopropanol	Merck Darmstadt, DE
Instant-Magermilchpulver	Frema, granoVita GmbH, Lüneburg, DE
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt, DE
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt, DE
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck, Darmstadt, DE
Methanol (MeOH)	Avantor, Gliwice, Polen
Dinatriumhydrogenphosphat-2-hydrat (Na ₂ HPO ₄ *H ₂ O)	Merck, Darmstadt, DE
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt, DE

Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Merck, Darmstadt, DE
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt, DE
Ortho-Phosphorsäure 99%	Merck, Darmstadt, DE
Proteinase-Inhibitor-Tabletten Complete	Roche, Grenzach, DE
Salzsäure (HCl)	Serva, Heidelberg, DE
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, DE
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Serva, Heidelberg, DE
Triton X-114	Fluka Analytical, Seelze, DE
Tris(Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)-Base	Sigma-Adlrich, Schnelldorf, DE
Tween20	Merck, Darmstadt, DE

Lösungen und Puffer

Tabelle 2.3: **Zusammensetzungen des Phosphatpuffers PBS** (*phosphate-buffered saline*)

10x Stammlösung 1 L	100 g NaCl
	2,5 g KCl
	7,2 g Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O
	2,3 g KH ₂ PO ₄
	mit aqua bidest. (doppelt destilliertes H ₂ O) auf 1 L auffüllen und pH mit NaOH auf 7,5 einstellen
1x Gebrauchslösung 1 L	100 ml 10x Stammlösung
	mit aqua bidest. auf 1 L auffüllen

Tabelle 2.4: **Zusammensetzung des Tris-Puffers:**

500 mM Tris-Puffer 500 ml	30,29 g Tris-Base (500 mM)
	8,76 g NaCl (300 mM)
	mit aqua bidest. auf 500 ml auffüllen und pH mit HCl auf 7,5 einstellen

Tabelle 2.5: **Zusammensetzung der 10% SDS-Stammlösung**

10% SDS-Stammlösung 300 ml	30 g SDS
	mit aqua bidest. auffüllen auf 300 ml

Tabelle: 2.6: **Zusammensetzungen der Laufpuffer für SDS-PAGE(Natriumdodecylsulfat-Gelelektrophorese)-Gele**

10x Stammlösung Laemmli Laufpuffer 5 L	720 g Glycin (1,92 M)
	151,4 g Tris-Base (250 mM)
	1% SDS (50 g)
	mit aqua bidest. auffüllen auf 5 L
1x Gebrauchslösung 1 L	100 ml Stammlösung 10x
	mit aqua bidest. auffüllen auf 1 L

Tabelle 2.7: **Rezepte für SDS-PAGE-Gele**

Sammelgel (4 Stück)	4 ml 30% Acrylamid
	5 ml 0,5 M Tris pH 6,8
	200 µl 10% SDS
	200 µl 10% APS
	20 µl TEMED
	10,6 ml aqua bidest.
Trenngel mit 14% SDS (4 Stück)	14,93 ml 30% Acrylamid
	8 ml 1,5 M Tris pH 8,8
	320 µl 10% SDS
	320 µl 10% APS
	32 µl TEMED
	8,4 ml aqua bidest.
Trenngel mit 12% SDS (4 Stück)	12,8 ml 30% Acrylamid
	8 ml 1,5 M Tris pH 8,8
	320 µl 10% SDS

	320 µl 10% APS
	32 µl TEMED
	10,5 ml aqua bidest.
	mit aqua bidest. auf 250 ml auffüllen und pH mit HCl auf 8,8 einstellen

Tabelle 2.8: **Zusammensetzungen der 5x LD (loading dye) für SDS-PAGE**

5x LD (ohne DTT/EtSH) 10 ml	2,27 ml 1 M Tris pH 6,8
	5% SDS (2,5 ml 20% SDS)
	25% Glycerol (5 ml 50% Glycerol)
	5 mg Bromophenolblau
	mit aqua bidest. auf 10 ml auffüllen
5x LD mit DTT 10 ml	10 ml 5x LD
	77,1 mg DTT (500 mM)
5x LD mit EtSH 10 ml	1% EtSH (100 µl 100% EtSH)
	mit 5x LD auf 10 ml auffüllen

Tabelle 2.9: **Zusammensetzungen der Transferpuffer für Western Blots**

10x Stammlösung 5 L	290,74 g Tris-Base (480 mM)
	146,39 g Glycin (390 mM)
	auffüllen mit aqua dest. (destilliertes H ₂ O). auf 5 L
1x Gebrauchslösung mit 15% MeOH 1 L	100 ml 10x Stammlösung
	15% MeOH (150 ml > 99,9% MeOH)
	auffüllen mit aqua dest. auf 1 L

Tabelle 2.10: **Zusammensetzungen der Waschpuffer und Blocklösungen für Western Blots**

20x TBS (<i>Tris(hydroxymethyl)-aminomethan buffered saline</i>) Stammlösung 5 L	606 g Tris Base (1 M)
	876,6 g NaCl (3 M)

	auffüllen mit aqua bidest. auf 5 L und pH mit HCl auf 7,4 einstellen
1x Gebrauchslösung TBS-T (<i>Tris(hydroxymethyl)-aminomethan buffered saline with Tween20</i>) 10 L	500 ml 20x TBS Stammlösung
	5 ml Tween20
	auffüllen mit aqua dest. auf 10 L
Blocklösung 100 ml	5 g Magermilchpulver (5 %)
	auf 100 ml mit TBS-T auffüllen

Tabelle 2.11: Zusammensetzungen der *Stripping*-Lösungen für Western Blots

4x <i>Stripping</i> -Stammlösung 1 L	40 g NaOH (2 M)
	auf 500 ml aqua bidest auffüllen
1x <i>Stripping</i> -Gebrauchslösung 200 ml	50 ml 2 M NaOH (0,5 M)
	auf 200 ml mit aqua bidest auffüllen

Tabelle 2.12: Zusammensetzungen der FAST-Green-Lösungen

10x FAST-Green-Stammlösung 100 ml	5 mg Fast Green FCF
	6,7 ml Eisessigsäure 100%
	mit aqua bidest auf 70 ml auffüllen
	+ 30 ml MeOH
FAST-Green-Waschpuffer 1 L	67 ml Eisessigsäure 100%
	300 ml MeOH
	mit aqua bidest. auf 1 L auffüllen
1x FAST-Green-Gebrauchslösung 30 ml	3 ml Fast Green 10x Stammlösung
	mit FAST-Green-Waschpuffer auf 30 ml auffüllen

Tabelle 2.13: **Zusammensetzungen verschiedener Probenpuffer**

PBS-Probenpuffer 10 ml	10 ml PBS 1x Gebrauchslösung
	+ 1 Tablette Protease-Inhibitor
Tris-Probenpuffer 1 ml	1 ml 500 mM Tris pH7,5 (50 mM Tris)
	mit PBS-Probenpuffer auf 10 ml auffüllen
1% DDM-Probenpuffer 10 ml	1 ml 500 mM Tris pH 7,5 (50 mM Tris)
	1% DDM (1 ml 10% DDM)
	mit aqua bidest. auf 10 ml auffüllen
	+ 1 Tablette Protease-Inhibitor
0,5% SDS-Probenpuffer 10 ml	1 ml 500 mM Tris pH 7,5 (50 mM Tris)
	0,5% SDS (500 µl 10% SDS)
	mit PBS-Probenpuffer auf 10 ml auffüllen
2% SDS-Probenpuffer 1ml	100 µl 500 mM Tris pH 7,5 (50 mM Tris)
	2% SDS (200 µl 10% SDS)
	mit PBS-Probenpuffer auf 1 ml auffüllen
Saccharose-Probenpuffer 10 ml	1,09 g Saccharose (320 mM Saccharose)
	200 µl 500 mM Tris pH 7,5 (10 mM Tris)
	0,85 mg NaHCO ₃ (1 mM NaHCO ₃)
	2,033 mg MgCl ₂ (1 mM MgCl ₂)
	mit aqua bidest. auf 10 ml auffüllen
	+ 1 Tablette Protease Inhibitor

Tabelle 2.14: **Zusammensetzungen verschiedener IP-Puffer**

SDS-IP-Puffer 10 ml	1 ml 500 mM Tris pH 7,5 (50 mM Tris)
	0,5% SDS (500 µl 10% SDS)
	1% Triton X-100 (1 ml 10% Triton X-100)
	mit PBS auf 10 ml auffüllen
	+ 1 Tablette Protease-Inhibitor

DDM-IP-Puffer 10 ml	entspricht 1% DDM-Probenpuffer
Saccharose-DDM-IP-Puffer 10 ml	9 ml Saccharose-Probenpuffer
	1% DDM (1 ml 10% DDM)

Tabelle 2.15: **Zusammensetzungen der Färbelösungen für Coomassie-Färbungen**

Gel-Fixierlösung 1 L	40% EtOH (400 ml)
	10% Essigsäure (100 ml)
	mit aqua dest. auf 1 L auffüllen
Färbe-Stammlösung 1 L	2% H ₃ PO ₄ (Phosphorsäure) (20 g)
	10% (NH ₄) ₂ SO ₄ (Ammoniumsulfat) (100 g)
	in 800 ml aqua bidest. lösen
	0,1% Coomassie Brilliant Blue G250 (1 g)
	mit aqua bidest. auf 1 L auffüllen
Färbe-Gebrauchslösung 200 ml	160 ml Färbe-Stammlösung
	40 ml MeOH
Entfärbelösung 1 L	1% Essigsäure (10 ml)
	mit aqua dest. auf 1 L auffüllen

Tabelle 2.16: **Enzyme, Nukleinsäuren und Reaktionskomplettsysteme**

ECL (<i>enhanced chemoluminescence</i>) Entwickler-Chemolumineszenzkit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Proteingrößenmarker <i>PageRuler® Plus Prestained Proteine Ladder</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Protein-G-gekoppelte <i>Dynabeads</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

Tabelle 2.17: **Antikörper**

Anti-PMP22 (polyklonal Kaninchen)	Sigma-Aldrich SAB4502217 LOT:310306, Schnelldorf, DE
Anti-PMP22 (polyklonal Kaninchen)	Assay Biotechnology C0306, Fremont, CA, USA

Anti-PMP22 (monoklonal Maus)	Santa Cruz, sc-515199, Heidelberg, DE
Anti-MPZ (polyklonal Kaninchen)	J, Archelos, Würzburg, DE
IgG (Immunglobulin G) Kaninchen	Dianova, Hamburg, DE
IgG Maus	Dianova, Hamburg, DE
HRP(<i>horseradish peroxidase</i>) -anti-Kaninchen (Ziege)	Dianova, Hamburg, DE
HRP-anti-Maus (Ziege)	Dianova, Hamburg, DE

Tabelle 2.18: **Geräte**

Akkuschrauber PowerMaxx12	Metabo, Nürtingen, DE
Blotkammern für Western Blot	BioRad, Hercules, CA, USA
Binokular	Zeiss, Jena, DE
<i>Cryo-GrinderTM</i>	OPS Diagnostics, Lebanon, NJ, USA
ECL-und Fluoreszenz-Imager (<i>Chemo Star PLUS Imager HR 6.0</i>)	Intas, Göttingen, DE
Feinwaage, digital	Sartorius, Göttingen, DE
Gefrierschrank -20°C	Liebherr, Ochsenhausen, DE
Gefrierschrank -80°C	New Brunswick, Scientific, Nürtingen, DE
Gelkammern für Polyacrylamidgele	BioRad, Hercules, CA, USA
Gewebehomogenisator <i>Precellyse 24</i>	Bertin Technologies, Darmstadt, DE
Geweberotator TC-7 (M1053 – 4005)	New Brunswick Scientific, Nürtingen, DE
<i>Gel-Buffer-DAM</i> (Platzhalter)	Biorad, Hercules, CA, USA
SDS-PAGE-Gel-Glasplatten 1,5 mm	Biorad, Hercules, CA, USA
SDS-Page-Gel-Gummiabdichtung	Hauswerkstatt, MPI exp. Medizin, Göttingen, DE
Glaswaren	Schott, Mainz, DE
Magnetrührer	Omnilab, Bremen
Magnetständer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

Mini-Hybridisierungsöfen Modell OV2	Biometra Göttingen, DE
<i>NanoDrop</i> 2000-Spektralphotometer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
pH- und Temperatur-Meter Model 720	Xylem Analytics Germany GmbH, Weilheim, DE
Pipetten, Größe: 2 µl, 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	Diamond Gilson, Middleton, WI, USA
Probenmischgerät VortexGenie2	Scientific Industries Inc, Bohemia, NY, USA
Reinstwasseranlage Arium 611	Sartorius, Göttingen, DE
Spannungsgerät Elektrophorese PowerPac Basic	BioRad, Hercules, CA, USA
Sterilbank	Heraeus Instruments, Langenselbold, DE
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, DE
Ultrazentrifuge, Optima TLX	Beckmann Coulter GmbH, Krefeld, DE
Western-Blot-Schwämme	Biorad, Hercules, CA, USA
Zentrifuge Centrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg, DE
Zentrifuge GalaxyMini	VWR, Radnor PA, USA

Tabelle 2.19: **Software**

Chemostar-Bildaufnahme-Software	Intas, Göttingen, DE
GIMP 2.10.14	Spencer Kimball, Peter Mattis und das GIMP-Entwicklerteam, CA, USA
ImageJ 2.0.0	NIH, USA
Microsoft-Excel Version 15.26	Microsoft Europe, Berlin
Microsoft-Word Version 15.26	Microsoft Europe, Berlin
PyRAT (Scionics Computer Innovations)	Dresden, DE
DAVID Bioinformatics Resources 6.8	Laboratory of Human Retrovirology and Immunoinformatics, Frederick, MD, USA
BioVenn, <i>a web application for the comparison and visualization of biological lists using area-proportional Venn Diagrams</i> , seit 2007	Tim Hulsen, Jacob de Vlieg, Wynan Alkema; URL: https://www.biovenn.nl/ ; [URL abgerufen am 20.05.2020]

Die MS-Versuche und die dafür benötigten Materialien, deren Ergebnisse für diese Arbeit zur Verfügung gestellt wurden, wurden durch eine Kollaboration mit dem Labor von Herrn Prof. Dr. med. H. Urlaub durchgeführt und werden daher hier nicht aufgelistet bzw. beschrieben.

2.2 Versuchstiere

2.2.1 Tierhaltung und Zucht

Die in dieser Arbeit verwendeten Versuchstiere waren ausschließlich Wildtyp-Ratten der Linie „*Sprague Dawley*“, welche im Tierhaus des Max-Planck-Instituts für experimentelle Medizin in Göttingen gehalten und gezüchtet wurden. Dabei wurden stets die Richtlinien der Deutschen Gesellschaft für Versuchstierkunde eingehalten.

2.2.2 Kennung der Tiere und Identifikation der Tiere

Zur unverwechselbaren Identifikation der Versuchstiere wurde ein einheitlicher Ohrloch-Code verwendet: Die Tiere erhielten im Alter von 21 Tagen eine Ohrlochmarkierung, die eine Nummerierung von 1 – 99 erlaubte. Die Kennung der jüngeren Tiere erfolgte mithilfe von Tätowierungen an den Füßen, die eine Zuordnung zu den Zahlen 0 – 14 zuließ. Außerdem befand sich an jedem Käfig eine Käfiginformationskarte mit Informationen über die Linie der Tiere inklusive Namen und Nummer, Geschlecht, Geburtsdatum der Tiere sowie der Identifikationsnummern der Elterntiere. Die Verwaltung der Versuchstiere inklusive der Käfige erfolgte mithilfe des Tierdatenbankprogramms PyRAT.

2.2.3 Tötung der Versuchstiere, Probengewinnung und Präparation des

N. ischiadicus

Die Tötung der Versuchstiere erfolgte am 95. Tag nach Geburt (wobei der Tag der Geburt als Tag null gilt) durch eine überdosierte CO₂ Narkose (über mindestens 3 min). Anschließend erfolgte die Gewebeentnahme des *N. ischiadicus* beider Seiten: Nach Fixierung der Tiere auf dem Bauch wurden die Hinterläufe sowie der untere Körperstamm großflächig mit Wasser benetzt. Es folgte die Abtrennung von Haut inklusive des Fells und der Unterhaut im Becken- und Oberschenkelbereich sowie anschließend die Eröffnung der Faszien der Glutealmuskulatur in Verlaufsrichtung des *N. ischiadicus*. Der nun sichtbare *N. ischiadicus* wurde zunächst an seinem distalen Ende

direkt vor seiner Aufzweigung in den *N. fibularis communis* und den *N. tibialis* durchtrennt und proximal unmittelbar distal des *Plexus lumbosacralis* abgesetzt. Der Nerv wurde anschließend in eine mit eiskaltem PBS gefüllte Petrischale überführt, um das Epineurium des Nervs unter Zuhilfenahme eines Binokulars abzutrennen. Hierdurch sollte eine mögliche Blut- und Bindegewebskontamination minimiert werden. Allen in der Arbeit verwendeten Tieren wurde der rechte und linke *N. ischiadicus* nacheinander in beschriebener Weise entnommen. Nach Überführung in beschriftete Eppendorf-Gefäße wurden sie bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

2.3 Probenverarbeitung und kryogenes Mörsern

Die bei -80°C aufbewahrten gefrorenen Ischias-Nerven von vier Versuchstieren wurden gemeinsam mithilfe des *Cryo-Grinders* und einem Akkuschauber mechanisch homogenisiert. Dieser Vorgang erfolgte im mit flüssigem Stickstoff vorgekühlten Mörser bei niedriger Umdrehungszahl des Akkuschaubers (< 200 rpm), um im Gegensatz zur Homogenisierung in einem flüssigen Lysepuffer die Bewahrung von Protein-Protein-Interaktionen zu gewährleisten. Abbildung 2.1 zeigt Fotos des Versuchsaufbaus, des Mörserstabs sowie des Mörser-Behältnisses, in dem die Nerven homogenisiert wurden. Das entstandene Nervenpulver wurde mittels Spatel in vorgekühlte Eppendorf-Gefäße überführt und bei -80°C gelagert.



Abbildung 2.1: **Cryo-Grinder und Akkuschauber für die mechanische Lyse von Ratten-Ischias-Nerven:** Die Styroporbox diente als Behältnis für den flüssigen Stickstoff. Hierin wurden die Mörser platziert und die Ratten-Ischias-Nerven innerhalb der vorgekühlten Mörser durch Drehung des Mörserstabs mittels Akkuschauber homogenisiert.

Alternativ zum kryogenen Mörsern wurden auf gleiche Art und Weise vier weitere Ratten-Ischias-Nerven, die in den PMP22-IPs ohne Proteinquervernetzung eingesetzt

wurden, zunächst auch bei -80°C eingefroren und in Saccharose-Probenpuffer mittels *Precellyse*-Gewebehomogenisator homogenisiert. Dieser Versuchsschritt wurde direkt vor der Verwendung des Homogenisats im darauffolgenden IP-Experiment (siehe Kapitel 2.11) durchgeführt.

2.4 Proteinquervernetzung

Das Quervernetzen von Proteinen diente im Rahmen dieser Arbeit in erster Linie der Stabilisierung von Protein-Protein-Interaktionen durch die Herstellung kovalenter Verbindungen zwischen den Interaktionspartnern. Das Proteinquervernetzungsreagenz BS3 wurde stets frisch in aqua bidest. gelöst. Das wie in Kapitel 2.3 beschrieben hergestellte Nervenpulver der Ratten-Ischias-Nerven wurde in eiskaltem PBS-Probenpuffer kurz suspendiert und dann direkt mit unterschiedlichen Konzentrationen an BS3 und Glutaraldehyd (siehe Abbildung 3.1) für 5 min bei RT (Raumtemperatur) inkubiert. Während der Inkubationszeit wurde die Probe stetig gemischt. Die Quervernetzungsreaktion wurde durch die Zugabe von 500 mM Tris-Puffer (Endkonzentration 50 mM) gestoppt und auf Eis gestellt. Die proteinbiochemische Analyse der Proben erfolgte mithilfe der in Kapitel 2.7 beschriebenen Western-Blot-Methode.

2.5 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgte vor dem Quervernetzungsschritt. Hierzu wurden 32 μl jeder Nervenpulver-PBS-Suspension mit 8 μl einer 10% SDS-Stammlösung versetzt, um die vorhandenen Proteine zu solubilisieren. Nach einer Zentrifugation bei 16.000 g und 4°C für 30 min erfolgte die Messung des Proteingehalts aus dem Überstand. Es wurde hierfür das *NanoDrop*2000-Spektralphotometer genutzt, welches Proteinkonzentrationen anhand der Absorption von Licht der Wellenlänge 280 nm durch die Flüssigkeitssäule der Probe bestimmt. 2 μl große Volumina der einzelnen Proben wurden mit jeweils drei technischen Replikaten mittels *Nanodrop* vermessen und deren Mittelwert als genäherte Proteinkonzentration angenommen. Die Messungen erfolgten stets unter Kalibrierung mittels 2% SDS-Probenpuffer. Die Proteinkonzentrationsbestimmung der Proben, die nicht der Proteinquervernetzung zugeführt wurden, erfolgte analog zum hier geschilderten Vorgehen.

2.6 Solubilisierung

Ziel der Solubilisierungsexperimente war es, optimale Versuchsbedingungen zur Solubilisierung von PMP22 in sowohl proteinquervernetzten als auch in Proben ohne Proteinquervernetzung zu ermitteln. Hierzu wurden verschiedene denaturierende und nicht-denaturierende Detergenzien miteinander verglichen.

Tabelle 2.20: Detergenzname und Anteil des Detergenz am Solubilisierungspuffer in %

Detergenz	Anteil des Detergenz am Solubilisierungspuffer in %	Zugehörigkeit zur übergeordneten Detergenzgruppe
SDS	0,1%	anionisch, denaturierend
SDS	0,5%	anionische denaturierend
SDS	1%	anionische denaturierend
DDM	1%	nicht-ionisch, nicht-denaturierend
Triton X-100	0,5%	nicht-ionisch, nicht-denaturierend
Triton X-100	1%	nicht-ionisch, nicht-denaturierend
CHAPS	0,1%	zwitterionisch, nicht-denaturierend
CHAPS	0,5%	zwitterionisch, nicht-denaturierend
ohne	/	/

Die im Tris-Probenpuffer gelösten Proben mit bzw. ohne vorherige Proteinquervernetzung wurden mit verschiedenen Detergenzien sowie unterschiedlichen Detergenzkonzentrationen, wie Tabelle 2.20 zu entnehmen, inkubiert. Die Inkubation erfolgte je nach Experiment bei 4°C für 30 min bzw. bei RT für 1,5 h auf einem Geweberotator. Dadurch war eine kontinuierliche Durchmischung während der Inkubationszeit der Proben gewährleistet. Anschließend erfolgte die Zentrifugation der Proben entweder mittels Ultrazentrifuge mit 100.000 g oder mittels Tischzentrifuge bei 16.000 g für 30 min bei 4°C. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand in vorgekühlte Eppendorf-Gefäße überführt. Hierbei wurde das Pellet nicht mit der Pipettenspitze berührt und ein Restüberstand von ca. 20 µl über dem Pellet nicht abgenommen, um eine Kontamination des Überstands mit Bestandteilen aus dem Pellet zu vermeiden. Dieser restliche Überstand wurde anschließend dekantiert. Das Pellet wurde in 5x LD (Endkonzentration 1x LD) für die proteinbiochemische Analyse mittels Western Blot

resuspendiert. Auch nach diesem Versuchsschritt erfolgte die proteinbiochemische Analyse des Zentrifugationsüberstands mithilfe der in Kapitel 2.7 beschriebenen Western-Blot-Methode.

2.7 Western Blot

2.7.1 Western-Blot-Prinzip

Beim Western Blot werden Proteine, die zuvor in einem SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt wurden, mithilfe der Anlage eines senkrecht zum Gel angelegten elektrischen Feldes auf eine proteinbindende Membran übertragen. Im Anschluss folgt der immunologische Nachweis von Antikörper-spezifischen Proteinen auf dieser Membran durch Chemolumineszenzdetektion.

2.7.2 Probenvorbereitung

Die für die Western-Blot-Analyse vorgesehenen Proben wurden unterschiedlich, wie in den Kapiteln 2.4, 2.6, 2.10 und 2.11 beschrieben, prozessiert. Zur Vorbereitung auf den Western Blot wurden alle Proben mit dem in der Tabelle 2.8 genannten 5x LD im Verhältnis 1:5 versetzt, wobei die Antikörper enthaltenden Proben mit 5x LD ohne DTT/EtSH versetzt wurden. Nach Durchmischung mittels Vortexmischer wurden die Proben bei 37°C mittels Thermomixer für 10 min erwärmt und leicht geschüttelt. Hier-nach wurden die Proben erneut kurz durchmischt und auf das SDS-Gel zur anschließenden Gelelektrophorese aufgetragen.

2.7.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die der massenabhängigen und ladungsunabhängigen Trennung von Proteinen dienende Gelelektrophorese nach Laemmli (Laemmli 1970) wurde entweder mit selbst gegossenen Gelen bestehend aus Sammel- und Trenngel (12% bzw. 14% SDS) oder mit fertigen Gradientengelen durchgeführt. Zunächst wird im Folgenden kurz das Selbstgießen der SDS-Polyacrylamid-Gele beschrieben.

Zu Beginn wurden für jedes Gel zwei Glasplatten (1,5 mm) mit EtOH und H₂O gereinigt und deren Ränder mit Vaseline benetzt, um einen dichten Verschluss der Platten zu gewährleisten. Dann wurden die Glasplatten mithilfe von Klammern auf den dafür vorge-

sehenen Gelgießständern befestigt, wobei auf den unteren Rand der Gelgießständer zunächst eine Gummiabdichtung gelegt wurde. Die Dichtigkeit wurde anschließend durch Einfüllen von H₂O zwischen die Glasplatten überprüft. Im Anschluss wurden, gemäß dem in Tabelle 2.7 beschriebenen Rezept, die Bestandteile für das Trenngel vermischt, wobei APS am Schluss hinzugegeben wurde, wodurch eine Polymerisationsreaktion und damit das Aushärten des Gels ausgelöst wurde. Deshalb wurde die Flüssigkeit des Trenngels nach APS-Zugabe zügig zwischen die Glasplatten gegossen, wobei stets ein Abstand von ca. 3 cm zum oberen Ende der kürzeren Glasplatte für das spätere Sammelgel übriggelassen wurde. Eine dünne Schicht aus Isopropanol, die auf das Trenngel pipettiert wurde, sollte die Bildung von Luftblasen verhindern und einen glatten oberen Rand des Trenngels gewährleisten. Nach ca. 30 min war das Trenngel auspolymerisiert und das Isopropanol konnte mithilfe von aqua dest. vom Trenngel vorsichtig heruntergewaschen werden. Die Glasplatten wurden dann mit Kosmetiktüchern und Whatman-Papier-Resten getrocknet. Anschließend wurden die in Tabelle 2.7 beschriebenen Zutaten für das Sammelgel gemischt, wobei auch hier die Zugabe von APS zuletzt erfolgte. Das Sammelgel wurde auf das Trenngel gegossen und zügig mit Geltaschenkämmen der Dicke 1,5 mm mit jeweils zehn bzw. 15 Geltaschen versehen. Nach ca. 30 min war auch das Sammelgel vollständig polymerisiert. In der Regel wurden die selbst gegossenen SDS-Gele am Tag vor der SDS-PAGE angefertigt. Teilweise wurden sie in feuchten Tüchern für max. eine Woche bei 4°C aufbewahrt.

Die Gelelektrophorese erfolgte in einer Gelelektrophorese-Kammer, welche zunächst mit SDS-Laufpuffer zur Hälfte befüllt wurde, um im Anschluss die Gele mithilfe der passenden Kammereinsätze einzusetzen. Anschließend konnte die Kammer vollständig mit Laufpuffer befüllt werden, um die elektrische Auftrennung der Proteine entlang der leitfähigen Flüssigkeit zu ermöglichen. Die hierfür benötigte elektrische Spannung wurde durch den Anschluss eines Spannungsgerätes generiert. Die wie in Kapitel 2.7.2 beschriebenen vorbereiteten Proben wurden warm mithilfe einer Pipette in die vorgesehenen Taschen nach einem selbst bestimmten Schema pipettiert. Die jeweils gewählte Proteinmenge ist dem jeweiligen Abschnitt mit Beschreibung der jeweiligen Methode zu entnehmen. Zur Zuordnung der molekularen Massen wurden außerdem 4 µl eines farbcodierten Markers in eine der Geltaschen pipettiert. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 150 V und 30 mA für ca. 1 – 2 h je nach Geschwindigkeit der Protein-Lauffront und wurde entsprechend unter optischer Kontrolle beendet. Anschließend wurden die Gele aus der Kammer entnommen und vorsichtig aus den Glasplatten (bei selbst gegossenen Gelen) bzw. aus

den Plastikmanteln (der fertigen Gradientengele) entfernt. Es erfolgte eine Equilibrierung der SDS-Gele im Transferpuffer für 10 min, welche der Vorbereitung auf den Proteintransfer diente.

2.7.4 Immunoblot

Der Transfer der Proteine aus dem SDS-Gel erfolgte durch Anlage eines senkrecht zum Gel verlaufenden elektrischen Feldes auf eine proteinadsorbierende PVDF-Membran. Vorher wurde die PVDF-Membran zunächst in 100% MeOH 60 sec lang aktiviert und im Anschluss zusammen mit vier Whatman-Papieren und zwei Schwämmen 20 min lang im eiskalten Transferpuffer (4°C) inkubiert. In einer dafür vorgesehenen Blotkassette wurde der Western Blot aus (von unten nach oben) Schwamm, Whatman-Papier, Gel, PVDF-Membran, Whatman-Papier und Schwamm zusammengesetzt und in die mit eiskaltem Transferpuffer (4°C) befüllte Blotkammer eingesetzt. Weiterhin wurde ein Kuhlpack in die Blotkammer eingesetzt und die Kammer in ein mit Eis befülltes Behältnis gestellt, um eine annähernd konstante kalte Transferpuffertemperatur über den Versuchszeitraum zu gewährleisten. Der Transfer erfolgte bei 100 V und 300 mA über ca. 90 min.

2.7.5 FAST-Green-Färbung

Die FAST-Green-Färbung der PVDF-Membran diente in dieser Arbeit der Darstellung der Gesamtproteinmenge und deren Verteilungsmuster auf der Transfermembran mithilfe von Fluoreszenzdetektion. Hierzu wurde die Membran im Anschluss an den Proteintransfer zunächst zweimal in aqua bidest. für jeweils 5 min gewaschen und dann in einer 1x FAST-Green-Lösung 5 min im Dunkeln inkubiert. Nach zweimaligem Waschen für jeweils 30 sec im FAST-Green-Waschpuffer erfolgte der Proteinnachweis durch digitale Fotoaufnahmen im ECL- und Fluoreszenz-*Imager* nach Anregung bei 628 nm und Emission bei 716 nm. Die optimalen Belichtungszeiten für die Fluoreszenzdetektion wurden hierbei empirisch im Rahmen der einzelnen Versuche ermittelt.

2.7.6 Spezifischer Proteinnachweis

Um die Membran im Anschluss an die FAST-Green-Färbung dem spezifischen antikörpervermittelten Proteinnachweis zugänglich zu machen, wurde sie zunächst dreimal für jeweils 5 min in TBS-T gewaschen, um den durch die FAST-Green-Färbung gesunkenen pH-Wert wieder auszugleichen. Er wurde mithilfe von pH-Wert-Teststreifen näherungsweise bestimmt und nach dessen Ausgleich auf ca. 7,4 wurde die Membran für 1 h bei

RT in einer Blocklösung (Zusammensetzung siehe Tabelle 2.10) inkubiert, um unspezifische Bindungen an die Membran zu blockieren. Anschließend erfolgte die Inkubation der Transfermembran mit dem Primärantikörper über Nacht bei 4°C. Sowohl die primären als auch die sekundären Antikörper wurden stets in der Blocklösung in den der Tabelle 2.21 zu entnehmenden Verhältnissen verdünnt. Im Anschluss an die Inkubation mit dem Primärantikörper folgten vier jeweils zehnminütige Waschschrte mit TBS-T, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Die Inkubation der Transfermembran mit dem Sekundärantikörper erfolgte für ca. 1 h bei RT. Die hierfür verwendeten Sekundärantikörper waren je nach Primärantikörper entweder gegen Kaninchen oder gegen Maus gerichtet und mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelt. Hiernach wurde die Membran erneut viermal für jeweils 10 min in TBS-T gewaschen, bevor sie zum Detektionsschritt auf eine Glasplatte überführt wurde. Hierzu wurde eine ECL-haltige Lösung auf die Glasplatte vorgelegt und die Membran für ca. 1 min hineingelegt. Das durch Umsatz des ECL entstandene Lumineszenz-Signal wurde mithilfe der Chemostar-Bildaufnahme-Software detektiert. Hierzu wurden digitale Fotoaufnahmen mit unterschiedlich langen Belichtungszeiten angefertigt.

Tabelle 2.21: **Verdünnungsverhältnisse der für Western Blots verwendeten Primär- und Sekundärantikörper**

Primärantikörper	Verdünnung in Blocklösung
Anti-PMP22 (polyklonal, Kaninchen) Sigma-Aldrich	1:1.000
Anti-PMP22 (polyklonal, Kaninchen), Assay Biotech.	1:1.000
Anti-PMP22 (monoklonal, Maus), Santa Cruz	1:500
Anti-MPZ (polyklonal Kaninchen) J, Archelos	1:2500
Sekundärantikörper	Verdünnung in Blocklösung
HRP-anti-Kaninchen (Ziege), Dianova	1:10.000
HRP-anti-Maus (Ziege), Dianova	1:5.000

2.7.7 Strippen der Transfermembran

Um den spezifischen Proteinnachweis eines weiteren Proteins auf der Transfermembran zu ermöglichen, können die an die Membran gebundenen Antikörper durch *Stripping* von

der Membran getrennt werden. Hierzu wurde eine 1x *Stripping*-Lösung (siehe Tabelle 2.11) hergestellt, in der die PVDF-Membran für 10 min bei RT inkubiert wurde. Im Anschluss wurde die Transfermembran erneut in TBS-T dreimal jeweils 10 min gewaschen. Hiernach konnte ein erneuter spezifischer Proteinnachweis wie in Kapitel 2.7.6 beschrieben erfolgen.

2.8 Vergleich der Bindungseffektivität der Anti-PMP22-Antikörper

Um die unterschiedlichen, kommerziell erhältlichen Anti-PMP22-Antikörper in ihrer Effektivität, PMP22 in Ratten-Ischias-Nerven-Homogenisaten zu binden, vergleichen zu können, wurden die in Tabelle 2.17 genannten Anti-PMP22-Antikörper im Western Blot getestet. Hierfür wurden aus dem Ratten-Ischias-Nerven-Pulver drei gleichartige Proben mit jeweils ca. 50 µg Protein hergestellt, wobei die Solubilisierung mittels 1% DDM-Probenpuffer gemäß den Beschreibungen aus Kapitel 2.6 erfolgte. Anschließend wurden die Proben wie in Kapitel 2.7 beschrieben mit 5x LD versetzt und dem Western-Blot-Prozedere zugeführt. Dabei wurden jeweils ein Homogenisat und ein Proteingrößenmarker nebeneinander auf das SDS-Gel pipettiert. Es wurden ca. 20 µg Protein pro Geltasche geladen. Die Western-Blot-Membran wurde nach dem Versuchsschritt aus Kapitel 2.7.4 zu diesem Zweck zweimal durchtrennt und dann je ein Stück der Membran mit dem jeweiligen Anti-PMP22-Antikörper inkubiert. Die übrigen Versuchsschritte erfolgten gemäß den Schilderungen aus Kapitel 2.7, wobei als Sekundärantikörper der der Herkunftsspezies des Primärantikörpers entsprechende (HRP-anti-Kaninchen bzw. -Maus) gewählt wurde.

2.9 Proteinquantifizierung mittels Coomassie-Gel-Färbung

Für den Gesamtprotein-Nachweise im SDS-Gel und die Quantifizierung der Proteine wurde eine Coomassie-Färbung verwendet. Die hierfür verwendeten Lösungen finden sich in Tabelle 2.15. Hierzu wurde zunächst die SDS-PAGE wie in Kapitel 2.7.3 beschrieben durchgeführt. Anschließend wurde das Gel nicht dem Proteintransfer zugeführt, sondern in einer Fixierlösung für ca. 1 h fixiert. Anschließend wurde das Gel in aqua dest. zweimal für 10 min gewaschen und dann in der Coomassie-Färbelösung über Nacht inkubiert. Hiernach wurde das Gel in ein mit Entfärbelösung gefülltes Behältnis transferiert

und der Hintergrund durch mehrmaliges Wechseln der Entfärbelösung entfärbt. Die Detektion und direkte Quantifizierung der Proteine erfolgte auch hier mithilfe des ECL- und Fluoreszenz-Imagers.

Der Anti-PMP22-Antikörper von Sigma und die Kaninchen-IgGs wurden mittels SDS-PAGE und Coomassie-Gel-Färbung bezüglich ihres Proteingehalts direkt miteinander verglichen. Hierzu wurden pro Antikörper jeweils zwei Proben mit jeweils 3 µg Protein in 5x LD gelöst, wobei immer eine der beiden Proben mit 1% EtSH versetzt wurde. Es sollte so der Effekt des reduzierenden Agens auf die Antikörpertrennung im SDS-Gel sichtbar gemacht werden. Die Antikörper-Proben wurden dann entsprechend den Beschreibungen in Kapitel 2.7.3 und 2.9 behandelt. Die Analyse der Proteinquantifizierung mittels Coomassie-Gel-Färbung erfolgte mithilfe des Gel-Analyse-Plugins der ImageJ-Software. Da hier nicht eine absolute Quantifizierung des Proteingehalts bzw. des Antikörper-Gehalts in den Proben, sondern eine zueinander relative Quantifizierung erfolgen sollte, wurde die Menge des PMP22-AK-Signals für reduzierende und nicht reduzierende Bedingungen jeweils gleich eins gesetzt. Die Signalstärken der Kaninchen-IgG-Antikörper-Ketten wurden dann jeweils als Vielfaches der Signalstärke des Anti-PMP22-Antikörpers berechnet. Aus dem Vielfachen der jeweiligen Mengen unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen wurde dann ein Mittelwert gebildet. Dieser Mittelwert diente als Richtwert für die relative Menge an Antikörper-Ketten des Anti-PMP22-Antikörpers und der Kaninchen-IgGs im Verhältnis zueinander.

2.10 Protein-G-gekoppelte-Dynabeads, Titration

In dieser Arbeit wurden für die IP-Versuche stets Protein-G-gekoppelte supramagnetische *Dynabeads* verwendet, deren Protein-G-Teil an die Fc-Komponenten von IgGs bindet und so die Anreicherung von Antigen-Antikörper-Komplexen mithilfe eines magnetischen Eppendorf-Gefäß-Ständers ermöglicht. Allerdings können diese Protein-G-gekoppelten *Dynabeads* unspezifische Wechselwirkungen eingehen. Zur Analyse der Menge an unspezifischen Bindungen, die durch die Zugabe von Protein-G-gekoppelten *Dynabeads* zu den in dieser Arbeit verwendeten Homogenisaten entstehen können, wurden diese *Dynabeads*, nachdem sie dreimal in PBS gewaschen und dann in 1% DDM-Probenpuffer gelöst wurden, mit Ratten-Ischias-Nerv-Homogenisat (gelöst in 1% DDM-Probenpuffer) inkubiert. Hierzu hatte die Probe aus Solubilisierungspuffer und Ratten-Ischias-Nerv eine Proteinkonzentration von ca. 1 mg/ml. Es wurden jeweils 70 µl

des Homogenisats mit der der Tabelle 2.22 zu entnehmenden Mengen an *Dynabeads* für 1 h bei 4°C unter ständiger Durchmischung inkubiert.

Tabelle 2.22: **eingesetzte *Dynabeads*-Mengen in der Protein-G-gekoppelten-*Dynabeads*-Titration**

Probenbezeichnung	Menge <i>Dynabeads</i> [μ l]	Menge Homogenisat [μ l]
15 B	15	70
25 B	25	70
50 B	50	70

Nach der Inkubation erfolgte die Trennung der magnetischen *Dynabeads* mithilfe eines Magnetständers. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und die *Dynabeads* dreimal in 100 μ l des 1% DDM-Probenpuffers gewaschen. Anschließend erfolgte die Elution der an die *Dynabeads* gebundenen Proteine mithilfe von 5x LD und Erwärmung der Proben auf 37°C für 10 min. Auch das Eluat wurde dann in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Es wurden SDS-PAGE-Proben inklusive 1% EtSH (Zusammensetzung siehe Tabelle 2.8) zur proteinbiochemischen Analyse mittels Western Blot von den Überständen der Proben nach Trennung der *Dynabeads* sowie von dem Eluat der *Dynabeads* hergestellt. Diese wurden dann mit der in Kapitel 2.7 beschriebenen Western-Blot-Methode analysiert. Hierzu wurden ca. 15 μ g Protein pro Geltasche geladen.

2.11 Immunopräzipitation

2.11.1 Probenvorbereitung

In dieser Arbeit erfolgte die IP aus Ratten-Ischias-Nerven, die wie in Kapitel 2.3 beschrieben mechanisch homogenisiert bzw. mittels Gewebehomogenisator im Saccharose-Probenpuffer homogenisiert wurden. Diese wurden dann entweder wie in Kapitel 2.4 dargestellt mithilfe von BS3 proteinquervernetzt und im Anschluss solubilisiert oder ohne Proteinquervernetzung direkt dem Solubilisierungsschritt wie in Kapitel 2.6 beschrieben zugeführt. Im Anschluss an die Solubilisierung wurden die Proben zentrifugiert und bei den proteinquervernetzten Proben der Überstand mit Triton X-100 versetzt, um die Störung der Antigen-Antikörper-Interaktion, die durch SDS vermittelt wird (Qualtiere et al. 1977; Bonifacino et al. 2016), zu minimieren. Die Quantifizierung der Proteinmenge in der Probe erfolgte wie in Kapitel 2.5 beschrieben. Die

Proteinkonzentration wurde dann durch Hinzufügen der entsprechenden Mengen an IP-Puffer auf ca. 1 mg/ml eingestellt.

2.11.2 Protein-G-gekoppelte *Dynabeads*, Vorbereitung

Die für die Anreicherung der Antigen-Antikörper-Komplexe genutzten Protein-G-gekoppelten *Dynabeads* wurden vor ihrem Gebrauch gut gemischt, dreimal in PBS gewaschen und dann in dem jeweils verwendeten IP-Puffer suspendiert. Hierbei wurden (nach Optimierung der Versuchsbedingungen, siehe Kapitel 3.4.2) ca. 15 μ l *Dynabeads* für 70 μ l solubilisiertes Homogenisat (*Input*, Proteinkonzentration 1 mg/ml) vorbereitet. Zur IP mit zuvor gesättigten *Dynabeads* wurden die *Dynabeads* zunächst mit dem *Input* für eine 1 h bei 4°C inkubiert und dann mithilfe eines Magnetständers vom Homogenisat getrennt. Anschließend wurden sie in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Wurden keine durch Inkubation mit dem Homogenisat gesättigten *Dynabeads* verwendet, wurde der *Input* zunächst mit Kaninchen-IgGs sowie mit leeren Protein-G-gekoppelten *Dynabeads* wie im Folgenden (Kapitel 2.11.3 und 2.11.4) beschrieben geklärt.

2.11.3 Klärung von Homogenisaten mit Kaninchen-IgGs

Um unspezifische Bindungen des Anti-PMP22-Antikörpers an unbestimmte Proteine im Homogenisat zu verhindern, wurde das solubilierte Homogenisat zunächst im Verhältnis 1:20 mit unspezifischen Kaninchen-IgGs für eine 1 h bei 4°C inkubiert. Hierbei wurde die Probe stetig gemischt.

2.11.4 Klärung von Homogenisaten mit leeren Protein-G-gekoppelten *Dynabeads*

Im Anschluss wurden den Proben die gemäß Kapitel 2.11.2 vorbereiteten Protein-G-gekoppelten *Dynabeads* hinzugefügt. Sie wurden so 1 h bei 4°C inkubiert und gemischt. Dieser Schritt diente einerseits der Bindung der unspezifischen Kaninchen-IgGs an den Protein-G-Teil der *Dynabeads*. Andererseits sollten so direkte unspezifische Bindungen von Proteinen an die *Dynabeads* erfolgen. Anschließend wurden die *Dynabeads* mithilfe eines Magnetständers vom Überstand getrennt und im nächsten Schritt der von unspezifischen Bindungen an *Dynabeads* und Kaninchen-IgGs geklärte Überstand als IP-*Input* verwendet.

2.11.5 Immunopräzipitation

Das ggf. geklärte, solubilisierete Homogenisat wurde auf drei Eppendorf-Gefäße aufgeteilt, wobei eines nicht dem IP-Prozedere zugeführt und als *Input* für die Auswertung mittels Western Blot (siehe Kapitel 2.11.6) aufbewahrt wurde. Die anderen beiden Proben wurden über Nacht (ca. 16 h) mit dem spezifisch gegen PMP22 gerichteten Antikörper bzw. mit der gleichen Menge an unspezifischen Kaninchen-IgGs als Negativkontrolle bei 4°C unter ständiger Durchmischung inkubiert. Hierzu musste von dem verwendeten Anti-PMP22-Antikörper um den Faktor 2,91 mehr Material eingesetzt werden als von den Kaninchen-IgGs (siehe Kapitel 3.4.1). Die Antikörper wurden hier im Verhältnis 1:20 eingesetzt, konkret wurden 66,5 µl solubilisieretes Homogenisat mit 3,5 µl Anti-PMP22-Antikörper inkubiert. Im Anschluss wurde den Proben jeweils 15 µl Protein-G-gekoppelte *Dynabeads*, die je nach Experiment schon mit Ischias-Nerven-Homogenisat gemäß der Beschreibung in Kapitel 2.11.2 abgesättigt worden waren, zugeführt. Nach einer Inkubationszeit von 1 h bei 4°C unter ständiger Durchmischung wurden die Proben auf einen Magnetständer überführt, sodass die nun mit dem Antigen-Antikörper-Komplex beladenen *Dynabeads* durch den Magneten des Eppendorf-Ständers vom Überstand getrennt wurden. Nach Abnahme des Überstands wurden die mit den Antigen-Antikörper-Komplexen beladenen *Dynabeads* dreimal mit 100 µl des jeweiligen IP-Puffers (Zusammensetzungen siehe Tabelle 2.14) gewaschen, um unspezifisch gebundene Proteine an den *Dynabeads*-Antigen-Antikörper-Komplexen zu eliminieren. Beim letzten Waschschritt wurden die Proben dann in neue Eppendorf-Gefäße überführt, um die Kontamination des IP-Eluats durch an der Wand des Gefäßes klebende Proteine zu verhindern. Die Elution der Zielproteine von den *Dynabeads* erfolgte mithilfe von 5x LD (ohne DTT/EtSH) und Erwärmung der Proben bei 37°C über 10 min im Thermomixer. Hierzu wurden 14 µl (1/5 der Ausgangsmenge) 5x LD auf die *Dynabeads*-Antigen-Antikörper-Komplexe gegeben und die Probe gut gemischt. Nach 10 min Inkubation im Thermomixer wurden die *Dynabeads* mithilfe des Magnetständers von den Eluaten getrennt. Die Eluate wurden in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und auf die Ausgangsmenge der Probe mit aqua bidest. aufgefüllt.

2.11.6 Quantitative und qualitative Analyse mittels Western Blot

Die Analyse der spezifischen und unspezifischen IP-Eluate erfolgte mithilfe der in Kapitel 2.7 beschriebenen Western-Blot-Methode. Die Proben, die sich durch den Elutions-schritt schon in SDS-haltigem Probenpuffer (ohne DTT/EtSH) befanden, wurden mit dem

Vortexmischer gemischt und dann für 10 min bei 37°C erwärmt. Sie wurden dann wie in Kapitel 2.7.3 beschrieben aufs Gel aufgetragen, wobei stets ca. 10 µg pro Tasche geladen wurden.

2.12 Massenspektrometrie

2.12.1 Massenspektrometrie-Prozedere

Die Durchführung der MS-Experimente sowie die Visualisierung und Auswertung dieser Daten mit der MaxQuant-Software (Cox und Mann 2008) und der pLink-Software (Purcell et al. 2007; Chang et al. 2015) erfolgte in Kollaboration mit dem Labor von Herrn Prof. Dr. med. H. Urlaub am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie in Göttingen. Hier erfolgten SDS-PAGE-Versuche der spezifischen (Anti-PMP22-Antikörper) und unspezifischen (Kaninchen-IgGs) IP-Eluate mit anschließenden Coomassie-Färbungen der Gele. Daraufhin wurden die in den Gelen befindlichen Banden ausgeschnitten und getrocknet. Es folgte ein In-Gel-Verdau der Proteinbanden mit den Peptidasen Trypsin oder Chymotrypsin und anschließend die massenspektrometrischen Messungen mittels LC-MS/MS (*Liquid-Chromatography Tandem MS*). Bei der LC-MS/MS werden die Proben-Bestandteile (in diesem Fall Peptidfragmente) durch die Chromatografie zunächst voneinander getrennt und mittels zwei hintereinander geschalteter Massenanalysen im Massenspektrometer identifiziert.

Hierbei wurden für die PMP22-IPs ohne Proteinquervernetzung jeweils zwei technische Replikate von zwei biologischen Replikaten vermessen, während für die PMP22-IP mit Proteinquervernetzung ein biologisches Replikat und ein technisches Replikat vermessen wurde. Die so generierten Datensätze wurden in eine Excel-Tabelle übersetzt und so eine Darstellung der in den IP-Proben mittels Massenspektrometer identifizierten Proteine ermöglicht. Diese Excel-Tabelle wurde dann zur weiteren Auswertung hinsichtlich der potentiellen PMP22-Interaktionspartner zur Verfügung gestellt.

2.12.2 Analyse der Massenspektrometrie-Daten

Mithilfe der MS ist nicht nur eine Identifizierung, sondern auch eine relative Quantifizierung von Proteinen in einer Probe möglich. Das Ziel der anschließenden Analyse war daher diejenigen Proteine zu identifizieren, die in der spezifischen IP von PMP22 relativ zur Negativkontrolle angereichert waren. Da in einer MS viele unspezifische Proteine

identifiziert werden, die bei IP-Eluat-Messungen eben nicht als Interaktionspartner des immunopräzipitierten Proteins angesehen werden können, musste eine Analyse erfolgen, welche die unspezifischen von den spezifisch angereicherten Proteinen unterscheidet. Eine absolute derartige Analyse ist nicht möglich, sodass man sich dem nur nähern kann. Im Rahmen dieser Arbeit wurde hierzu folgendermaßen vorgegangen:

Es wurden nur die Proteine berücksichtigt, die von MaxQuant mit der größten Wahrscheinlichkeit einem MS-Spektrum zugeordnet wurden. MaxQuant bietet nämlich die Möglichkeit einer Suche nach zweiten und dritten Peptiden (die einem bestimmten Protein zugeordnet werden) anhand von Signalen, die durch Co-Fragmentierungen während der MS entstehen (Cox et al. 2011). Diese zweiten und dritten Peptide wurden in der Analyse jedoch nicht berücksichtigt. Weiterhin wurden Proteine, die von MaxQuant als potentielle Kontaminanten oder nur durch Vergleich mit der *reverse* Datenbasis identifiziert wurden, aus der Analyse ausgeschlossen (Bielow et al. 2016). Proteine, deren Zuordnung auf der Identifizierung von posttranslationalen Modifikationen beruhte, wurden in die Analyse eingeschlossen. Bis auf Proteine von Antikörperketten und das anionische Trypsin wurden zunächst alle übrigen in der Excel-Tabelle aufgelisteten Proteine in der Analyse berücksichtigt. Als Referenz der im *N. ischiadicus* von Ratten überhaupt exprimierten Proteine diente hier ein mRNA(*messenger RNA*)-Sequenzierungsdatensatz aus Ratten-Ischias-Nerven (Fledrich et al. 2012). Fand sich ein Protein in den MS-Daten, konnte aber nicht in den mRNA-Sequenzierungsdaten gefunden werden, wurde es aus der Analyse ausgeschlossen.

Die LFQ(*label-free-quantification*)-Intensität, die durch MaxQuant anhand der MS-Ergebnisse ermittelt wird, ist ein zuverlässiger Parameter, welcher der relativen Quantifizierung von *label*-freien Proteom-Experimenten dient (Cox et al. 2014). Um Proteine zu ermitteln, die in der spezifischen IP im Vergleich zur unspezifischen IP relativ angereichert wurden, wurden daher die gemessenen LFQ-Intensitäten der Proteine zueinander ins Verhältnis gesetzt. Hierfür wurden die LFQ-Intensitäten in der spezifischen IP durch die zugehörigen LFQ-Werte in der unspezifischen IP geteilt. Dabei kam es häufig vor, dass Proteine nur in der spezifischen Probe identifiziert wurden und der zugehörige LFQ-Wert in der unspezifischen IP null betrug. Da eine Quotienten-Bildung mit null mathematisch nicht definiert ist, wurde anstatt der null in diesen Fällen die nächstniedrigste Zehnerpotenz des niedrigsten LFQ-Werts der gesamten Messung (Detektionsgrenze) verwendet. Dieser Wert entsprach sowohl in den IPs mit

Proteinquervernetzung als auch in IPs ohne Proteinquervernetzung 10.000. Für die Proben ohne Proteinquervernetzung lagen je zwei technische und zwei biologische Replikate vor. Hierfür wurden zunächst die LFQ-Mittelwerte der technischen Replikate gebildet und dann diese Mittelwerte zueinander (spezifisch geteilt durch unspezifisch) ins Verhältnis gesetzt. Anschließend wurde aus den LFQ-Quotienten der beiden biologischen Replikate ein Mittelwert gebildet. Da es für die Proben mit Proteinquervernetzung nur je eine Trypsin- und Chymotrypsin-Messung gab, erfolgte hier keine weitere Mittelwertbildung. Anhand der so ermittelten relativen Anreicherungen der durch die MS identifizierten Proteine ließen sich Listen von potentiellen Interaktionspartnern von PMP22 erstellen, welche die am stärksten angereicherten Proteine enthielten. Weiterhin erfolgte eine Analyse der in beiden PMP22-IPs (mit und ohne Proteinquervernetzung) angereicherten Proteine anhand von GO-Terms (*gene ontology terms*), um die identifizierten Proteine einer biologischen (BP (*biological pathway*)) und molekularen Funktion (MF (*molecular function*)) sowie einem zellulären Kompartiment (CC (*cellular compartment*)) zuzuordnen. Hierfür diente die DAVID-Bioinformatik-Software (Huang et al. 2009a; Huang et al. 2009b) als Analysemittel. Als Hintergrund bzw. Referenz nutzte die genannte Software das zur jeweiligen Spezies zugehörige Genom (auf Grundlage der in Uniprot hinterlegten Genomdaten). In diesem Fall wurde folglich auf das Ratten-Genom normalisiert. Zuletzt wurden zur Detektion und Visualisierung von Übereinstimmungen in den potentiellen PMP22-Interaktionspartner-Listen die BioVenn-Applikation und hierdurch erstellte BioVenn-Diagramme (Hulsen et al. 2008) genutzt.

3 Ergebnisse

3.1 Vorversuche zur Proteinquervernetzung und Solubilisierung

Bevor IP-Experimente zur Identifikation der *In-vivo*-Interaktionspartner von PMP22 erfolgten, wurden Vorversuche zur Proteinquervernetzung von PMP22 und dessen Solubilisierung aus Homogenisaten von Ratten-Ischias-Nerven gemäß den Beschreibungen in den Kapiteln 2.4 und 2.6. durchgeführt. So sollte das geeignete Proteinquervernetzungsreagenz, das optimale Detergenz und die hiervon jeweils nötigen Konzentrationen für das Vorhaben dieser Arbeit ermittelt werden.

3.1.1 Proteinquervernetzung durch BS3 bildete PMP22-haltige hochmolekulare Spezies

Um den Einfluss der Proteinquervernetzung mit BS3 bzw. Glutaraldehyd auf PMP22 auf Proteinebene darzustellen, wurden Western Blots zum Nachweis von PMP22 durchgeführt.

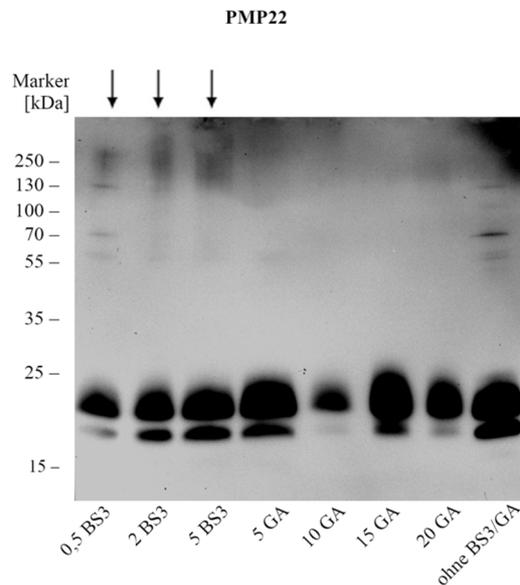


Abbildung 3.1: **Proteinquervernetzung mit BS3 und Glutaraldehyd:** Nachweis von PMP22 in proteinquervernetzten Homogenisaten von Ratten-Ischias-Nerven im Western Blot. Die Pfeile zeigen die hochmolekularen PMP22-haltigen Proteinspezies an. Von links nach rechts: BS3- und Glutaraldehyd-Titration mit Angabe der Menge an BS3 und Glutaraldehyd (GA) in mM. Die SDS-PAGE erfolgte mit Gradientengelen. Antikörper-Verdünnung siehe Tabelle 2.21

Die Abbildung 3.1 zeigt, dass durch Proteinquervernetzung mithilfe von BS3 hochmolekulare, > 100 kDa große Proteinspezies im Ratten-Ischias-Nerven-Homogenisat entstanden, die PMP22 enthielten. Das war insbesondere bei den Konzentrationen von 2 mM und 5 mM BS3 zu beobachten, während bei dem Einsatz von 0,5 mM BS3 außerdem umschriebene Signale auf Höhe zwischen 55 kDa und 70 kDa sowie > 130 kDa nachweisbar waren. Diese umschriebenen Signale (insbesondere bei 70 kDa) waren allerdings auch ohne BS3-Einsatz nachweisbar, sodass sie nicht als Produkt der PMP22-Proteinquervernetzung mit BS3 angenommen werden konnten. Neben den hochmolekularen PMP22-spezifischen Signalen waren bei der Verwendung von BS3 auch nach der Proteinquervernetzung PMP22-Protein-Monomere sowie eine etwas kleinere Bande mit geringerer Masse (18 kDa, nicht-glykosylierte monomere Spezies) zu sehen. Bei der Verwendung von Glutaraldehyd als Proteinquervernetzungsreagenz entstanden hingegen unabhängig von der Menge des eingesetzten Glutaraldehyds keine eindeutigen hochmolekularen PMP22-spezifischen Signale im Western Blot. Es zeigten sich lediglich die PMP22-Monomere auf Höhe von 22 kDa sowie – in unterschiedlicher Signalstärke – die etwas kleinere Bande mit geringerer Masse bei 18 kDa. Für die folgenden Solubilisierungsversuche nach Proteinquervernetzung des Ratten-Ischias-Nerven-Homogenisats wurde daher BS3 (mit einer Konzentration von 5 mM) als Proteinquervernetzungsreagenz verwendet.

3.1.2 Die verwendeten Detergenzien zeigten unterschiedliche Effektivität zur Solubilisierung von PMP22

Um die PMP22-Proteine sowohl nach erfolgter Proteinquervernetzung mit 5 mM BS3 als auch in den Proben ohne Proteinquervernetzung bestmöglich zu solubilisieren, wurden verschiedene Detergenzien wie in Kapitel 2.6 beschrieben in ihrer Effektivität verglichen. Hierbei zeigte sich anhand des PMP22-Nachweises im Western Blot, dass die verwendeten Detergenzien unter den gegebenen Versuchsbedingungen deutliche Unterschiede in ihrer Solubilisierungseffektivität für PMP22 aufwiesen. Insbesondere zeigten sich diese Unterschiede in Abhängigkeit von einer vorherigen Proteinquervernetzung.

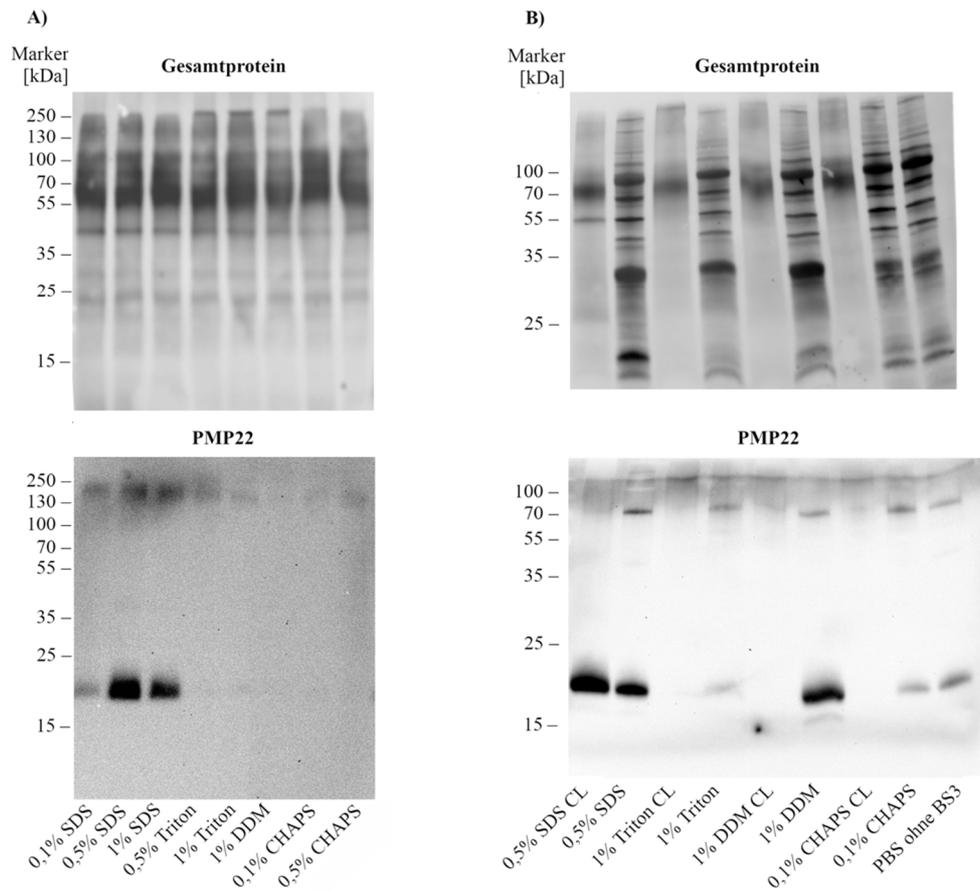


Abbildung 3.2: **Solubilisierung von PMP22 mit und ohne Proteinquervernetzung:** (A) Nachweis des Gesamtproteins (oben) und von PMP22 (unten) in mit 5 mM BS3 proteinquervernetzten Homogenisaten von Ratten-Ischias-Nerven nach Solubilisierung mit verschiedenen Detergenzien, die SDS-PAGE wurde mit einem Gradientengel durchgeführt. (B) Nachweis des Gesamtproteins (oben) und von PMP22 (unten) in proteinquervernetzten und nicht-proteinquervernetzten Homogenisaten von Ratten-Ischias-Nerven nach Solubilisierung mit verschiedenen Detergenzien. Die SDS-PAGE wurde mit einem 14% SDS-Gel durchgeführt. Angabe der Detergenzmenge am Solubilisierungspuffer in %. CL: Probe wurde proteinquervernetzt. Zusammensetzung des Solubilisierungspuffers siehe Tabelle 2.13. Antikörper-Verdünnung siehe Tabelle 2.21

Abbildung 3.2 (A) zeigt den PMP22-Nachweis im Western Blot in mit 5 mM BS3 proteinquervernetzten Proben. Es zeigte sich hierbei, dass lediglich bei der Verwendung von SDS zur Solubilisierung sowohl PMP22-Monomere als auch PMP22-haltige hochmolekulare Proteinspezies ausreichend solubilisiert wurden, sodass sie für den spezifischen Proteinnachweis mittels Western Blot verfügbar waren. Hierbei zeigte die Verwendung von 0,5% SDS-haltigem Solubilisierungspuffer im Vergleich zu 0,1% SDS und 1% SDS für die Solubilisierung das stärkste Signal. Die übrigen eingesetzten Detergenzien hatten

hingegen zur Solubilisierung von PMP22-Monomeren in den proteinquervernetzten Proben keinen im Western Blot nachweisbaren Effekt. Auch die Solubilisierung hochmolekularer PMP22-haltiger Proteinspezies erschien anhand des Western Blots gegen PMP22 nicht so effektiv wie die Solubilisierung mithilfe von SDS.

Abbildung 3.2 (B) zeigt den PMP22-Nachweis im Western Blot in proteinquervernetzten und nicht-proteinquervernetzten Proben, die mit unterschiedlichen Detergenzien solubilisiert wurden, jeweils im Vergleich. Da hier der Fokus auf dem Nachweis von PMP22-Monomeren lag, wurde ein 14% SDS-Gel eingesetzt, das die Darstellung hochmolekularer Proteinspezies erschwerte und somit die Beurteilung jener anhand dieses Experiments nicht erfolgen konnte. Wie schon in Abbildung 3.2 (A) zeigt auch die Abbildung 3.2 (B), dass die verwendeten nicht-ionischen Detergenzien keinen nachweisbaren Solubilisierungseffekt von PMP22-Monomeren in proteinquervernetzten Proben hatten. So war auch hier nur SDS dazu in der Lage, PMP22-Monomere aus Proben mit 5 mM BS3 herauszulösen, um sie dem Nachweis mittels Western Blot zugänglich zu machen. Im Gegensatz zu dem Ergebnis aus Abbildung 3.2 (A) wird in Abbildung 3.2 (B) der Unterschied zwischen proteinquervernetzten und nicht-proteinquervernetzten Proben deutlich. Alle nicht-proteinquervernetzten Proben (auch die in PBS gelöste Probe ohne Detergenz) zeigten ein spezifisches PMP22-Monomer-Signal im Western Blot. Beim Vergleich der Proben zeigte DDM (hier mit 1% Anteil am Solubilisierungspuffer) bei gleicher Proteinbeladung das deutlichste PMP22-Monomer-Signal im Western Blot. Es ist auch die kleinere PMP22-Bande (18 kDa) sichtbar. Es erschien weiterhin in diesen nicht-proteinquervernetzten Proben ein PMP22-spezifisches Signal auf Höhe von ca. 70 kDa, das in den proteinquervernetzten Proben fehlte. In der Zusammenschau zeigten die beschriebenen Ergebnisse SDS als wirksamstes Detergenz für die proteinquervernetzten Proben bzw. DDM für die nicht-proteinquervernetzten Proben.

3.1.3 Die Effektivität der Proteinquervernetzung stieg mit zunehmender BS3-Konzentration an

Um die optimale Menge des hier verwendeten Proteinquervernetzungsreagenz BS3 für die Proteinquervernetzung von PMP22 auch unter dem Gesichtspunkt der nun optimierten Solubilisierung für PMP22 zu ermitteln und um außerdem einen eventuellen Proteinverlust durch Bildung hochmolekularer, nicht solubilisierbarer Proteinverbände durch die Proteinquervernetzung zu erkennen, wurden die Ratten-Ischias-Nerven-Homogenisate

mit unterschiedlichen BS3-Konzentrationen vor und nach der Solubilisierung und anschließender Zentrifugation im Hinblick auf ihren PMP22-Gehalt im Western Blot verglichen.

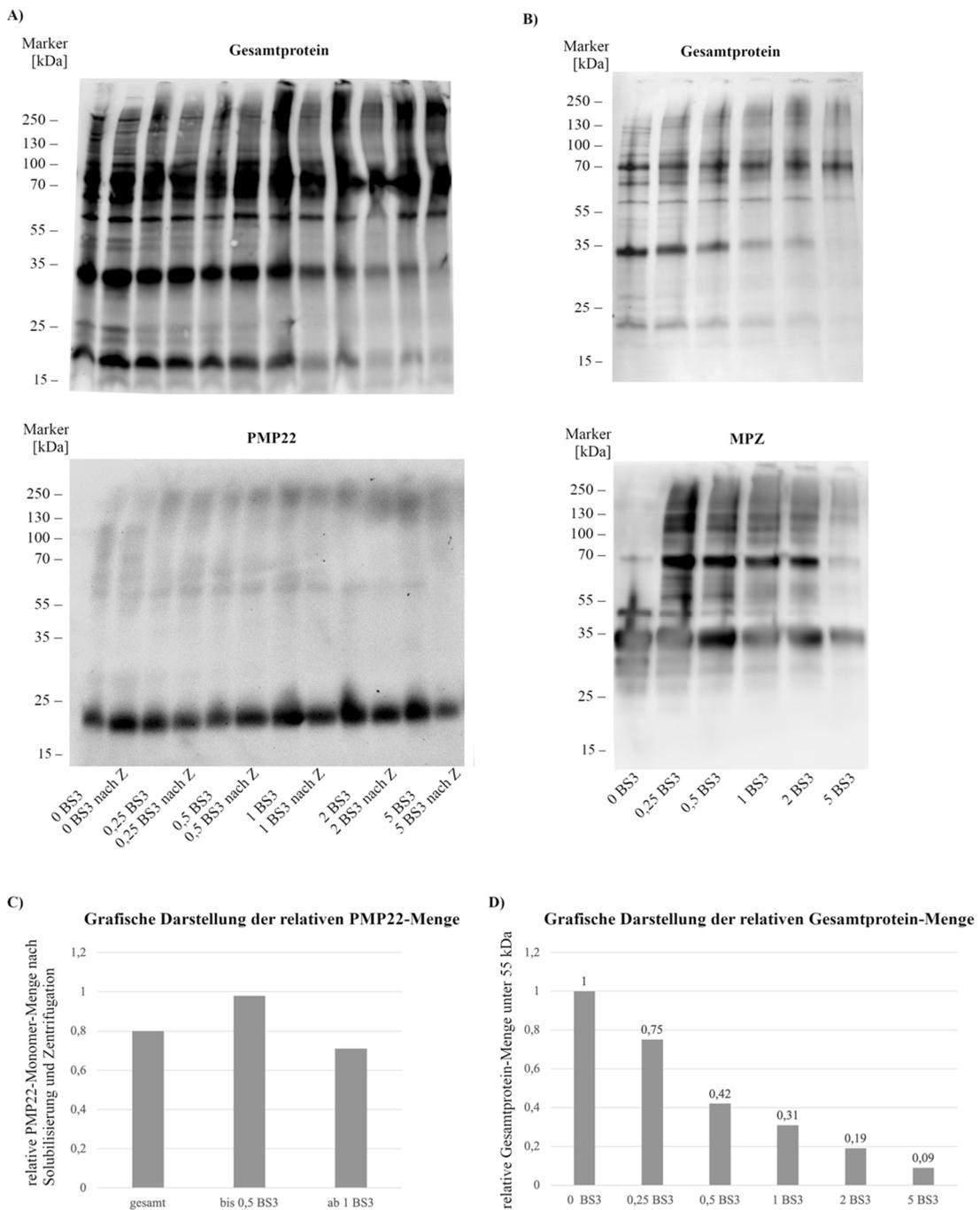


Abbildung 3.3: BS3-Titration vor und nach Solubilisierung: (A) Nachweis des Gesamtproteins (oben) und von PMP22 (unten) in proteinquervernetzten Homogenisaten von Ratten-Ischias-Nerven im Western Blot vor und nach Solubilisierung mit 0,5% SDS-haltigem Solubilisierungspuffer und anschließender Zentrifugation. (B) Nachweis des Gesamtproteins (oben) und von MPZ (unten) in proteinquervernetzten Homogenisaten von Ratten-Ischias-Nerven im Western Blot vor Solubilisierung. BS3-Titration mit Angabe der Menge an BS3 in mM jeweils vor Solubilisierung und nach Solubilisierung inklusive Zentrifugation

(nach Z). Diese SDS-PAGE erfolgte mit Gradientengelen. Antikörper-Verdünnung siehe Tabelle 2.21 (C) Grafische Darstellung der relativen PMP22-Monomer-Menge nach Solubilisierung und Zentrifugation. Die PMP22-Monomer-Menge ist zur jeweiligen PMP22-Monomer-Menge vor der Zentrifugation ins Verhältnis gesetzt (PMP22-Monomer-Menge nach Zentrifugation/ PMP22-Monomer-Menge vor Zentrifugation), sodass der PMP22-Monomer-Verlust durch die Zentrifugation ersichtlich wird. Verhältnis aus PMP22-Monomer-Menge vor und nach Zentrifugation insgesamt (gesamt), Verhältnis aus PMP22-Monomer-Menge vor und nach Zentrifugation bei Einsatz von 0,25 mM BS3 bzw. 0,5 mM BS3 (bis 0,5 BS), Verhältnis aus PMP22-Monomer-Menge vor und nach Zentrifugation bei Einsatz von 1 mM BS3, 2 mM BS3 und 5 mM BS3 (ab 1 BS3). (D) Grafische Darstellung der relativen Gesamtprotein-Menge unter 55 kDa bei Einsatz unterschiedlicher Mengen BS3 in mM zur Proteinquervernetzung. Die Gesamtprotein-Menge unter 55 kDa ohne BS3 wurde als Standard festgelegt (=1) und die übrigen Gesamtprotein-Mengen dazu ins Verhältnis gesetzt (Gesamtprotein-Menge unter 55 kDa bei Einsatz von 0,25 mM BS3, 0,5 mM BS3, 1 mM BS3, 2 mM BS3, 5 mM BS3 / Gesamtprotein-Menge unter 55 kDa bei Einsatz von 0 mM BS3). So wurde der Gesamtprotein-Mengen-Verlust von kleinen Proteinen (< 55 kDa) ersichtlich.

Abbildung 3.3 (A) zeigt, dass die Effektivität der Proteinquervernetzung mit steigender BS3-Konzentration zunahm: Je mehr BS3 zur Proteinquervernetzung eingesetzt wurde, desto mehr hochmolekulare PMP22-haltige Protein-Spezies entstanden. Weiterhin ist den Abbildung 3.3 (A) und (C) beim Vergleich der PMP22-Signale jeweils vor und nach Zentrifugation des Homogenisats bis zu einer BS3-Menge von 0,5 mM zu entnehmen, dass die Solubilisierung der Proteine mithilfe des 0,5% SDS-Probenpuffers so effektiv war, dass durch die Zentrifugation bei 16.000 g sehr wenig Proteinverlust entstand. Die PMP22-Monomer-Signale ab einer BS3-Konzentration von 1 mM BS3 zeigten hingegen eine geringere PMP22-Menge nach Zentrifugation als vor der Zentrifugation, was auf einen Verlust von PMP22-Monomeren durch die Zentrifugation hinweist. Auf die Darstellung des Protein-Pellets wurde aus Platzgründen auf dem SDS-Gel in diesem Experiment jedoch verzichtet.

Anschließend sollte der beschriebene Interaktionspartner von PMP22, MPZ (D'Urso et al. 1999; Hasse et al. 2004), im Western Blot nachgewiesen werden, um zu überprüfen, ob auch MPZ-Monomere durch BS3 proteinquervernetzt wurden. Die zugrundeliegende Annahme bestand darin, dass MPZ und PMP22 aufgrund ihrer Colokalisation durch BS3 kovalent miteinander verbunden werden sollten und so eine Mengentitration von BS3 auch anhand der Darstellung von MPZ-Monomeren zu beurteilen wäre. Tatsächlich wurde der Effekt der mengenabhängigen Proteinquervernetzung mit BS3 beim proteinbiochemischen Nachweis von MPZ und des Gesamtproteins aus dem Nerven-Homogenisat anschaulich.

Die Abbildung 3.3 (A) oben, (B) oben und (D) zeigen die Veränderungen der Gesamtprotein-Darstellung im Western Blot in Abhängigkeit von der eingesetzten Menge an BS3 im Homogenisat der Ratten-Ischias-Nerven. Mit zunehmender BS3-Konzentration nahm die Gesamtproteinmenge und hier v. a. die Menge an kleinen Proteinen (< 55 kDa) ab, was auf eine Proteinquervernetzung der kleinen Proteine zu größeren Proteinkomplexen schließen ließ.

Abbildung 3.3 (B) unten zeigt ein Fehlen von hochmolekularen MPZ-enthaltenden Proteinspezies bei Verwendung von 0 mM BS3, während diese mit Zugabe von BS3 nachweisbar wurden.

In der Zusammenschau erschien das Verhältnis zwischen Monomeren von PMP22 bzw. MPZ und den durch Proteinquervernetzung entstandenen hochmolekularen Proteinspezies bei einer Konzentration von 0,5 mM BS3 für die Fragestellung dieser Arbeit am günstigsten, da unter dieser Bedingung sowohl hochmolekulare Proteinspezies als auch MPZ-Monomere und PMP22-Monomere im Western Blot nachweisbar waren und das PMP22-Monomer-Signal nach der Zentrifugation nicht (deutlich) geringer ausfiel als vor der Zentrifugation. Daher wurde die Verwendung einer BS3-Konzentration von 0,5 mM zur Proteinquervernetzung von PMP22 für die folgenden IP-Experimente festgelegt.

3.2 Vorversuch zur Antikörperbindungseffektivität der Anti-PMP22-Antikörper

Nachdem die Bedingungen zur Proteinquervernetzung und Solubilisierung für PMP22 in Vorbereitung auf die IP-Experimente optimiert worden waren, wurden im Anschluss die in Tabelle 2.17 genannten, kommerziell erhältlichen Antikörper, die alle gegen den C-Terminus von PMP22 gerichtet sind, in ihrer Effektivität, PMP22 zu binden, mittels Western Blot miteinander verglichen. Hierzu wurde wie in Kapitel 2.8 beschrieben verfahren.

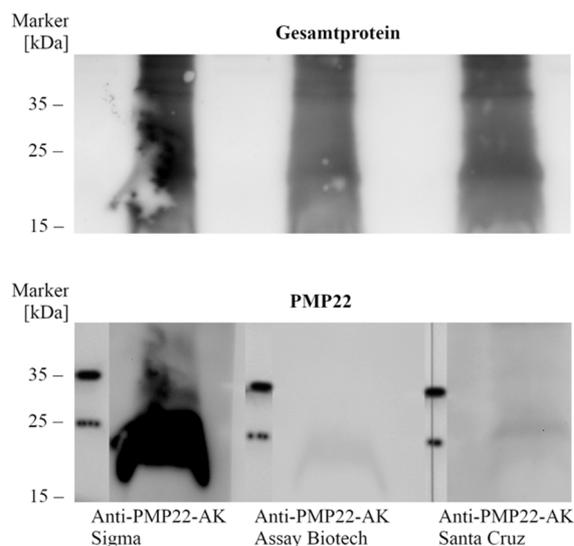


Abbildung 3.4: **Anti-PMP22-Antikörper-Effektivität im Western Blot:** Nachweis des Gesamtproteins (oben) und von PMP22 (unten) in Homogenisaten von Ratten-Ischias-Nerven ohne Proteinquervernetzung und nach Solubilisierung mit 1% DDM-Probenpuffer. Von links nach rechts: Anti-PMP22-Antikörper von Sigma-Aldrich (Sigma), Anti-PMP22-Antikörper von Assay Biotech und Anti-PMP22-Antikörper von Santa Cruz. Die SDS-PAGE erfolgte mit einem 12% SDS-Gel. Zusammensetzung des 1% DDM-Probenpuffers siehe Tabelle 2.13. Antikörperverdünnungen siehe Tabelle 2.21

Abbildung 3.4 zeigt, dass im Western Blot der Anti-PMP22-Antikörper von Sigma-Aldrich im Vergleich zum Anti-PMP22-Antikörper von Assay Biotech und dem von Santa Cruz das PMP22-Protein aus Ratten-Ischias-Nerven-Homogenisaten unter gleichen Versuchsbedingungen und gleicher Protein-Beladung (siehe Gesamtproteindarstellung) das stärkste Signal für PMP22-Monomere erzeugt. Weiterhin erschienen keine weiteren Signale auf anderen Höhen bei Verwendung dieses Antikörpers im Western Blot, die auf unspezifische Bindungen des Antikörpers an andere Proteine hätten schließen lassen. Für die folgenden IP-Experimente wurde aufgrund der Bindungseffektivität und Spezifität daher der Anti-PMP22-Antikörper von Sigma eingesetzt.

3.3 Der erste Immunpräzipitationsversuch mit BS3 zeigte kein PMP22-spezifisches Signal im Western Blot

Nachdem die Vorversuche zur Proteinquervernetzung und Solubilisierung sowie zur Antikörpereffektivität abgeschlossen waren, wurde als nächstes der erste IP-Versuch zur Präzipitation von PMP22 und dessen potentiellen Interaktionspartnern durchgeführt. Das Ratten-Ischias-Nerven-Homogenisat wurde – wie Kapitel 2.4 und 2.6 zu entnehmen – zur

Vorbereitung auf die IP mit 0,5 mM BS3 proteinquervernetzt und dann mit 0,5% SDS-Probenpuffer solubiliziert. Es wurde dann der in Kapitel 2.11 beschriebenen IP zugeführt. Hier wurde der *Input* gemäß den Beschreibungen in Kapitel 2.11.3 und 2.11.4 mit Kaninchen-IgGs und leeren Protein-G-gekoppelten *Dynabeads* geklärt.

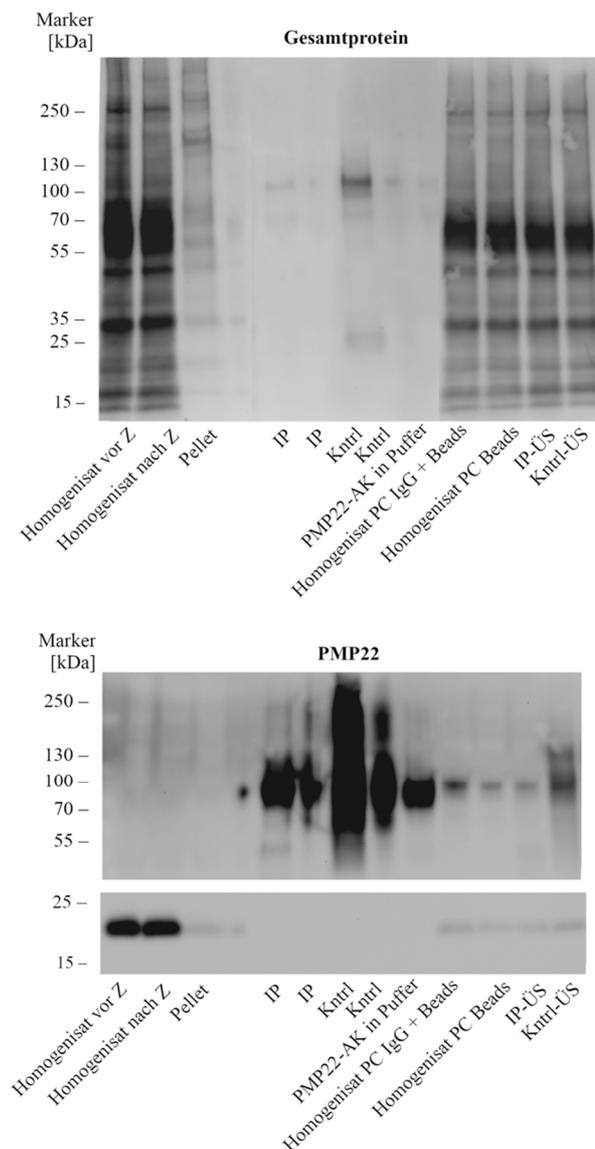


Abbildung 3.5: **PMP22-IP mit Proteinquervernetzung:** Nachweis des Gesamtproteins (oben) und von PMP22 (unten) vor und nach IP in Homogenisaten von Ratten-Ischias-Nerven nach Proteinquervernetzung mit 0,5 mM BS3 und Solubilisierung mit 0,5% SDS-Probenpuffer im Western Blot. Von links nach rechts: Homogenisat vor Z: Homogenisat vor Solubilisierung und Zentrifugation; Homogenisat nach Z: Homogenisat nach Solubilisierung und Zentrifugation; Pellet: Pellet nach Zentrifugation; IP: spezifische IP mit PMP22-Antikörper; Kntrl: unspezifische IP-Kontrolle mit Kaninchen-IgGs; PMP22-AK in Puffer: Anti-PMP22-Antikörper (Sigma) in IP-Puffer; Homogenisat PC IgG + Beads: Homogenisat nach Klärung mit Kaninchen-IgGs und *Dynabeads*; Homogenisat PC Beads: Homogenisat nach Klärung nur mit *Dynabeads*; IP-ÜS: Überstand der spezifischen IP nach Trennung von den *Dynabeads*; Kntrl-ÜS: Überstand der unspezifischen IP nach Trennung von den *Dynabeads*. Die spezifischen und unspezifischen

IP-Signale kommen doppelt hintereinander zur Darstellung, da bei Beladung des Gradientengels die Proben unzureichend in die Taschen abgesunken sind und die rechts daneben liegende Tasche so mitbefüllt wurde. Die SDS-PAGE erfolgten mit Gradientengelen. Zusammensetzung IP-Puffer siehe Tabelle 2.14. Antikörper-Verdünnung siehe Tabelle 2.21

In der Abbildung 3.5 ist das Ergebnis des ersten PMP22-IP-Versuchs dargestellt. Der Proteinnachweis von PMP22 im Western Blot zeigte kein PMP22-Signal in der spezifischen, mit dem Anti-PMP22-Antikörper durchgeführten IP. Auffällig war allerdings ein deutlich stärkeres Antikörper-Ketten-spezifisches Signal in der Negativkontrolle der Kaninchen-IgGs als in der spezifischen IP gegen PMP22, obwohl den Herstellerangaben der Antikörper-Produzenten folgend gleiche Mengen an Antikörpern in der spezifischen und unspezifischen IP eingesetzt worden waren. Weiterhin zeigte die FAST-Green-Färbung des Western Blots, dass die mit Kaninchen-IgGs und *Dynabeads* geklärten Homogenisate in ihrer Proteinmenge und Verteilung der Proteinbanden den Überständen nach der Präzipitation der Antigen-Antikörper-*Dynabeads*-Komplexe vom Überstand ähnelten. Dabei schien die Klärung mit Kaninchen-IgGs im Vergleich zur alleinigen Homogenisatklärung mit *Dynabeads* keinen Unterschied zu erzeugen. Zudem enthielt das mit den *Dynabeads* geklärte Homogenisat deutlich weniger Gesamtprotein und PMP22-Monomere als das Homogenisat nach Zentrifugation. Diese Beobachtungen ließen auf einen durch die *Dynabeads*-Inkubation bedingten Proteinverlust im Ratten-Ischias-Nerven-Homogenisat schließen. Bei der Betrachtung des Protein-Pellets in der FAST-Green-Färbung fiel eine deutlich geringere Protein-Gesamtmenge als im Homogenisat nach Zentrifugation der Probe auf, was eine effektive Solubilisierung und einen geringen Proteinverlust durch die Zentrifugation des Homogenisats nahelegte.

3.4 Optimierung der Versuchsbedingungen für die Immunopräzipitation von PMP22

Aufgrund der im Kapitel 3.3 beschriebenen Ergebnisse bezüglich der eingesetzten Antikörper-Mengen und der durch die Inkubation mit den *Dynabeads* bedingten Verringerung der PMP22-Monomere und der Gesamtproteinmenge im Western Blot bzw. in der FAST-Green-Darstellung wurden die folgenden Experimente zur Optimierung der Versuchsbedingungen für die IP von PMP22 durchgeführt.

3.4.1 Der Anti-PMP22-Antikörper von Sigma und die Kaninchen-IgGs mussten in unterschiedlichen Mengen in der Immunopräzipitation eingesetzt werden

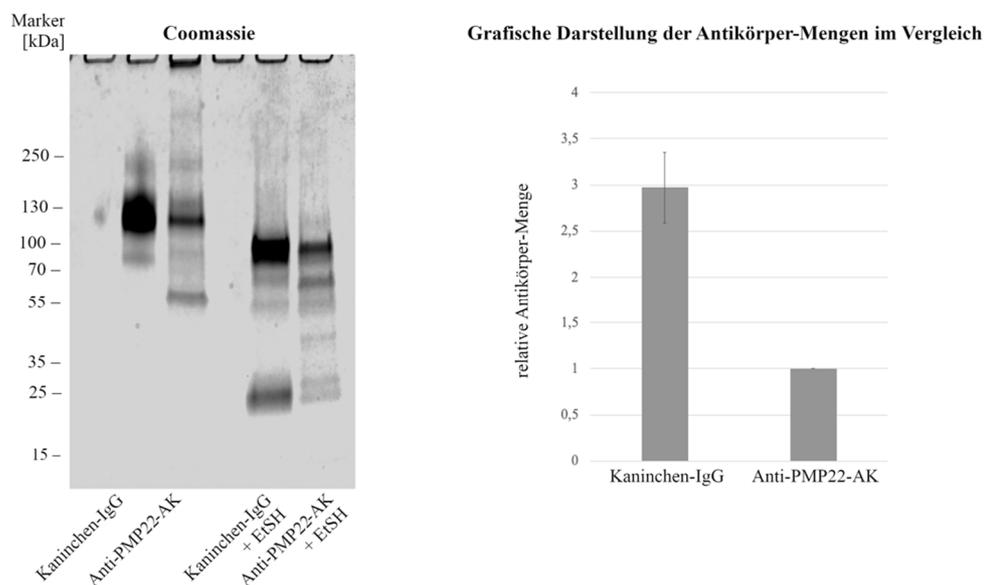


Abbildung 3.6: **Mengenvergleich des Anti-PMP22-Antikörpers und der Kaninchen-IgGs:** Coomassie-Gel-Färbung der Kaninchen-IgGs (Dianova) und des Anti-PMP22-Antikörpers (Sigma-Aldrich) unter nicht reduzierenden und unter reduzierenden Bedingungen (links). Von links nach rechts: Kaninchen-IgG: Kaninchen-IgGs (Dianova); Anti-PMP22-AK: Anti-PMP22-Antikörper (Sigma-Aldrich); Kaninchen-IgG + EtSH: Kaninchen-IgGs (Dianova) mit 1% EtSH; Anti-PMP22-AK + EtSH: Anti-PMP22-Antikörper (Sigma-Aldrich) mit 1% EtSH. Grafische Darstellung der relativen Proteinmengenunterschiede der jeweiligen Antikörper im Säulendiagramm (rechts): Antikörper-Menge im Anti-PMP22-Antikörper von Sigma =1, Kaninchen-IgG-Menge als Vielfaches der Anti-PMP22-Antikörper-Menge, der Fehlerbalken zeigt die Standardabweichung der Mittelwerte für die Antikörper-Mengen unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen an. Die SDS-PAGE erfolgte mit einem 12% SDS-Gel.

Abbildung 3.6 zeigt die Coomassie-Gel-Färbung (Durchführung siehe Kapitel 2.9), die der Analyse des Proteingehalts des Anti-PMP22-Antikörpers von Sigma-Aldrich im Vergleich zu dem Proteingehalt der für die IP als Negativkontrolle verwendeten Kaninchen-IgGs diente. Hierbei zeigte sich, dass bei vermeintlich gleicher Proteinbeladung, nämlich den Herstellerangaben von Sigma und Dianova folgend, unterschiedliche Protein-Gesamtmenen in der Coomassie-Gel-Färbung erschienen. Der mathematische Vergleich der Antikörper-Signale im Coomassie-Gel ergab, dass der Anti-PMP22-Antikörper von Sigma um den Faktor 2,91 mehr eingesetzt werden musste als die Kaninchen-IgGs, um dem IP-Input die gleiche Menge an Antikörper-Proteinen zuzuführen.

Weiterhin zeigt Abbildung 3.6 den Einfluss von EtSH auf die Darstellung der Antikörperketten im Western Blot. Hierbei zeigte sich, dass durch Hinzufügen des Reduktionsmittels erwartungsgemäß eine zusätzliche Proteinbande auf Höhe von ca. 25 kDa entstand. Daher wurde in den folgenden IP-Versuchen, in denen PMP22 aus proteinquervernetzten Proben immunopräzipitiert wurde, kein reduzierendes EtSH (oder DTT) eingesetzt. So sollte sichergestellt werden, dass die PMP22-Monomer-Bande auf Höhe von 22 kDa erkennbar blieb und nicht durch ein zusätzliches Antikörpersignal bei 25 kDa maskiert wurde.

3.4.2 Die Inkubation mit Protein-G-gekoppelten *Dynabeads* führte zu einer mengenabhängigen Reduktion der Proteinmenge

Es wurde eine Mengentitration der Protein-G-gekoppelten *Dynabeads* durchgeführt, um das mengenabhängige Bindungsverhalten der *Dynabeads* im Ratten-Ischias-Nerven-Homogenisat zu analysieren. Das sollte einen möglichen Proteinverlust durch die *Dynabeads*-Klärung ermitteln und der Optimierung des *Dynabeads*-Einsatzes in den folgenden IP-Experimenten dienen. Hierzu wurde wie in Kapitel 2.10 beschrieben vorgegangen.

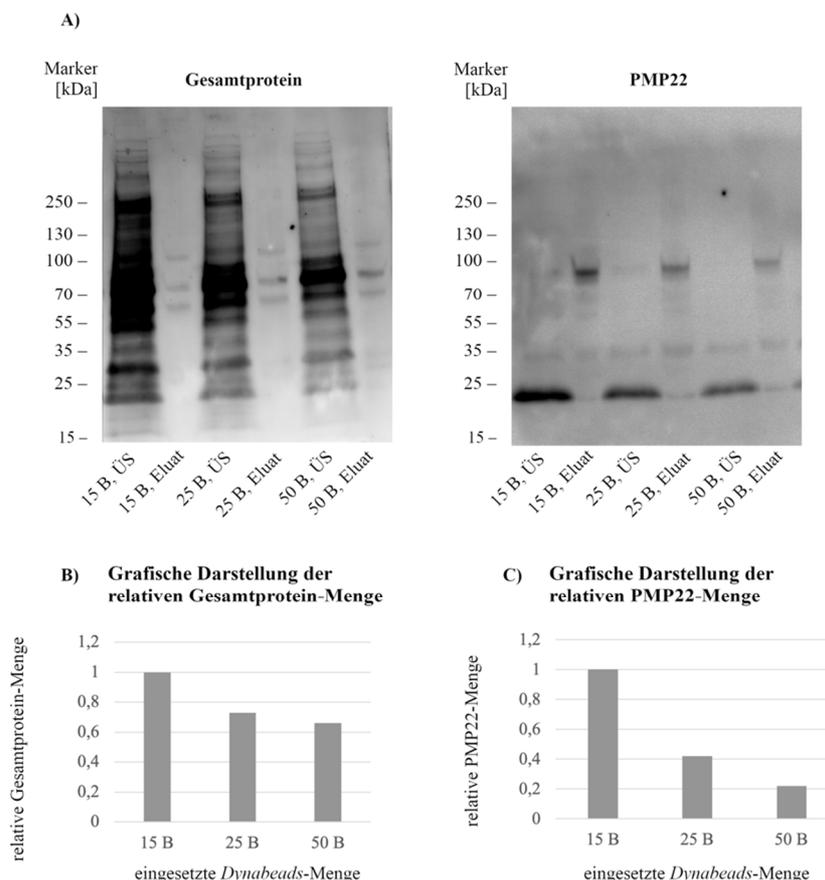


Abbildung 3.7: **Protein-G-gekoppelte Dynabeads-Titration:** (A) Nachweis des Gesamtproteins sowie von PMP22 in Homogenisaten von Ratten-Ischias-Nerven ohne Proteinquervernetzung und nach Solubilisierung mit 1% DDM-Probenpuffer im Western Blot. Links: Gesamtprotein mit FAST-Green, rechts: PMP22. B: *Dynabeads* inklusive Angabe der mit jeweils 70 μ l Homogenisat inkubierten *Dynabeads*-Menge in μ l; ÜS: Überstand des Homogenisats nach Trennung von den *Dynabeads*; Eluat: Eluat der jeweiligen Menge an *Dynabeads*. Die SDS-PAGE erfolgte mit einem 12% SDS-Gel. Zusammensetzung des 1% DDM-Probenpuffer siehe Tabelle 2.13. Antikörperverdünnung siehe Tabelle 2.21. (B) Grafische Darstellung der relativen Gesamtprotein-Menge nach Inkubation mit unterschiedlichen Mengen an *Dynabeads*. Da nur die relativen Unterschiede in der Gesamtprotein-Menge zwischen den eingesetzten *Dynabeads*-Mengen ersichtlich werden sollten, wurde die Gesamtprotein-Menge nach Inkubation mit 15 μ l *Dynabeads* (15 B) als Standard festgelegt und die Gesamtprotein-Mengen nach Inkubation mit 25 μ l *Dynabeads* (25 B) bzw. 50 μ l *Dynabeads* (50 B) hierzu ins Verhältnis gesetzt (Gesamtprotein-Menge nach Inkubation mit 25 μ l bzw. 50 μ l *Dynabeads* / Gesamtprotein-Menge nach Inkubation mit 15 μ l *Dynabeads*). (C) Grafische Darstellung der relativen PMP22-Menge nach Inkubation mit unterschiedlichen Mengen an *Dynabeads*. Da nur die relativen Unterschiede in der PMP22-Menge zwischen den eingesetzten *Dynabeads*-Mengen ersichtlich werden sollten, wurde die PMP22-Menge nach Inkubation mit 15 μ l *Dynabeads* (15 B) als Standard festgelegt und die PMP22-Mengen nach Inkubation mit 25 μ l *Dynabeads* (25 B) bzw. 50 μ l *Dynabeads* (50 B) hierzu ins Verhältnis gesetzt (PMP22-Menge nach Inkubation mit 25 μ l bzw. 50 μ l *Dynabeads* / PMP22-Menge nach Inkubation mit 15 μ l *Dynabeads*).

Abbildung 3.7 (A) (links) zeigt die FAST-Green-Färbung der Western-Blot-Membran zur Darstellung der Gesamtprotein-Menge und -Verteilung. Abbildung 3.7 (C) zeigt weiterhin die grafische Darstellung der Gesamtprotein-Menge in Abhängigkeit von der eingesetzten Menge an *Dynabeads*. Beide Ergebnisse zeigten: Je größer die Menge an *Dynabeads*, die mit dem Homogenisat inkubiert wurden, war, desto weniger Gesamtprotein blieb nach der Trennung von den *Dynabeads* im Überstand übrig. So waren nach Inkubation mit 50 μ l *Dynabeads* nur noch 66% der Proteine insgesamt vorhanden, welche nach Inkubation mit 15 μ l *Dynabeads* noch nachweisbar waren. Abbildung 3.7 (A) (rechts) zeigt den Nachweis von PMP22 im Western Blot und Abbildung 3.7 (C) die zugehörige grafische Darstellung der PMP22-Menge. Diese zeigten eine Abnahme der Menge an PMP22-Monomeren mit Zunahme der mit dem Homogenisat inkubierten *Dynabeads*-Menge, sodass von einem PMP22-Monomer-Verlust durch steigende Konzentrationen der *Dynabeads*-Inkubation ausgegangen wurde. Allerdings erschienen die im Überstand fehlenden PMP22-Monomere anhand des Western Blots gegen PMP22 nicht im Eluat der *Dynabeads*. Dem Verbleib der Proteine nach Inkubation mit den *Dynabeads* wurde in dieser Arbeit nicht weiter nachgegangen. Aufgrund der hier beschriebenen Beobachtungen wurden im folgenden IP-Versuch für die proteinquer-

vernetzten Proben die verwendeten *Dynabeads* mit dem *IP-Input* gemäß der Beschreibung in Kapitel 2.11.2 abgesättigt, um die unspezifischen Protein-*Dynabeads*-Bindungen vor dem IP-Bindungsschritt zu provozieren und sie so im darauffolgenden IP-Schritt zu minimieren. So sollte die Menge an PMP22 nicht durch eine vorherige Klärung mit den *Dynabeads* reduziert werden, aber trotzdem die unspezifischen Bindungen an die *Dynabeads* während der IP minimiert werden. Die mit unspezifischen Bindungen aus dem mit Ratten-Ischias-Nerven-Homogenisat abgesättigten *Dynabeads* wurden dann in der IP zur Präzipitation der PMP22-Antikörper-Komplexe eingesetzt.

3.5 Die optimierte Immunpräzipitation mit BS3 zeigte ein spezifisches PMP22- und ein spezifisches MPZ-Signal im Western Blot

Nach Optimierung der Versuchsbedingungen, die im Kapitel 3.4 beschrieben sind, wurde erneut eine IP von PMP22 aus dem Ratten-Ischias-Nerven-Homogenisat gemäß dem Vorgehen aus Kapitel 2.11 durchgeführt. Zur Vorbereitung wurde das Homogenisat, wie bereits beschrieben, mit 0,5 mM BS3 proteinquervernetzt und mit 0,5% SDS-haltigem Solubilisierungspuffer gelöst. Außerdem erfolgte eine Absättigung der *Dynabeads* im Homogenisat, die zur Präzipitation der Antigen-Antikörper-Komplexe verwendet wurden.

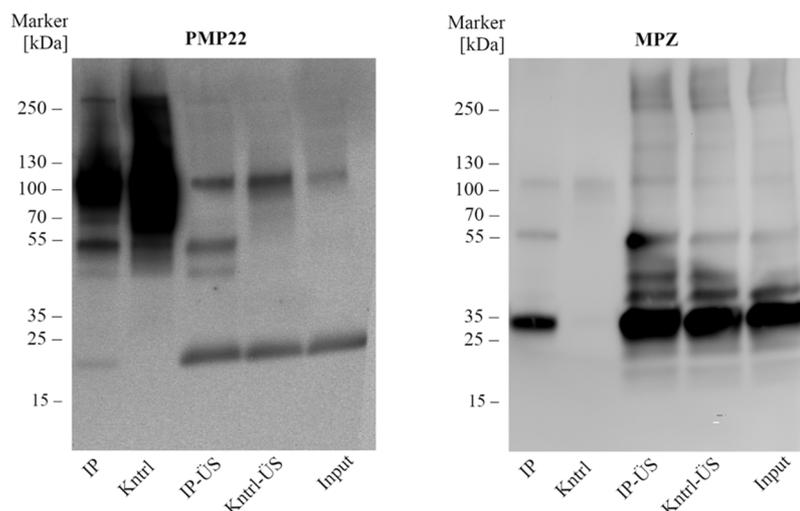


Abbildung 3.8: **PMP22-IP mit Proteinquervernetzung nach Optimierung der Versuchsbedingungen:** Nachweis von PMP22 (links) und MPZ (rechts) nach IP von PMP22 aus Homogenisaten von Ratten-Ischias-Nerven nach Proteinquervernetzung mit 0,5 mM BS3 und Solubilisierung mit 0,5% SDS-

Probenpuffer. IP: spezifische IP mit PMP22-Antikörper, Kntrl: unspezifische IP-Kontrolle mit Kaninchen-IgGs, IP-ÜS: Überstand der spezifischen IP nach Trennung von den *Dynabeads*, Kntrl-ÜS: Überstand der unspezifischen IP nach Trennung von den *Dynabeads*. Die SDS-PAGE erfolgte mit Gradientengel. Antikörper-Verdünnung siehe Tabelle 2.21

Abbildung 3.8 zeigt das Ergebnis des zweiten IP-Experiments: Der spezifische Proteinachweis von PMP22 im Western Blot zeigte ein PMP22-spezifisches Signal in der mit dem Anti-PMP22-Antikörper durchgeführten IP, während dieses Signal in der Negativkontrolle der Kaninchen-IgGs fehlte. Weiterhin erschien die Menge an eingesetzten PMP22-Antikörpern und Kaninchen-IgGs nun ähnlicher. Abbildung 3.8 (rechts) zeigt den Nachweis von MPZ im Western Blot in der spezifischen, mit dem Anti-PMP22-Antikörper durchgeführten IP. MPZ war hier in der Negativkontrolle der Kaninchen-IgGs nicht nachweisbar, was für eine spezifische Anreicherung von MPZ durch die PMP22-IP sprach. Weiterhin war anhand von Abbildung 3.8 (links) zu erkennen, dass auch PMP22-Monomere vom Anti-PMP22-Antikörper-*Dynabeads*-Komplex ungebunden blieben, da im IP-Überstand nach Trennung von den *Dynabeads*-Antigen-Antikörper-Komplexen ein deutliches PMP22-Monomer-Signal im Western Blot entstand. Auch der Western Blot gegen MPZ zeigte ein stärkeres MPZ-Signal im IP-Überstand als in der spezifischen PMP22-IP.

3.6 Die Immunopräzipitationen von PMP22 ohne BS3 zeigten unterschiedliche Ergebnisse

Es wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht nur PMP22-IPs mit Proteinquervernetzung, sondern auch PMP22-IPs ohne vorherige Proteinquervernetzung durchgeführt, um sowohl Unterschiede als auch Überschneidungen in dem mittels PMP22-IP und anschließender MS identifizierten Interaktom von PMP22 zu bestimmen. So sollte zum einen die Wahrscheinlichkeit erhöht werden, tatsächlich Interaktionspartner von PMP22 zu identifizieren (indem Proteine berücksichtigt wurden, die in beiden IP-Eluaten vorkamen) und zum anderen der Einfluss der Proteinquervernetzung auf die Identifizierung von Interaktionspartnern von PMP22 mittels IP und MS gezeigt werden. Es erfolgten daher nach Optimierung der Versuchsbedingungen für die PMP22-IP mit BS3 nun PMP22-IPs ohne Proteinquervernetzung aus Ratten-Ischias-Nerven-Homogenisaten anhand von zwei unterschiedlichen Protokollen. Eins der beiden IP-Protokolle entsprach dem IP-Protokoll, das für die proteinquervernetzten Proben etabliert worden war (ohne

den Proteinquervernetzungsschritt). Das andere Vorgehen war an ein klassisches IP-Protokoll angelehnt und ist in Kapiteln 2.3, 2.5, 2.11 und hier genauer in 2.11.3 und 2.11.4 methodisch beschrieben. Ein entscheidender Unterschied im Vorgehen war bei der zweiten Variante im Vergleich zu den übrigen durchgeführten IP-Versuchen die Aufbereitung der verwendeten Ratten-Ischias-Nerven. Diese wurden in diesem Fall nicht kryogen gemörsert, sondern in Saccharose-Probenpuffer mittels *Precellyse* lysiert. Die an die Lyse anschließende Solubilisierung der Proben erfolgte bei RT für 1,5 h, an die sich die Zentrifugation mittels Ultrazentrifuge (100.000 g für 30 min) anschloss. Der Überstand wurde dann dem IP-Vorgehen gemäß den Beschreibungen in Kapitel 2.11 zugeführt. In beiden Protokollen diente – den Ergebnissen von Kapitel 3.1.2 folgend – DDM als Detergenz zur Solubilisierung von PMP22 ohne den Zusatz von SDS.

Abbildung 3.9 zeigt das Ergebnis der beiden PMP22-IP-Prozedere ohne Proteinquervernetzung im Vergleich. Der spezifische Proteinnachweis von PMP22 zeigte in Abbildung 3.9 (A) kein IP-spezifisches Signal, während in den Überständen der spezifischen und der unspezifischen IP mittels Kaninchen-IgGs PMP22-Monomere weiterhin nachweisbar waren. Der *IP-Input* erzeugte ein ähnlich starkes PMP22-spezifisches Signal wie der IP-Überstand. Der für die proteinquervernetzten Proben im Rahmen dieser Arbeit optimierte Versuchsablauf zeigte somit in der analog durchgeführten IP ohne Proteinquervernetzung kein spezifisches IP-Signal und daher keine erfolgreiche PMP22-IP. Abbildung 3.9 (B) zeigt das Ergebnis des IP-Versuchs, welcher anhand des zweiten Protokolls durchgeführt wurde. Es war hier ein PMP22-spezifisches Signal in der spezifischen IP erkennbar, das in der Negativ-Kontrolle der Kaninchen-IgGs fehlte. Auch hier blieben PMP22-Monomere im Überstand erkennbar.

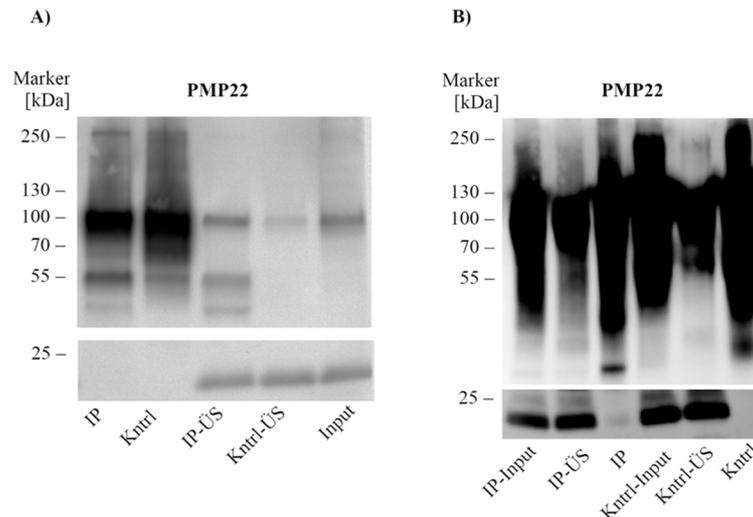


Abbildung 3.9: **PMP22-IPs ohne vorherige Proteinquervernetzung:** (A) Nachweis von PMP22 nach IP aus Ratten-Ischias-Nerven-Homogenisat mit abgesättigten *Dynabeads*. Die Homogenisierung erfolgte durch kryogenes Mörsern. Die Solubilisierung erfolgte mittels 1% DDM-Probenpuffer (Zusammensetzung siehe Tabelle 2.13). Die Proben wurden nicht proteinquervernetzt. (B) Nachweis von PMP22 nach IP aus Homogenisat von Ratten-Ischias-Nerven nach Klärung des Homogenisats mit Kaninchen-IgGs und *Dynabeads*. Die Homogenisierung erfolgte mittels *Precellyse* in Saccharose-Probenpuffer (Zusammensetzung siehe Tabelle 2.13). Die Solubilisierung erfolgte mit Saccharose-DDM-IP-Puffer (Zusammensetzung siehe Tabelle 2.14). Die Proben wurden nicht proteinquervernetzt. Diese Abbildung wurde von David Ewers und Beate Veith freundlicherweise für die Verwendung in dieser Arbeit zur Verfügung gestellt. Die SDS-PAGE erfolgten mit Gradientengelen. IP: spezifische IP mit PMP22-Antikörper, Kntnl: unspezifische IP-Kontrolle mit Kaninchen-IgGs, IP-ÜS: Überstand der spezifischen IP nach Trennung von den *Dynabeads*, Kntnl-ÜS: Überstand der unspezifischen IP nach Trennung von den *Dynabeads*. Antikörper-Verdünnung siehe Tabelle 2.21

3.7 In beiden Immunpräzipitationsverfahren, mit und ohne Proteinquervernetzung, wurden mittels Massenspektrometrie spezifisch angereicherte Proteine identifiziert

Das Eluat von den erfolgreich durchgeführten IPs von PMP22 (mit bzw. ohne Proteinquervernetzung, siehe Abbildung 3.8 und Abbildung 3.9 (B)) wurde im Rahmen der oben genannten Kollaboration im Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie in Göttingen massenspektrometrisch vermessen, um die im IP-Eluat spezifisch angereicherten Proteine als potentielle Interaktionspartner von PMP22 zu identifizieren. Die Visualisierung und Analyse der daraus generierten MS-Daten mithilfe der MaxQuant-Software und im Falle der proteinquervernetzten Proben weiterhin mithilfe der pLink2-Software wurden

im Rahmen der Kollaboration durchgeführt. Die Auswertung der dabei generierten Proteinendarstellungen in Excel-Dateien erfolgte dann anhand der Beschreibungen in Kapitel 2.12.2. Es wurden so in der PMP22-IP mit Proteinquervernetzung 318 Proteine und in der PMP22-IP ohne Proteinquervernetzung 315 Proteine identifiziert, die spezifisch angereichert worden waren. Die Häufigkeit der Proteine im spezifischen IP-Eluat wurde dann zur Häufigkeit in der unspezifischen IP-Kontrolle ins Verhältnis gesetzt und so die am stärksten spezifisch angereicherten Proteine jeweils für die PMP22-IP mit und ohne Proteinquervernetzung bestimmt. Die zugrundeliegende Annahme dieses Vorgehens war, dass stärker angereicherte Proteine eher für eine tatsächliche Interaktion mit PMP22 in Frage kamen als weniger stark angereicherte Proteine. Die Abbildung 3.10 und Abbildung 3.11 zeigen die so identifizierten 30 häufigsten massenspektrometrisch erkannten Proteine sowie die Verteilung von nach Trypsin- bzw. Chymotrypsin-Verdau identifizierten Proteinen. Die Proteine wurden in der Liste absteigend in Abhängigkeit von ihrer relativen Anreicherung sortiert, sodass das Protein mit der größten relativen Anreicherung an erster Stelle erschien.

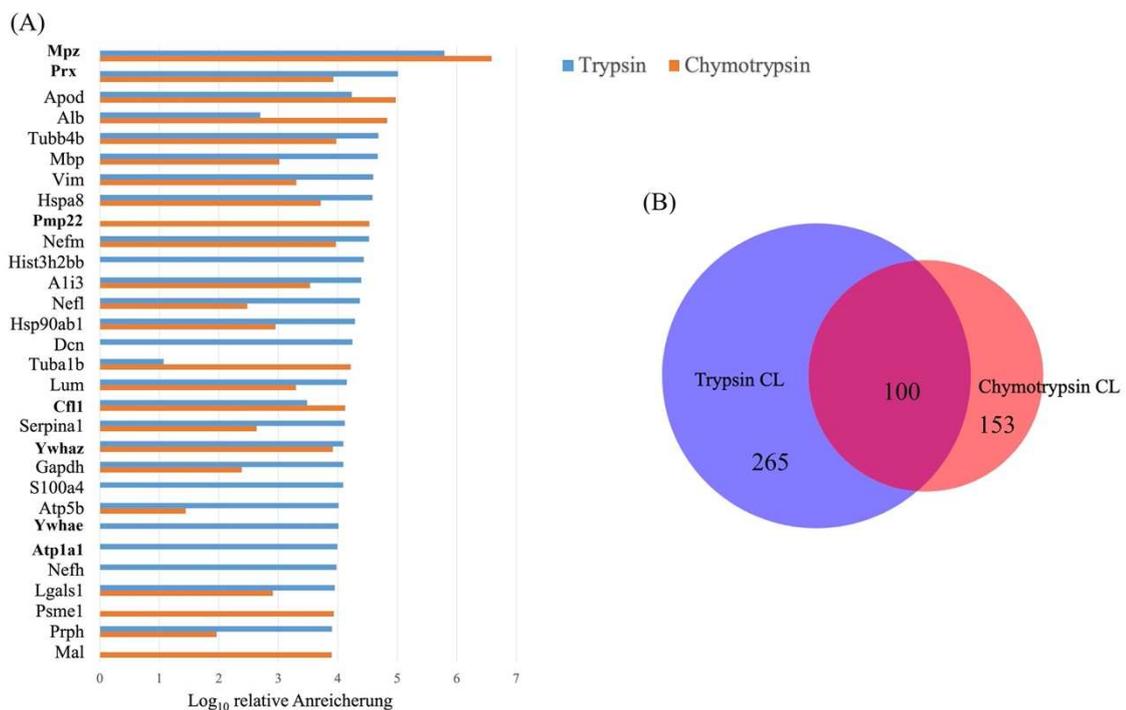


Abbildung 3.10: **MS-Ergebnis der PMP22-IP mit Proteinquervernetzung:** (A) Gennamen-Liste der 30 stärksten angereicherten Proteine in absteigender Reihenfolge (Abkürzungen siehe Ende der Legende) mit Angabe des Anreicherungsquotienten (spezifische Anreicherung / unspezifische Anreicherung) als Log₁₀. Blau: Log₁₀ des Anreicherungsquotienten nach Trypsin-Verdau, orange: Log₁₀ des Anreicherungsquotienten nach Chymotrypsin-Verdau. PMP22 und die in Kapitel 4.4 diskutierten potentiellen Interaktionspartner von PMP22 sind fett markiert. (B) Venn-Diagramm zur Darstellung der nach Trypsin- und Chymotrypsin-

Verdau mittels MS detektierten, spezifisch angereicherten Proteine inklusive Angabe der absoluten Anzahl. Blau: Trypsin-Verdau mit Detektion insgesamt 265 spezifisch angereicherter Proteine, rot: Chymotrypsin-Verdau mit Detektion insgesamt 153 spezifisch angereicherter Proteine. Die Überschneidung der Kreise zeigt 100 Proteine an, die in beiden Messrunden als spezifisch angereichert detektiert wurden. CL: mit Proteinquervernetzung. n=1. Aus Lesbarkeitsgründen wurde hier auf die kursive Schreibweise der Gennamen (Ratte) verzichtet.

Wie der Abbildung 3.10 zu entnehmen ist, erschien MPZ, der beschriebene Interaktionspartner von PMP22, im spezifischen IP-Eluat der PMP22-IP mit BS3 am häufigsten, gefolgt von PRX (Periaxin) und ApoD (Apolipoprotein D). Das Zielprotein, PMP22, wurde als neunt-häufigstes Protein und erwartungsgemäß ausschließlich nach Chymotrypsin-Verdau identifiziert. Neben vielen Myelin- und Zytoskelett-Proteinen (wie Tubulinen und Neurofilamenten) wurden 14-3-3-Proteine, Proteine des Energiestoffwechsels (insbesondere ATP1A1 (α -1-Untereinheit der Na^+/K^+ -ATPase)) und EZM(extrazelluläre Matrix)-Proteine sowie Linker-Proteine zwischen EZM und Zytoskelett (z.B. LUM (Lumican)) spezifisch angereichert. Außerdem wurde das Aktin-bindende Protein CFLN1 (Cofilin-1) detektiert. Zudem fanden sich Histone, die in Membranprotein-IPs auch als Kontaminanten auftreten können, spezifisch angereichert.

Abbildung 3.10 (B) zeigt die Verteilung der Proteinidentifikation mittels MS in Abhängigkeit von der eingesetzten Endopeptidase zur Proteinfragmentierung anhand eines Venn-Diagramms. In der PMP22-IP mit vorheriger Proteinquervernetzung wurden 265 Proteine und 153 Proteine nach Trypsin- bzw. Chymotrypsin-Verdau detektiert. Hierbei stimmten 100 Proteine insgesamt überein, die sowohl in der Messung nach Trypsin-Verdau als auch in der Messung nach Chymotrypsin-Verdau detektiert wurden.

Die durch die MS generierten Daten wurden im Fall der proteinquervernetzten Proben weiterhin mithilfe der pLink2-Software analysiert. Hierbei wurden allerdings keine Peptide identifiziert, die über BS3 mit PMP22 verbunden waren.

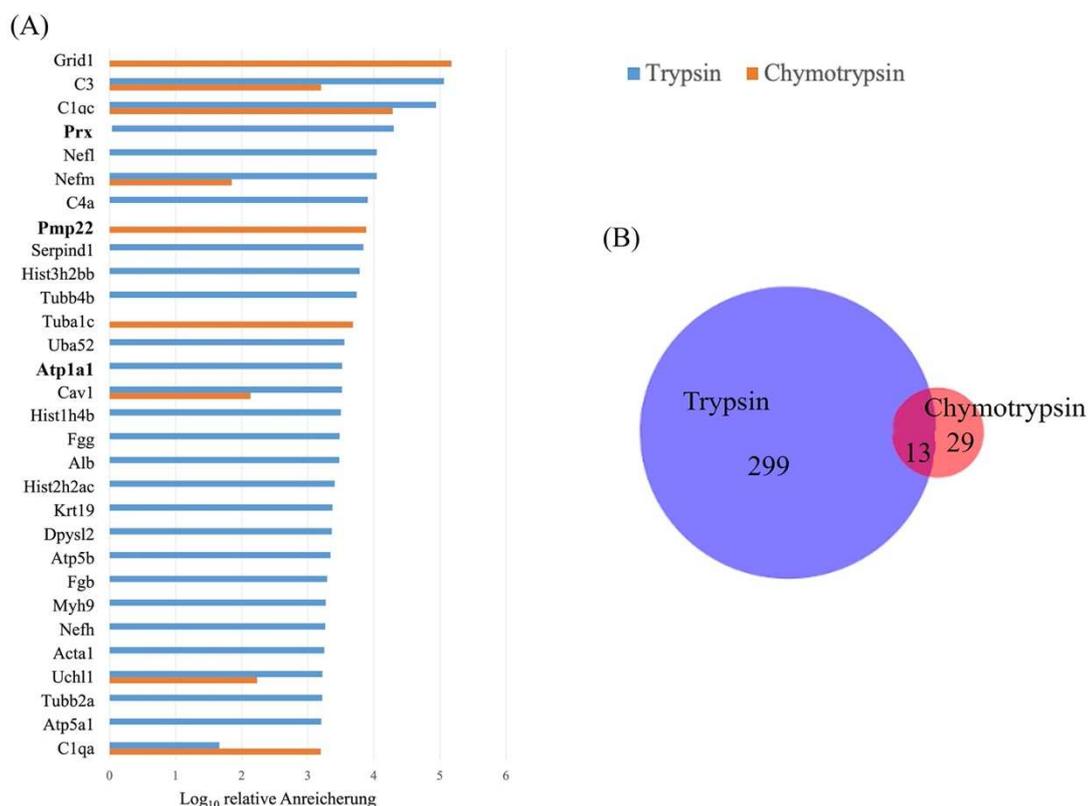


Abbildung 3.11: **MS-Ergebnis der PMP22-IP ohne Proteinquervernetzung:** (A) Gennamen-Liste der 30 stärksten angereicherten Proteine in absteigender Reihenfolge (Abkürzungen siehe Ende der Legende) mit Angabe des Anreicherungsquotienten (spezifische Anreicherung / unspezifische Anreicherung) als Log₁₀. Blau: Log₁₀ des Anreicherungsquotienten nach Trypsin-Verdau, orange: Log₁₀ des Anreicherungsquotienten nach Chymotrypsin-Verdau. PMP22 und die in Kapitel 4.4 diskutierten potentiellen Interaktionspartner von PMP22 sind fett markiert. (B) Venn-Diagramm zur Darstellung der nach Trypsin- und Chymotrypsin-Verdau mittels MS detektierten, spezifisch angereicherten Proteine inklusive Angabe der absoluten Anzahl. Blau: Trypsin-Verdau mit Detektion insgesamt 299 spezifisch angereicherter Proteine, rot: Chymotrypsin-Verdau mit Detektion insgesamt 29 spezifisch angereicherter Proteine. Die Überschneidung der Kreise zeigt 13 Proteine an, die in beiden Messrunden als spezifisch angereichert detektiert wurden. n=2. Aus Lesbarkeitsgründen wurde hier auf die kursive Schreibweise der Gennamen (Ratte) verzichtet.

Die Abbildung 3.11 zeigt die 30 am stärksten angereicherten Proteine im PMP22-IP-Eluat ohne vorherige Proteinquervernetzung sowie die Verteilung der Protein-Identifizierung mittels MS nach Trypsin- und Chymotrypsin-Verdau. Im Gegensatz zu dem Ergebnis der MS-Messungen der proteinquervernetzten PMP22-Eluate wurden hier nur 29 Proteine im Chymotrypsin-Verdau als spezifisch in der PMP22-IP angereichert identifiziert. Lediglich 13 der insgesamt 315 Proteine wurden sowohl im Trypsin- als auch im Chymotrypsin-Verdau detektiert, was einer deutlich geringeren Übereinstimmung entspricht als in der PMP22-IP mit BS3-Einsatz (hier stimmten 100 Proteine überein). Außerdem zeigten sich Unterschiede hinsichtlich der am stärksten angereicherten Proteine. Hier war

GRID1 (ionotroper Glutamatrezeptor- δ 1) am stärksten angereichert, gefolgt von Komplementfaktoren C3 und C1q. MPZ war nicht unter den 30 meistangereicherten Proteine, da es auch im unspezifischen IP-Eluat durch das Massenspektrometer identifiziert wurde. PMP22 wurde als acht-häufigstes Protein gefunden. Ähnlich wie in der PMP22-IP mit vorheriger Proteinquervernetzung wurden auch hier viele Zytoskelett-Proteine und Proteine der EZM inklusive Linker-Proteinen angereichert. Weiterhin kamen auch hier Proteine, die am Energiestoffwechsel des Schwann-Zell-Myelin-Axon-Komplexes beteiligt sind, wie beispielsweise ATP-Synthasen, insbesondere die ATP1A1, vor.

3.8 Die in den Immunopräzipitationen mit und ohne BS3 angereicherten Proteine zeigten Übereinstimmungen

Um potentielle *In-vivo*-Interaktionspartner von PMP22 anhand der im Rahmen dieser Arbeit generierten MS-Listen zu identifizieren, wurde eine weitere Liste aus den in beiden PMP22-IPs spezifisch angereicherten Proteinen erstellt. Die zugrundeliegende Annahme hierfür bestand darin, dass Proteine, die in beiden Anreicherungslisten vorkamen, als potentielle Interaktionspartner von PMP22 eher in Frage kamen als Proteine, die mit nur einer der beiden IP-Verfahren identifiziert wurden, insbesondere da mithilfe der pLink2-Software keine mit BS3 und PMP22 direkt verbundenen Peptide gefunden werden konnten. Außerdem konnten so insgesamt drei biologische Replikate berücksichtigt werden, obwohl die einzelnen IP-MS-Versuche mit jeweils nur einem bzw. zwei biologischen Replikaten durchgeführt wurden. Wie Abbildung 3.12 (A) zeigt, stimmten von den 318 (mit BS3) bzw. 315 (ohne BS3) angereicherten Proteinen 132 Proteine überein, was einer Übereinstimmung von $> 40\%$ entspricht. Die Gennamen dieser 132 Proteine sind in Abbildung 3.12 (B) alphabetisch aufgelistet, wobei die in Kapitel 4.4 diskutierten potentiellen PMP22-Interaktions-Kandidaten und PMP22 selbst hervorgehoben wurden. Hierzu zählen MPZ, PRX, CFLN1 und 14-3-3-Proteine.

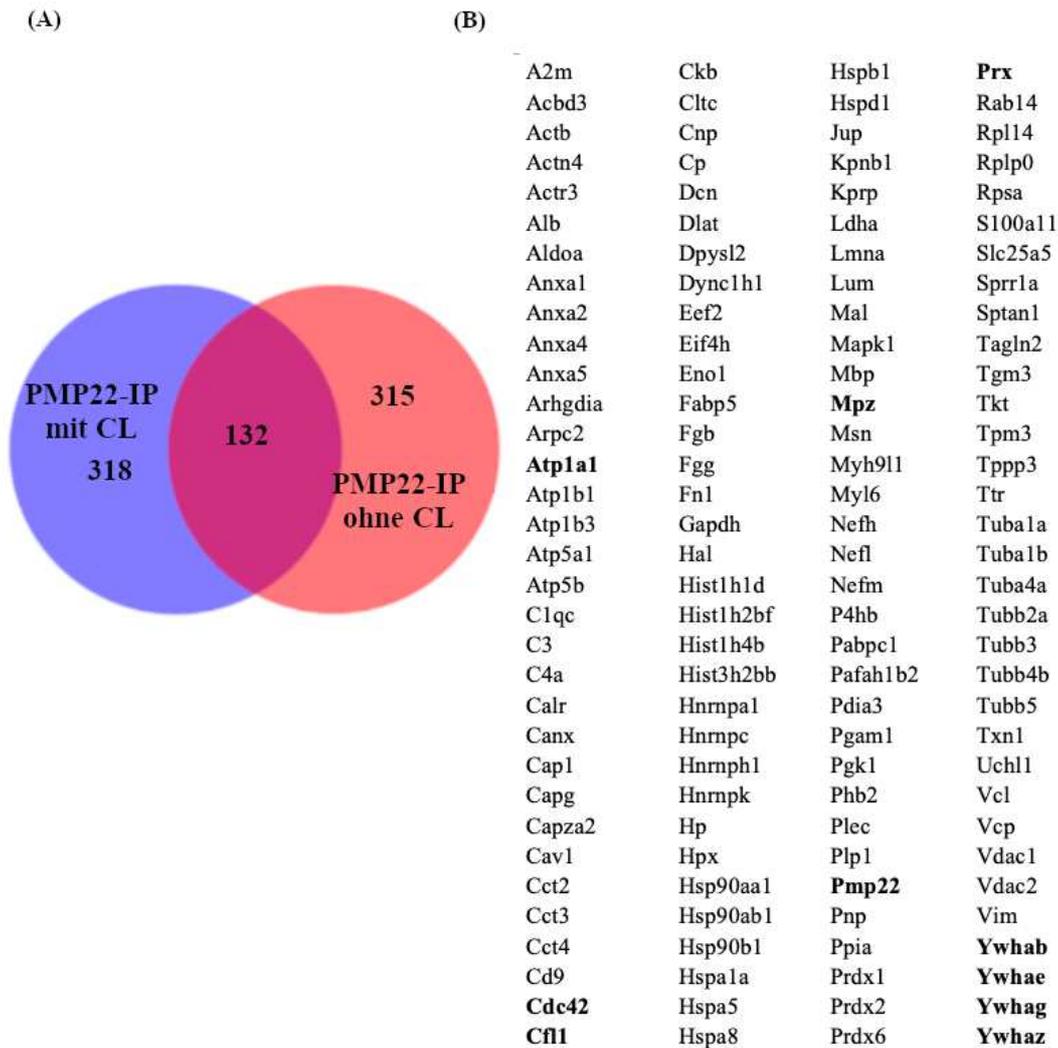


Abbildung 3.12: **Potentielle Protein-Interaktionspartner von PMP22:** (A) Venn-Diagramm zur Darstellung der in beiden PMP22-IPs (mit und ohne Proteinquervernetzung) angereicherten Proteine, die am ehesten als Protein-Interaktionspartner von PMP22 infrage kommen. Blau: in der PMP22-IP mit Proteinquervernetzung wurden 318 Proteine spezifisch angereichert, rot: in der PMP22-IP ohne Proteinquervernetzung wurden 315 Proteine spezifisch angereichert. Die Überschneidung der Kreise zeigt 132 Proteine an, die in beiden IP-Verfahren spezifisch angereichert wurden. CL: mit Protein-quervernetzung; ohne CL: ohne Proteinquervernetzung. (B) Gennamen der 132 in beiden PMP22-IPs spezifisch angereicherten Proteine in alphabetischer Reihenfolge. Die in Kapitel 4.4 als potentielle Protein-Interaktionspartner von PMP22 diskutierten Gennamen sowie *Pmp22* selbst sind hervorgehoben. Aus Lesbarkeitsgründen wurde hier auf die kursive Schreibweise der Gennamen (Ratte) verzichtet.

Abbildung 3.13 zeigt das Ergebnis von GO-Term-Analysen, die eine Zuordnung der mittels beider IP-Verfahren identifizierten potentiellen PMP22-Interaktionspartner zu einer biologischen und molekularen Funktion sowie einem zellulären Kompartiment ermöglichen. Die zugrundeliegende Annahme für diese Untersuchung bestand darin, dass eine Analyse aller potentieller Interaktionspartner im Hinblick auf ihre biologische Rolle in

der Zelle als Gesamtheit Informationen über die noch unverstandene Funktion von PMP22 liefern könnte. Die entsprechenden Gennamen der 132 in beiden PMP22-IP-Verfahren angereicherten Proteine wurden hierzu jeweils der in Kapitel 2.12.2 beschriebenen Analyse unterzogen. Es wurden so 134 verschiedene BP-GO-Terms, 87 CC-GO-Terms und 78 MF-GO-Terms für die 132 Gene identifiziert. Hierbei wurden in der CC-GO-Term-Analyse alle Gennamen einem GO-Term zugeordnet, während für die BP-GO-Terms 18 Gene nicht zuzuordnen und im Falle der MF-GO-Terms 9 Gennamen nicht zuzuordnen waren (hierunter fand sich erwartungsgemäß *Pmp22*, da die molekulare und biologische Funktion weitgehend unbekannt ist). Es wurden in der Abbildung 3.13 lediglich die GO-Terms aufgeführt, zu denen jeweils mindestens zehn Gene bzw. sieben Gene (im Fall der KEGG(*kyoco encyclopedia of genes and genomes*)-Signalwege) zugeordnet werden konnten. Hinsichtlich der zellulären Kompartimente wurden hierbei 26,5% der Gene als zu Fokaladhäsionen zugehörig identifiziert, was auf eine Lokalisation von PMP22-Interaktionspartnern in Fokaladhäsionen schließen ließ. Weiterhin fiel auf, dass 20,5% der in beiden IPs spezifisch angereicherten Proteine EZM-Proteine und 14,3% Zell-Zell-Adhärenz-Junktions-Proteine waren. Nicht nur bezüglich des zellulären Kompartiments, sondern auch hinsichtlich der biologischen und molekularen Signalwege waren mit Zell-Zell-Adhäsionen assoziierte Gennamen unter den potentiellen Interaktionspartnern von PMP22 an zweiter Stelle (BP-GO-Term) bzw. fünfter Position (MF-GO-Term) zu finden. Hinsichtlich der BP-GO-Terms sind lediglich der Gruppe der auf Medikamente reagierenden Signalwege (was einer recht großen und eher unspezifischen Gruppe entspricht) mehr Gennamen zugeordnet worden. Wie Abbildung 3.13 (E) zeigt wurden mittels GO-Term-Cluster-Analyse 19 aus den 132 potentiellen PMP22-Interaktionspartner-Gene identifiziert, die mit Zell-Zell-Adhäsionen als biologische bzw. molekulare Funktion bzw. als zellulärem Kompartiment assoziiert sind. Dieses in der Cluster-Analyse stärkste Cluster ließ sich mit einem Anreicherungsfaktor von 11,6 (normalisiert auf das gesamte Ratten-Genom) identifizieren und ließ auch auf eine potentielle Relevanz von PMP22 bzw. dessen Interaktionspartnern im Aufbau und/oder Erhalt von intakten Zell-Zell-Adhäsionen schließen.

Neben Zell-Zell-Adhäsionen fielen bei der Betrachtung der GO-Term-Ergebnisse die Gewichtung von mit dem Zytoskelett assoziierter GO-Terms auf. So zeigten 13% der potentiellen PMP22-Interaktionspartner eine Zytoskelett-Organisationsfunktion und 9,8% eine molekulare Funktion als strukturelle Zytoskelett-Komponente sowie 7,5% eine Aktin-bindende Funktion.

Die Analyse der zu verschiedenen zellulären Signalwegen zuzuordnenden Gennamen zeigte weiterhin, dass sowohl die Regulation des Aktin-Zytoskeletts als auch der PI3K-AKT-Signalweg als zwei der häufigsten unter den insgesamt identifizierten Signalwegen detektiert wurden. Diese Beobachtungen ließen auf eine Funktion von PMP22 bzw. dessen Interaktionspartnern für die Regulation des Zytoskeletts und/oder die Beeinflussung des PI3K-AKT-Signalwegs schließen.

Zusammenfassend deuteten die Ergebnisse der GO-Term-Analysen auf eine Rolle von PMP22 und dessen potentiellen Interaktionspartnern in der Regulation des (Aktin)-Zytoskeletts und damit verbundener Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten bzw. Zell-EZM-Kontakten (insbesondere Fokal-Adhäsionen) hin. Hierbei schien PMP22 bzw. dessen Interaktionspartner verschiedene zelluläre Signalwege wie den PI3K-AKT-Signalweg beeinflussen zu können.



Abbildung 3.13: **GO-Term-Analyse der potentiellen PMP22-Protein-Interaktionspartner:** Die GO-Term-Analysen (A) – (C) der 132 den angereicherten Proteinen entsprechenden Gennamen wurden nicht vollständig aufgeführt. Es wurden lediglich die GO-Terme genannt, denen mindestens 10 Gene insgesamt zugeordnet werden konnten. Die GO-Terme sind nach der Anzahl der ihnen zugeordneten Gennamen in absteigender Reihenfolge sortiert. Die Zahlen geben die absolute Menge der dem GO-Term zugeordneten Gene an, die farbigen Balken veranschaulichen die Menge im Vergleich zu den übrigen GO-Terme. (A) CC-GO-Term-Analyse (B) BP-GO-Term-Analyse (C) MF-GO-Term-Analyse (D) KEGG-GO-Term-Analyse. Es wurden lediglich GO-Terme aufgeführt, denen mindestens 7 Gene insgesamt zugeordnet werden konnten. Die GO-Terme sind nach ihrer Häufigkeit sortiert. Die Zahlen geben die absolute Menge der dem GO-Term zugeordneten Gene an, die gelben Balken veranschaulichen die Menge im Vergleich zu den übrigen GO-Terme. Von der Darstellung wurden folgende GO-Terme aufgrund von mangelndem Informationsgehalt für die Fragestellung dieser Arbeit ausgenommen: Proteoglykane bei Krebs, virale Karzinogenese, Biosynthese von Antibiotika, bakterielle Invasion von epithelialen Zellen, systemischer Lupus. (E) GO-Term-Cluster-Analyse der 132 den angereicherten Proteinen zugehörigen Gennamen mit farblicher

Markierung der berichteten (rosa) bzw. noch nicht berichteten (blau) Assoziation des jeweiligen Gens zum korrespondierenden GO-Term. Die Abbildung wurde analog zu der Abbildung aus der DAVID-Bioinformatik-Software erstellt (Huang et al. 2009a; Huang et al. 2009b). Der Anreicherungsfaktor für dieses *Cluster* betrug (unter Berücksichtigung des gesamten Ratten-Genoms als Basis) 11,6 (Huang et al. 2009a; Huang et al. 2009b). Aus Lesbarkeitsgründen wurde hier auf die kursive Schreibweise der Gennamen (Ratte) verzichtet.

4 Diskussion

4.1 Proteinquervernetzung und Solubilisierung von PMP22

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Proteinquervernetzung für das Transmembranprotein PMP22 im peripheren Nerven der Ratte erstmalig etabliert, um die Protein-Protein-Interaktionen von PMP22 mithilfe kovalenter Proteinverbindungen zu bewahren und somit Interaktionspartner von PMP22 zu identifizieren. Die Proteinquervernetzung diente neben der Bewahrung transienter und schwacher Protein-Protein-Interaktionen der Lösung des Detergenz-Dilemmas, das bei IP-Versuchen von Transmembranproteinen entsteht, und sollte weiterhin die Rate an falsch positiv identifizierten Protein-Interaktionspartnern senken. BS3 wurde als wirksames Proteinquervernetzungsreagenz identifiziert, da sich im Western Blot nachweisbare hochmolekulare PMP22-haltige Proteinspezies ausbildeten. Diese hochmolekularen Proteinverbände sind bei der Proteindarstellung beispielsweise mittels Western Blot oder Silbergel i. d. R. nicht als umschriebene Banden sichtbar, sondern kommen als Protein-„Schliere“ zur Darstellung (Chen et al. 2010; Rappsilber 2011). So waren auch die in dieser Arbeit gezeigten PMP22-haltigen, durch BS3 proteinquervernetzten Proteinverbände als solche „Protein-Schliere“ im Western Blot erkennbar. BS3 bietet außerdem den Vorteil, dass die Peptide, die proteinquervernetzt wurden, in der anschließenden Analyse identifiziert werden können, was mithilfe von Glutaraldehyd, dessen Verwendung als Proteinquervernetzer in dieser Arbeit auch getestet wurde, nicht möglich ist (Subbotin und Chait 2014). Es wurden verschiedene Konzentrationen der Proteinquervernetzungsreagenzien getestet und eine Konzentration von 0,5 mM BS3 als finale Konzentration für die anschließenden IP-Experimente festgelegt, da sich bei Verwendung von 0,5 mM BS3 sowohl PMP22-Monomere als auch hochmolekulare Proteinspezies (in Form der genannten „Protein-Schliere“) nachweisen ließen. Eine niedrigere Konzentration an Proteinquervernetzern verringert die Wahrscheinlichkeit, proteinquervernetzte Peptide in der MS-Analyse zu detektieren, während höhere Konzentrationen zu unlöslichen Proteinaggregatbildungen, deren Bestandteile nicht mehr identifizierbar sind, führen können (Sinz 2006; O'Reilly und Rappsilber 2018) und die Rate an falsch positiv identifizierten Protein-Protein-Interaktionen wiederum erhöhen können (Guerrero et al. 2006). Die Vorteile der Proteinquervernetzung sind bereits in der Einleitung ausführlich beschrieben worden (siehe Kapitel 1.3.3). An dieser Stelle sei noch darauf hingewiesen, dass die Kombination

aus kryogenem Mörsern und anschließender Proteinquervernetzung vor jeglicher anderer Probenverarbeitung dafür sorgt, dass die vorhandenen physiologischen Protein-Protein-Interaktionen jeglicher Art (stabil, transient, mittelbar und unmittelbar) auf diese Weise konserviert werden und so eine Vielzahl von Protein-Protein-Interaktionen detektiert werden kann, die bei konventionellen IP-Methoden nicht erhalten bleiben und der Identifizierung mittels MS entgehen.

Hinsichtlich der Solubilisierung von PMP22 wurde – Empfehlungen zu Solubilisierungsexperimenten für Transmembranproteine folgend (Linke 2009; Roy 2015; Duquesne et al. 2016; Lee et al. 2018) – die Wirksamkeit verschiedener Detergenzien miteinander verglichen. Hierbei erwiesen sich in dieser Arbeit SDS für proteinquervernetzte Proben und DDM für nicht-proteinquervernetzte Proben als besonders wirksam. SDS gilt als funktionales Detergenz zur Solubilisierung jeglicher hydrophober Proteine (Zanetta et al. 1977; Trotter und Wegescheide 1985; Sedzik et al. 1998; Sedzik und Tsukihara 2000) und eignet sich insbesondere für Transmembranproteine des Myelins wie PMP22, MPZ und PLP (Gudz et al. 2002; Sedzik et al. 2002; Amici et al. 2006). Es wurde für SDS eine Mengentitration erstellt, da die Detergenzkonzentration eine essentielle Rolle für den Erfolg eines Solubilisierungsexperiments spielt (Linke 2009; Duquesne et al. 2016). Diese zeigte, dass ein Anteil von 0,5% SDS am Solubilisierungspuffer bei gleicher Proteinmenge im Homogenisat ein besseres Solubilisierungsergebnis ergab als ein Anteil von 0,1% bzw. 1% SDS. Die Puffer für IPs von Myelinproteinen in anderen Arbeiten hatten einen weitaus geringeren SDS-Anteil von 0,05% (Gudz et al. 2002), 0,1% (D’Urso et al. 1999) bzw. 0,3% (Amici et al. 2006). Allerdings war in diesen PMP22-IPs keine Proteinquervernetzung erfolgt. Wie den Ergebnissen der Detergenzien-Versuche dieser Arbeit zu entnehmen ist, stellt die Proteinquervernetzung für die anschließende Solubilisierung von Proteinen eine Hürde dar, wohlmöglich da durch Proteinquervernetzung komplexe, schwerer lösliche Proteinaggregate entstehen. Daher ergibt sich der hier benötigte Einsatz einer höheren SDS-Konzentration zur vollständigen Solubilisierung der Proteine im Homogenisat.

Für die Proben ohne Proteinquervernetzung erwies sich DDM als effektivstes Detergenz. DDM ist im Gegensatz zu SDS ein nicht-ionisches Detergenz und gilt als „milder“ als SDS (Privé 2007; Linke 2009; Tate 2010). Als mildes Detergenz führt es wahrscheinlich zu weniger Detergenz-bedingter gestörter Lipid-Organisation in der Biomembran und verringert somit die Inaktivierung von Transmembranproteinen (Palsdottir und Hunte

2004). DDM wird daher oft zur Solubilisierung von Transmembranproteinen verwendet (Sonoda et al. 2010; Yang et al. 2014). So benutzten auch Lee et al. (2018) in ihren IP-Experimenten mit CAD11 (Cadherin-11), einem Adhäsionsprotein der Cadherin-Familie, u. a. DDM und zeigten die im Gegensatz zu anderen Detergenzien überlegene Wirksamkeit von DDM zur Solubilisierung von CAD11. Weiterhin zeigten die Autoren dieser Arbeit die Kompatibilität von DDM mit darauffolgenden IP-Experimenten, was den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit entspricht und nahelegt, dass DDM die Interaktion zwischen Protein und Antikörper nicht bzw. weniger stört als andere Detergenzien. In anderen Arbeiten wurden für IPs von PMP22 bzw. dessen Interaktionspartnern allerdings bisher neben SDS nicht DDM, sondern andere Detergenzien wie NP-40 und TritonX-100 verwendet (Guo et al. 2014; Vanoye et al. 2019). Die Autoren dieser Arbeiten verwendeten jedoch Ischias-Nerven von jungen Mäusen bzw. sehr jungen Ratten (und nicht wie in dieser Arbeit von erwachsenen Ratten), sodass die unterschiedliche Wirksamkeit der genannten Detergenzien mit dem unterschiedlichen Ursprung und der variablen Aufbereitung der verwendeten Gewebe zusammenhängen könnte. Allerdings wurde in den genannten Arbeiten keine Etablierung einer optimierten Solubilisierung für PMP22 aus den Ischias-Nerven gezeigt, sodass nur darüber spekuliert werden kann, ob sich die im IP-Puffer verwendeten Detergenzien als besonders effektiv zur Solubilisierung von PMP22 erwiesen hatten. Die Wirksamkeit von Detergenzien zur Solubilisierung einzelner Proteine ist insgesamt ein bisher wenig systematisch untersuchtes Feld, sodass es an verlässlichen und reproduzierbaren Daten mangelt (Duquesne et al. 2016). Die fehlende Systematik als Grundlage für diese Versuche könnte neben den anderen genannten Faktoren zur Verwendung unterschiedlicher Detergenzien, Mengen, Zeiten und Temperaturen für die Solubilisierung des gleichen Proteins beitragen.

4.2 Die nicht erfolgreiche Immunopräzipitation von PMP22 und daraus resultierende Optimierungen der Versuchsbedingungen

Das in dieser Arbeit generierte erste IP-Ergebnis von PMP22 aus proteinquervernetzten Ratten-Ischias-Nerven-Homogenisaten zeigte keine spezifische Anreicherung von PMP22-Monomeren oder hochmolekularen PMP22-haltigen Proteinspezies im Vergleich zur Negativkontrolle mit Kaninchen-IgGs (siehe Kapitel 3.3). Das Scheitern dieses IP-Experiments kann – wie das Scheitern von IPs im Allgemeinen – verschiedene Gründe haben, die von der unzureichenden Bindungsaffinität des Anti-PMP22-Antikörpers (z.B.

durch Antigen-Antikörper-Kontakt störende Detergenzien) über Versuchsbedingungen wie Inkubationszeit und -temperatur, eingesetzte Menge des Zielproteins im *Input*, unzureichende Elution, eingesetzte *Dynabeads*-Menge und zu häufiges Waschen der Antigen-Antikörper-Komplex tragenden *Dynabeads* reichen können (Bonifacino et al. 2016). Den für die IP von Membranproteinen typischen Schwierigkeiten in der Anreicherung des Zielproteins vor der eigentlichen IP wurde in dieser Arbeit durch die systematischen Solubilisierungsexperimente bereits vorgebeugt, sodass eine zu geringe Ausgangsmenge im Homogenisat der Ratten-Ischias-Nerven nicht als primäre Ursache für das fehlende PMP22-Signal in der spezifischen IP infrage kommt. Zwei weitere der sehr häufigen Problemquellen von IP-Experimenten sollen an dieser Stelle diskutiert werden, die antikörperbezogenen und die von den *Dynabeads* abhängigen Fehlerquellen. Die variable Affinität der eingesetzten Antikörper ist eine gängige Schwierigkeit bei IP-Experimenten (Bonifacino et al. 2016; Smith et al. 2017), die insbesondere beim Einsatz von SDS im IP-Puffer zu beobachten ist (Qualtiere et al. 1977). Weiterhin konnten Lee et al. (2018) zeigen, dass Detergenzien allgemein (nicht nur SDS) die Antikörperaffinität zu ihren Antigenen beeinflussen können, sodass die Kompatibilität des Detergenz mit dem eingesetzten Antikörper im jeweiligen Experiment überprüft werden sollte. Um die Störung der Antigen-Antikörper-Interaktion durch SDS zu verringern, wurde das Ratten-Ischias-Nerven-Homogenisat in dieser Arbeit vor dem Versuchsschritt der IP mit Triton-X100 verdünnt. DDM zeigte sich, wie oben beschrieben, sowohl in dieser Arbeit als auch in der Arbeit von Lee et al. (2018) als IP-kompatibel. Die durch den Einsatz von Detergenzien bedingten Störungen der Antigen-Antikörper-Interaktion wurden daher in dieser Arbeit weitgehend umgangen.

Die Antikörperbindungsaffinität kann auch unabhängig von den Detergenzien variieren und unzureichend für ein erfolgreiches IP-Experiment sein. Das erste IP-Ergebnis dieser Arbeit legte allerdings kein Affinitätsproblem des Anti-PMP22-Antikörpers nahe, sondern zeigte unterschiedlich starke Antikörper-Ketten-Signale des spezifischen Anti-PMP22-Antikörpers im Vergleich zum Signal der Kaninchen-IgGs. Das deutete auf eine Diskrepanz zwischen der vom Hersteller angegebenen Proteinmenge und der tatsächlichen Menge an spezifischen Antikörper-Ketten hin. Der daraufhin durchgeführte Vergleich der Proteinmenge und des Protein-Verteilungsmusters bestätigte diesen Verdacht. Die dadurch bedingte unzureichende Menge an Anti-PMP22-Antikörper im ersten IP-Versuch könnte somit die fehlende spezifische Anreicherung von PMP22 in der IP bedingt haben.

Eine weitere bekannte Problemquelle von IP-Experimenten sind die unspezifischen Proteinbindungen, die u. a. durch die *Dynabeads* entstehen können (Bonifacino et al. 2016; Lin und Lai 2017). Sie können einerseits die Bindestellen für die Antikörper-Antigen-Komplexe blockieren und andererseits zu einer Überlagerung der spezifischen Zielprotein-Signale durch unspezifische Protein-Signale bei der Analyse des IP-Eluats führen. Beide Mechanismen führen zum fehlenden Nachweis einer spezifischen Anreicherung des Zielproteins, in diesem Fall von PMP22. Daher empfiehlt es sich generell, vor einer IP den IP-Input mit *Dynabeads* (und um weiterhin unspezifische Bindungen an den Antikörper zu minimieren auch mit unspezifischen IgGs) zu klären. Das wurde in dieser Arbeit umgesetzt, dennoch zeigte das Ergebnis der ersten IP kein spezifisches PMP22-Signal. Die Ergebnisse des ersten PMP22-IP-Versuchs sowie der daraufhin durchgeführten *Dynabeads*-Titration deuteten auf eine durch die *Dynabeads*-Inkubation bedingte starke Reduktion der Protein-Gesamtmenge inklusive von PMP22 hin. Die Klärung mittels Kaninchen-IgGs schien jedoch keinen starken Einfluss auf die Proteinmenge im Homogenisat zu haben. Da die im Homogenisat fehlenden Proteine allerdings nicht im Eluat der *Dynabeads* mittels Western Blot nachweisbar waren, entstand die Frage nach dem Verbleib der Proteine, die unspezifisch an die *Dynabeads* gebunden hatten. Man könnte davon ausgehen, dass durch die *Dynabeads*-Inkubation unlösliche Protein-Aggregate im Homogenisat entstanden, die sich nicht mehr im SDS-Gel darstellen ließen. Dieser Hypothese wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit jedoch nicht weiter nachgegangen. Trotz fehlender Gewissheit bezüglich des Verbleibs der Proteine erschien das Problem der von der *Dynabeads*-Menge abhängigen unspezifischen Proteinbindungen eine wichtige Fehlerquelle des gescheiterten ersten IP-Versuchs zu sein. Das Hinzufügen einer sonst häufig eingesetzten zweiten Negativkontrolle durch leere *Dynabeads* (Bonifacino et al. 2016; Lin und Lai 2017) erschien nicht zielführend, da so zwar die unspezifischen Bindungen an die *Dynabeads* identifizierbar wären, die spezifische Anreicherung der PMP22-Antikörper-Komplexe aber weiterhin behindert bliebe. Um diesem Problem also auf andere Art zu begegnen, wurden die verwendeten *Dynabeads* vor dem Einsatz in der nächsten IP mit dem Ratten-Ischias-Nerven-Homogenisat abgesättigt. Die dadurch provozierten unspezifischen Bindestellen auf den *Dynabeads* sollten so vor der IP besetzt werden und im Rahmen des mehrmaligen Waschens der PMP22-Antikörper-*Dynabead*-Komplexe aus dem spezifischen IP-Eluat eliminiert werden. Die Optimierungsschritte hinsichtlich der *Dynabeads* und Antikörper-Mengen zeigten im folgenden PMP22-IP-Versuch nach Proteinquervernetzung anhand der Ergebnisse in Kapitel 3.5 Erfolg.

4.3 Die Bedeutung der in dieser Arbeit gezeigten Immunpräzipitationen von PMP22 mit und ohne Proteinquervernetzung

Es konnte im Rahmen dieser Arbeit nach Optimierung der Versuchsbedingungen erstmalig eine erfolgreiche PMP22-IP aus proteinquervernetzten Ratten-Ischias-Nerven-Homogenisaten gezeigt werden. Bisherige PMP22-IPs waren stets ohne den vorherigen Schritt der Proteinquervernetzung durchgeführt worden, sodass die Etablierung dieses Protokolls einerseits methodisch und andererseits hinsichtlich der daraus generierbaren Ergebnisse ein Novum darstellt. Es konnte weiterhin erstmalig eine erfolgreiche PMP22-IP aus Ratten-Ischias-Nerven-Homogenisaten ohne Einsatz von SDS gezeigt werden. Zwar haben andere Autoren (wie bereits erwähnt) PMP22 auch aus Nerven-Gewebe bzw. Zellkulturen mittels IP anreichern können, die unbeachteten methodischen Problematiken (die bei der Verwendung von SDS im Lysepuffer der IP entstehen und in anderen Arbeiten nicht adressiert wurden) wurden in dieser Arbeit bereits erläutert. Es sollte daher neben der IP mit Proteinquervernetzung eine PMP22-IP ohne Proteinquervernetzung durchgeführt werden, die auf die Verwendung von SDS im Lysepuffer verzichtet, um die genannten Schwierigkeiten zu umgehen und die Qualität der daraus generierten Interaktionsdaten zu steigern. Es wurde hier gezeigt, dass PMP22-IPs aus Ratten-Ischias-Nerven-Homogenisaten unter Verwendung eines nicht-denaturierenden Detergenz, DDM, reproduzierbar durchführbar sind.

Im Anschluss an die IPs von PMP22 wurden die Eluate massenspektrometrisch vermessen, was erstmalig der Ermittlung eines PMP22-Interaktoms, also der Gesamtheit aller Protein-Protein-Interaktionen von PMP22, dienen sollte. Neben diesem Aspekt bot die Verwendung verschiedener methodischer Ansätze zur Beantwortung der gleichen Frage (IP-Versuche mit und ohne Proteinquervernetzung) im Rahmen dieser Arbeit einen weiteren Vorteil: Ein solches Herangehen verringert die Wahrscheinlichkeit, falsch positive Interaktionspartner zu identifizieren und erhöht so die Qualität der generierten Daten.

4.4 Die potentiellen *In-vivo*-Interaktionspartner von PMP22 und deren Implikationen für die Pathophysiologie der Charcot-Marie-Tooth-Erkrankung 1A

Trotz seiner Identifikation schon vor 30 Jahren als krankheitsverursachendes Protein für die CMT1A sind die Funktion von PMP22 sowie die CMT1A-Pathomechanismen nach wie vor weitgehend unverstanden. Ein besseres Verständnis seiner Funktion könnte aber maßgeblich zur Entwicklung therapeutischer Ansätze für diese noch immer unheilbare Krankheit beitragen. Anhand der in der vorliegenden Arbeit identifizierten möglichen Interaktionspartner von PMP22, z.B. die Myelinproteine MPZ und PRX sowie das Aktin-modulierende Protein CFLN-1, lassen sich mögliche zelluläre und strukturelle Funktionen ableiten, die im Folgenden diskutiert werden. Es sei an dieser Stelle auf die statistisch nicht hinreichenden Wiederholungen der MS-Messungen und die damit verbundene fehlende statistische Verlässlichkeit der Daten hingewiesen (siehe Kapitel 4.5.2).

Zunächst soll die bereits beschriebene Interaktion von MPZ und PMP22 (D'Urso et al. 1999; Hasse et al. 2004), deren biologische Bedeutung in der Einleitung dieser Arbeit (siehe Kapitel 1.2.3.4) dargelegt ist, diskutiert werden. So zeigen die genannten vorherigen Arbeiten eine Interaktion zwischen beiden Myelinproteinen und es wurde eine damit verbundene synergistische Funktion beider für die Kompaktierung des Myelins im physiologischen Zustand diskutiert (Mittendorf et al. 2017). Allerdings handelt es sich bei MPZ auch um das häufigste Myelinprotein im PNS (Siems et al. 2020), sodass der Nachweis von MPZ im PMP22-IP-Eluat auch auf die Abundanz des Proteins zurückzuführen sein könnte (Cox et al. 2014). Im CMT1A-Tiermodell nimmt die MPZ-Expression mit der PMP22-Überexpression ab, was für eine durch PMP22 regulierte Expression anderer Myelinproteine spricht (Fledrich et al. 2014). Eine durch PMP22-Überexpression bedingte Reduktion der MPZ-Menge könnte die Störung der Myelinstöchiometrie und Myelinarchitektur noch verstärken. Ob PMP22 und MPZ tatsächlich über eine direkte Interaktion die Intaktheit der Myelinstruktur im PNS bewahren oder ob PMP22 nur indirekt die Funktion von MPZ (über Änderung der MPZ-Expression) moduliert, bleibt zu klären.

In beiden IP-Eluaten um ein Vielfaches angereichert fand sich das Myelinprotein PRX, das sich als dritthäufigstes Myelinprotein im PNS findet (Siems et al. 2020) und bei adulten Tieren im nicht-kompakten Myelin lokalisiert ist (Gillespie et al. 1994), wo es am Aufbau von Dystroglykan-Komplexen (Gillespie et al. 2000; Sherman et al. 2001),

Schmidt-Lantermann-Inzisuren (Sherman et al. 2012) und Cajal-Bändern (Sherman und Brophy 2018) beteiligt ist. Die neuropathischen Phänotypen, die durch Mutationen im PRX-Gen entstehen, verdeutlichen seine Funktion für die Bildung und den Erhalt intakten Myelins (Guilbot et al. 2001; Berger et al. 2006; Marchesi et al. 2010; Sherman und Brophy 2018). PRX-defiziente Schwann-Zellen zeigen im Tiermodell (a) eine gestörte Elongation und die Ausbildung verkürzter Internodien (Court et al. 2004) sowie (b) Hypermyelinisierung, (c) Demyelinisierung und (d) Zwiebelschalenformationen (Gillespie et al. 2000). Mit den histopathologischen Charakteristika a – d spiegelt eine PRX-Defizienz im PNS somit auch typische krankheitsspezifische Merkmale der CMT1A-Erkrankung wieder (z.B. Fledrich et al. (2019)). Eine funktionelle Interaktion zwischen PRX und PMP22 erscheint somit plausibel, doch wie könnte diese zellbiologisch realisiert werden? Raasakka und Kursula (2020) beschreiben das Periaxinosom, das komplexe Protein-Protein-Interaktionssystem von PRX, als Organisator von Strukturproteinen im nicht-kompakten Myelin, da PRX über seine verschiedenen Protein-Protein-Interaktionen Brücken zwischen Schwann-Zell-Zytoplasma, Schwann-Zell-Membranen und EZM ausbilden kann und so die richtige Struktur von Myelin, Schwann-Zelle und Axon im Zusammenspiel gewährleistet. Neben seiner Interaktion mit *dystrophin-related protein 2* (Sherman et al. 2001; Sherman et al. 2012) in Dystroglykan-Komplexen sind u. a. Interaktionen mit Ezrin (Guo et al. 2020) und $\beta 4$ -Integrin (Raasakka et al. 2019) als molekulare Korrelate dieser Funktionen beschrieben. $\beta 4$ -Integrin ist in der abaxonalen Membran der Myelinscheiden im PNS lokalisiert, wo es zusammen mit $\alpha 6$ -Integrin als Laminin-Rezeptor fungiert und wichtig für den Erhalt der Struktur von myelinisierten Fasern ist (Feltri et al. 1994; Quattrini et al. 1996; Nodari et al. 2008; Poitelon et al. 2018). Eine Ablation von $\beta 4$ -Integrin in HNPP-Tiermodellen führt zur Aggravierung der bereits (mit heterozygoter PMP22-Defizienz assoziierten) gestörten Internodien-Struktur (Poitelon et al. 2018). Es wurde dann eine funktionelle, aber keine direkte Interaktion zwischen PMP22 und $\beta 4$ -Integrin beschrieben (Amici et al. 2006; Poitelon et al. 2018). So könnte PRX aufgrund seiner direkten Interaktion mit $\beta 4$ -Integrin (Poitelon et al. 2018) und seiner potentiellen Interaktion mit PMP22 (diese Arbeit) der Link zwischen den beiden funktionell interagierenden Proteinen sein, was bereits von Poitelon et al. (2018) und Raasakka et al. (2019) so diskutiert wurde. Nun stellt sich aber die offensichtliche Frage nach der Lokalisation der Interaktion von PMP22 und PRX, da PMP22 primär im kompakten Myelin und PRX im nicht-kompakten Myelin des adulten Nervens vorkommen. Denkbar wär in Analogie zu der gezeigten Interaktion von PMP22

und MAG bzw. JAM-C in jungen Ischias-Nerven von HNPP- bzw. Wildtyp-Tiermodellen (Guo et al. 2014) eine direkte Interaktion von PMP22 und PRX während der Entwicklung des Nerven. PMP22 konnte nämlich in Nerven, die sich im Stadium der Myelinisierung befanden, auch im nicht-kompakten-Myelin lokalisiert werden, was nach abgeschlossener Myelinisierung nicht mehr der Fall war (Hu et al. 2016). Die erhöhte PMP22-Expression in der CMT1A-Erkrankung ist zudem nicht nur im kompakten, sondern auch im nicht-kompakten Myelin detektierbar (nicht publizierte Daten von Nadja Götze), sodass möglicherweise eine toxische PRX-PMP22-Interaktion auch in adulten CMT1A-Nerven vorliegen könnte. Darüber hinaus ist die PMP22-Expressionsänderung mit einer Abnahme der *Prx*-mRNA im CMT1A-Tiermodell assoziiert (Fledrich et al. 2014). So könnte eine PMP22-Expressionsveränderung sowohl die direkte Interaktion zwischen PMP22 und PRX in der Entwicklung des Nervens stören als auch die von PMP22 primär unabhängigen PRX-Funktionen beeinträchtigen. Beide Mechanismen könnten zu einer fehlerhaften Ausbildung der von PRX abhängigen Strukturen im nicht-kompakten Myelin (Schmidt-Lantermann-Inzisuren, Cajal-Bänder, Fokaladhäsionen) führen wie Hu et al. (2016) es für die Interaktion von PMP22 mit MAG und die von MAG abhängigen Strukturen des nicht-kompakten Myelins diskutierten. Im adulten Nerven könnte es funktionelle bzw. mittelbare Interaktionen von PMP22 und PRX über die Verbindung von dazwischen geschalteten Linker-Proteinen geben, die nicht in kompaktes und nicht-kompaktes Myelin kompartimentiert werden.

Die Interaktion von PMP22 mit MPZ bzw. PRX würde allerdings lediglich die gestörte Myelinarchitektur erklären, aber keinen Aufschluss hinsichtlich des von Fledrich et al. (2014) vermuteten Problems der gestörten Schwann-Zelldifferenzierung bei PMP22-Überexpression geben. Hier kommt ein weiterer, anhand der Ergebnisse dieser Arbeit potentieller Interaktionspartner von PMP22 in Betracht, CFLN-1. CFLN-1 ist ein Aktin-bindendes Protein, dessen primär beschriebene Funktion in der Depolymerisation von F-Aktin liegt (Moon und Drubin 1995; Bamburg 1999; Bamburg und Wiggan 2002; Van Troys et al. 2008; Bernstein und Bamburg 2010). Allerdings sind für CFLN-1 und die damit assoziierten bzw. interagierende Proteine viele verschiedene Funktionen beschrieben, die über die Aktin-Organisations-Funktion hinausgehen (Mizuno 2013). CFLN-1 kommt in zwei unterschiedlichen Zuständen vor, wobei die Phosphorylierung an Ser-3 über den Funktionszustand entscheidet (Agnew et al. 1995; Moriyama et al. 1996). Hinsichtlich der sich an Aktin manifestierenden Funktion sprechen die meisten Arbeiten für ein aktives CFLN-1 im dephosphorylierten Zustand (Vartiainen et al. 2002; Hotulainen

et al. 2005), während CFLN-1 für seine Funktion als Aktivator der Phospholipase D1 (und damit verbundener Chemotaxis-Funktion) im phosphorylierten Zustand aktiv ist (Han et al. 2007). Abbildung 4.1 zeigt die CFLN-1 modulierenden Signalwege sowie den von Sparrow et al. (2012) beschriebenen Einfluss von NRG-1 auf CFLN-1. SSH-1 (*singleshot-1 phosphatase*) gilt als Phosphatase von CFLN-1 und fördert dessen Depolymerisationsfunktion an Aktin. CDC42 (*cell division control protein 42*) und PAK aktivieren hingegen LIMK (LIM-Kinase), fördern die Phosphorylierung von CFLN-1 und stabilisieren so die F-Aktin-Moleküle in der Zelle (Sparrow et al. 2012). Die Rolle von RAC (*ras-related botulinum toxin substrate 1*) ist anhand von Daten aus Keratinozyten jedoch (entgegen der vorliegenden Darstellung noch) nicht eindeutig einem der beiden Signalwege zuzuordnen (Sehgal et al. 2006; Kligys et al. 2007).

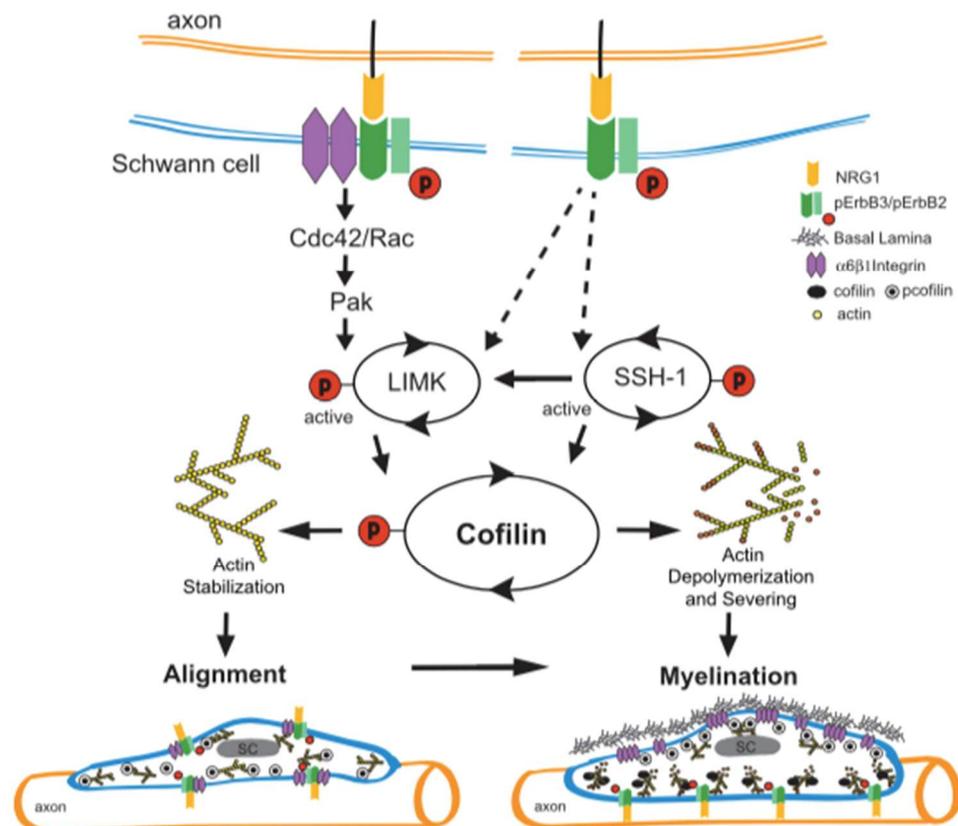


Abbildung 4.1: **Schematische Darstellung der CFLN-1 modulierenden Signalwege in Schwann-Zellen:** Je nach Entwicklungsstand der Schwann-Zelle werden durch axonales NRG-1 (NRG1) unterschiedliche Signalwege aktiviert. Während der frühen Nervenentwicklung stimuliert NRG-1 die Phosphorylierung von CFLN-1 (Cofilin) und fördert somit die Kontaktbildung zwischen Axon und Schwann-Zelle. Später, nachdem der Kontakt stabil genug ist, fördert NRG-1 die Myelinisierung des Axons, wofür ein hoher Aktin-Turnover in der Schwann-Zelle benötigt wird. Hierfür wird Aktin-benachbartes CFLN-1 dephosphoryliert und in der Folge werden mehr F-Aktine gespalten. Der Hypothesen-Charakter der zweiten Aussage zur

NRG-1-Wirkung ist durch die gestrichelten Linien auf der Abbildung verdeutlicht (Sparrow et al. 2012). Die Verwendung der Abbildung erfolgt mit freundlicher Genehmigung von Society for Neuroscience.

In Schwann-Zellen konnte eine vom axonalen NRG-1 abhängige Wirkung auf die CFLN-1 modulierenden Signalwege gezeigt werden, die für die Formänderung und die Polarisierung der Schwann-Zelle, die Anlagerung der Schwann-Zelle am Axon und die Myelinisierung essentiell ist (Sparrow et al. 2012). Die genetische Ablation von CFLN-1 verhindert diese Mechanismen in myelinisierenden Co-Kulturen aus Neuronen und Schwann-Zellen (Sparrow et al. 2012), was auf eine essentielle Funktion von CFLN-1 für die strukturelle und funktionelle Interaktion zwischen Axon und Schwann-Zellen während der Entwicklung peripherer Nerven hindeutet. In PMP22-überexprimierenden Schwann-Zellen konnte ebenso ein verringertes Wachstum sowie eine verminderte Polarisierung und Formgebung der Schwann-Zelle gezeigt werden (Fledrich et al. 2019). PMP22-Überexpression könnte so direkt oder indirekt durch Funktionsänderung bzw. Verlust der Funktion von CFLN-1 die Schwann-Zell-Axon-Interaktion in der Entwicklung des peripheren Nervens stören.

Auch $\alpha 6/\beta 4$ -Integrin moduliert (zumindest in Keratinozyten) den Aktivitätszustand von CFLN-1 über RAC und SSH-1 abhängige Signalwege (Sehgal et al. 2006; Kligys et al. 2007). In PMP22-heterozygot-defizienten Mäusen wurde eine erhöhte PAK-Aktivität als Ursache eines gestörten Aktin-Turnovers und damit einhergehender gestörter Struktur der Schwann-Zellen diskutiert, die Aggravierung des internodalen Strukturdefizits bei zusätzlicher $\beta 4$ -Integrin-Defizienz ist zudem mit einer nochmals verstärkten PAK-Aktivität assoziiert (Poitelon et al. 2018). Zusammen betrachtet könnten $\beta 4$ -Integrin und PMP22 in adulten Nerven in den Internodien synergistisch die Depolymerisation von F-Aktin bewirken und ein Fehlen ($\beta 4$ -Integrin) bzw. eine Verringerung (PMP22) dieser Proteine zu einer Kumulation von F-Aktin-Filamenten führen. Auf molekularer Ebene könnten $\beta 4$ -Integrin und PMP22, wenn in physiologischer Menge vorhanden, daher über PAK-antagonistische Signalwege die CFLN-1-Phosphorylierung hemmen.

Wie genau könnten PMP22 und CFLN-1 bzw. dessen Modulatoren unmittelbar oder mittelbar interagieren? Anhand von RNA-Sequenzierungsdaten aus CMT1A-Rattenmodellen ließ sich eine 1,4 fache Expressionssteigerung von *Ssh-1* in transgenen Ischias-Nerven im Vergleich zum Wildtyp feststellen (Fledrich et al. 2018). Dies könnte durch PMP22-Überexpression bedingt sein und in der Folge (vorausgesetzt die verstärkte Expression auf mRNA-Ebene setzt sich auf Proteinebene fort) v. a. die Anlagerung der Schwann-

Zelle am Axon stören, da kein stabiles Netzwerk aus F-Aktin aufgebaut werden könnte, um die Axon-Schwann-Zell-Interaktion zu stabilisieren. Diese fehlende Anlagerung von Schwann-Zellen ans Axon könnte das molekulare Korrelat der von Fledrich et al. (2019) vermuteten funktionellen Denervierung der Ischias-Nerven im CMT1A-Tiermodell sein und in der Folge zu den vom glialen NRG-1 abhängigen Mechanismen der Differenzierungsstörung der Schwann-Zellen führen. Man könnte allerdings auch mutmaßen, dass die erhöhte *Ssh-1*-Expression durch die Überexpression des glialen NRG-1 entsteht und somit Folge und nicht Ursache dieser Fehlfunktion ist. Wie in Abbildung 4.1 dargestellt zeigten Sparrow et al. (2012) nämlich die modulierende Wirkung von NRG-1 auf CFLN-1 in Schwann-Zell-Neuron-Co-Kulturen, wobei hier die Wirkung von axonalem NRG-1 und nicht von glialem NRG-1 untersucht wurde. Auch eine Kombination aus beiden Mechanismen ist denkbar: SSH-1 könnte aufgrund der erhöhten autoparacrinen NRG-1-Menge überexprimiert werden und PMP22 direkt mit CFLN-1 unabhängig von SSH-1 interagieren.

Es wurden im Rahmen dieser Arbeit im PMP22-IP-Eluat weiterhin 14-3-3-Proteine angereichert, für die CFLN-1 modulierende Wirkungen beschrieben sind (Gohla und Bokoch 2002; Nagata-Ohashi et al. 2004; Kligys et al. 2007). 14-3-3-Proteine kommen in unterschiedlichen Isoformen vor, werden ubiquitär exprimiert und haben vielfältige Funktionen, insbesondere hinsichtlich der Modulation intrazellulärer Signalkaskaden. Sowohl 14-3-3 ζ -Proteine als auch 14-3-3 ϵ -Proteine wurden im ZNS als Regulatoren von Neurogenese und Neurodifferenzierung beschrieben und könnten eine Rolle in der Pathophysiologie von Erkrankungen der neuronalen Entwicklung und/oder der Neurodegeneration spielen (Cornell und Toyooka 2017). 14-3-3 ζ -Protein hemmt als Dimer die SSH-1-Proteine und fördert so die Phosphorylierung von CFLN-1 und folglich die F-Aktin-Stabilisierung (Nagata-Ohashi et al. 2004; Kligys et al. 2009). PMP22 könnte 14-3-3 ζ -Protein direkt binden, so dessen Funktion inhibieren und dadurch die SSH-1-Proteine wiederum disinhibieren. PMP22-Überexpression würde so zu einer Überaktivität von SSH-1 führen, während PMP22-Defizienz eine verringerte Aktivität von SSH-1 bedingen würde, was im Einklang mit der dort beobachteten vermehrten Menge an F-Aktin stünde.

Weiterhin wird die Funktion von CFLN-1 in Zellkultur durch die PI3K-AKT-Signalkaskade moduliert (Nishita et al. 2004) und PIP2 (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat)

ist auch *in vitro* schon früh als CFLN-1 hemmendes Molekül beschrieben worden (Yonezawa et al. 1991). In Zellkultur aktiviert PI3K über RAC LIMK2 (LIM-Kinase 2), wodurch CFLN-1 phosphoryliert und dadurch das F-Aktin-Netzwerk stabilisiert wird (Mizuno 2013). Im PMP22-überexprimierenden Tiermodell konnte – wie in Kapitel 1.2.3.8 ausführlich beschrieben – eine Verringerung der PI3K-AKT-Signalkaskade gezeigt werden, während PMP22-heterozygot-defiziente Tiere erhöhte PI3K-AKT-Mengen aufwiesen (Fledrich et al. 2014). Auch diese Beobachtungen könnten für eine von der PMP22-Expression abhängige CFLN-1-Funktionsregulation sprechen. Hier ist allerdings weiterhin offen, wie genau PMP22 den Signalweg beeinflussen könnte.

Auch an dieser Stelle könnte eine direkte Interaktion von PMP22 mit 14-3-3-Proteinen die molekulare Grundlage für die veränderte PI3K-AKT-Signalkaskade sein. Im Darmepithel wurde eine direkte Modulation der PI3K-AKT Signalkaskaden durch das Zusammenspiel verschiedener 14-3-3-Proteine beschrieben (Gómez-Suárez et al. 2016). So könnte eine durch PMP22 Überexpression bedingte veränderte Aktivität von 14-3-3-Proteinen zu einer Dysregulation der PI3K-AKT-Signalkaskade und so zu einer erhöhten CFLN-1-Dephosphorylierung führen. Denkbar ist aber auch eine direkte Interaktion von PMP22 mit CFLN-1, die wiederum zu einer Modulation der mit 14-3-3-Proteinen assoziierten Signalkaskaden und der PI3K-AKT-Signalwege führen könnte.

Ob PMP22 direkt oder indirekt mit CFLN-1 interagiert und ob das gliale NRG-1 diesen Signalweg beeinflusst, bleibt zu klären, zumal die meisten bisherigen CFLN-1-Funktionsmodulierenden Signalkaskaden nicht in Schwann-Zellen beschrieben wurden (bis auf die Arbeit von Sparrow et al. (2012)). Ungeachtet der genauen molekularen Mechanismen könnte ein durch PMP22-Expressionsveränderung dysfunktionales CFLN-1-Signaling in der Schwann-Zelle die Störung der Kontaktbildung zwischen Axon und Schwann-Zelle in der Entwicklung des peripheren Nervens sowie die Dysregulation der Aktin-Struktur adulter Nerven erklären. Weiterhin ist CFLN-1 nicht nur für die Struktur und Änderungen der Struktur von Zellen, sondern für andere biologische Zellfunktionen essenziell. So ist es in Zellkultur an der Aktivitätsregulation von den Transkriptionsfaktoren YAP/TAZ beteiligt (Aragona et al. 2013), deren Aktivität für die Entwicklung peripherer Nerven anhand ihrer Funktion für das *radial sorting* und die Regulation der Schwann-Zell-Proliferation offensichtlich ist (Pereira et al. 2012; Poitelon et al. 2016). Das *radial sorting* beschreibt einen Prozess während der Entwicklung des peripheren Nervens,

währenddessen die Axone in Abhängigkeit ihrer Größe den zu myelinisierenden bzw. nicht zu myelinisierenden Fasern durch Schwann-Zellen zugeordnet werden.

Außerdem ist eine Interaktion von CFLN-1 mit ATP1A1 beschrieben (Lee et al. 2001), das ebenfalls im spezifischen PMP22-IP-Eluat dieser Arbeit angereichert wurde. So könnte PMP22 mittelbar (über CFLN-1) oder unmittelbar mit ATP1A1 interagieren. Mutationen von ATP1A1 führen zur CMT2DD, einer axonalen Form der CMT (Lassuthova et al. 2018), was die Funktion dieses Proteins für den gesunden peripheren Nerv verdeutlicht. Die hier vermutete dysregulierte CFLN-1-Signalwirkung in PMP22 über- oder unterexprimierenden Schwann-Zellen könnte somit auch über die CFLN-1 vermittelte Interaktion von PMP22 mit ATP1A1 einen der molekularen Mechanismen des gestörten Schwann-Zell-Axon-Metabolismus bei der CMT1A (siehe 1.2.3.7) erklären. CFLN-1 stellt daher neben 14-3-3-Proteinen und PRX einen der vielversprechendsten Kandidaten für zukünftige Validierungsexperimente zur Untersuchung der Protein-Interaktionspartner von PMP22 dar. Die für diese Validierungen notwendigen weiteren Versuche sind in Kapitel 4.5.3 gemeinsam mit dem Ausblick für die Optimierung der hier angewandten Methoden beschrieben.

4.5 Limitationen der hier gezeigten Daten zu potentiellen *In-vivo*-Interaktionspartnern von PMP22

4.5.1 Der fehlende direkte Nachweis von mit PMP22 proteinquervernetzten Proteinen

Es ließen sich mithilfe der automatisierten Analyse mittels pLink2-Software keine Peptide identifizieren, die über BS3 direkt mit PMP22 assoziiert waren. Auch zeigten sich in den vorher angefertigten Western Blots der spezifischen IP-Eluate mit vorheriger Proteinquervernetzung keine hochmolekularen PMP22-haltigen Proteinspezies. Der fehlende direkte Nachweis der proteinquervernetzten PMP22-Proteinkomplexe im Western Blot bzw. per MS kann auf verschiedene Phänomene zurückzuführen sein, die entweder auf fehlender Nachweisbarkeit (trotz Vorhandenseins) oder auf tatsächlicher Abwesenheit dieser hochmolekularen PMP22-haltigen Proteinspezies beruhen können. Im Western Blot können Proteine bzw. Proteinverbände in Abhängigkeit der verwendeten Detektionsmethode aufgrund unter der Nachweisgrenze liegender Mengen mitunter nicht zur Darstellung kommen. So könnten auch in dieser Arbeit proteinquervernetzte PMP22-

Komplexe vorhanden, aber nicht nachweisbar gewesen sein. Auch in MS-Daten ist die fehlende Nachweisbarkeit von proteinquervernetzten Peptiden ein bekanntes Problem, wodurch die Auswertung der MS-Messungen von proteinquervernetzten Proben eine der größten Herausforderungen und meist das Nadelöhr dieser Versuche darstellt (Singh et al. 2010; Ramisetty und Washburn 2011; Yang et al. 2012). So schildert Rappsilber (2011), dass ein fehlender Nachweis nicht mit einer tatsächlichen Abwesenheit der gesuchten Peptide gleichzusetzen ist. Ein zugrundeliegender Mechanismus hierfür ist der vergrößerte Suchraum für Peptide, der durch das Hinzufügen der Proteinquervernetzer entsteht, sodass Schwierigkeiten bei der automatisierten Zuordnung der Peptidfragmente zu Peptiden und Proteinen entstehen (Ramisetty und Washburn 2011). Abbildung 4.2 (A) zeigt, dass bei Verwendung von Proteinquervernetzern sowohl proteinquervernetzte Proteine als auch Proteine ohne Assoziation zum Proteinquervernetzer identifiziert werden können. Die durch Proteinquervernetzung geschaffenen möglichen Protein-Protein-Verbindungen, die im Gegensatz zu linearen Peptiden eine aufwendigere und fehleranfälligere Analyse zur Protein-Identifizierung benötigen (Ramisetty und Washburn 2011), sind in Abbildung 4.2 (B) dargestellt.

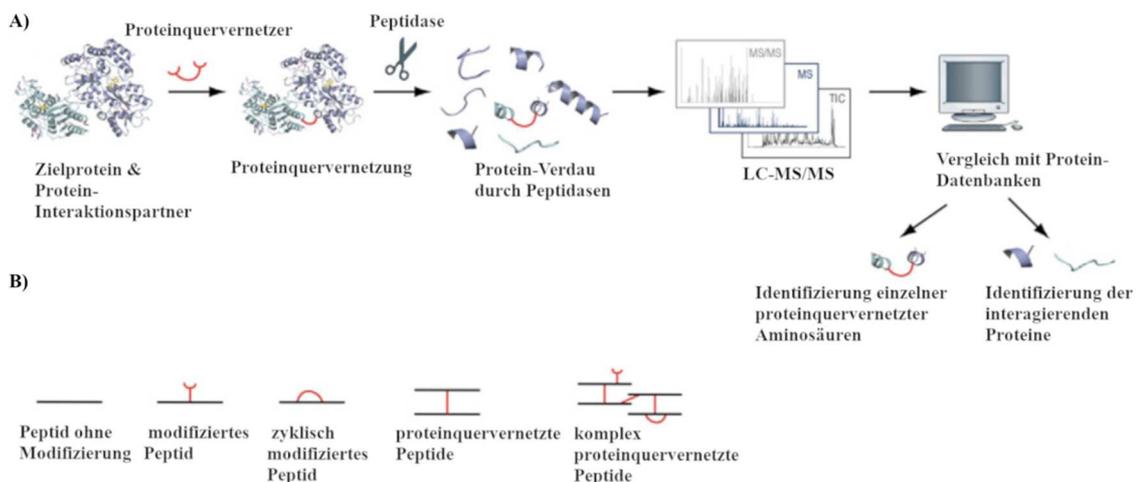


Abbildung 4.2: **Schematische Darstellung der Proteinquervernetzung und damit verbundene Modifikationen von Proteinstrukturen:** (A) Schematische Darstellung der Kombination aus Proteinquervernetzung und MS zur Identifizierung von Protein-Protein-Interaktionen hinsichtlich proteinquervernetzter Aminosäuren und interagierender Proteine. (B) Schematische Darstellung der durch Proteinquervernetzer möglichen Modifizierungen von Proteinen. Je nach Veränderung kann das Protein samt Interaktionspartner mittels Software-basierter Suche identifiziert werden oder der automatischen Analyse entgehen (Rappsilber 2011). Die Verwendung der Abbildung erfolgt über die Regelung der

Creative-Commons-Lizenz CC BY 3.0², die Abbildung wurde durch Ersetzen der englischen durch deutsche Bezeichnungen modifiziert.

Mit Etablierung der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten pLink- bzw. pLink2-Software ist jedoch ein Analyse-Instrument verfügbar geworden, das den beschriebenen Schwierigkeiten des großen Suchraums und der Komplexität der Peptidveränderungen begegnet. So können mittels pLink2-Software reguläre Peptide, einzeln-vernetzte Peptide, als *Loops* verlinkte Peptide und Peptide, die über einen Proteinquervernetzer miteinander verbunden sind, in einer Suche identifiziert werden (Yang et al. 2012; Fan et al. 2015; Chen et al. 2019). So erwies sich der Einsatz der pLink(2)-Software insbesondere bei Verwendung von BS3 als Proteinquervernetzer als erfolgreich zur Identifizierung von proteinquervernetzten Peptiden sowie den genauen Lokalisationen der Proteinquervernetzung (Linden et al. 2020; Ma et al. 2020; Wagner et al. 2020). Die Verknüpfung von Proteinquervernetzung, affinitätsbasierter Anreicherung des Zielproteins und MS hat sich somit durch stetige technische Verbesserungen der Detektionsmethoden zur *In-vivo*-Charakterisierung von Proteinkomplexen und deren intra- und intermolekularen Interaktionen erfolgreich gezeigt (Yu et al. 2016; Mashtalir et al. 2018; Wang und Huang 2018). Allerdings sind für eine erfolgreiche Suche nach proteinquervernetzten Peptiden mithilfe der pLink2-Software große Mengen an Ausgangsmaterial nötig, da unter optimalen Bedingungen nur ein geringer Teil der Proteine überhaupt proteinquervernetzt wird (siehe Abbildung 3.3 (A)) und genau diese dann detektiert werden müssen³. Es ist deshalb eine viel größere Ausgangsmenge an Material als die im Rahmen dieser Arbeit verwendete Menge (von ca. 70 µg pro Probe) nötig, um mithilfe von der pLink2-Software proteinquervernetzte Peptide in einer Probe zu identifizieren.

Es ist dennoch ebenso möglich, dass die Ursache des fehlenden Nachweises auf ein tatsächliches Fehlen der PMP22-haltigen hochmolekularen Proteinspezies im IP-Eluat der spezifischen PMP22-IP nach Proteinquervernetzung zurückzuführen ist und nicht auf die fehlende Nachweisbarkeit. Das Fehlen dieser Proteinspezies im IP-Eluat kann wiederum unterschiedliche Ursachen haben. Einerseits könnten die proteinquervernetzten Proteinkomplexe durch die eingesetzten Detergenzien nicht vollständig solubilisiert worden sein. Die Solubilisierungsversuche (siehe Kapitel 3.1.2) zeigten jedoch, dass

² URL: <https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/de/>; [URL abgerufen am 23.11.2020]

³ Diese Information verdanke ich Herrn Dr. Momchil Ninov, der mich am 04.05.2020 in einem Gespräch darauf hingewiesen hat.

durchaus proteinquervernetzte Proteine inklusive PMP22 nach Solubilisierung im Western Blot vorhanden waren. Diese Erklärung ist somit unwahrscheinlich. Eine andere Ursache könnte ein verändertes Bindungsverhalten des Anti-PMP22-Antikörpers an PMP22-Moleküle in den proteinquervernetzten Proteinkomplexen im Vergleich zur Bindung an die PMP22-Monomere sein, sodass sehr wenige bis keine PMP22-Antikörper an die proteinquervernetzten PMP22-Moleküle binden konnten. Die Proteinquervernetzung könnte auch die Bindestelle des Antikörpers unzugänglich machen und so eine Bindung vollständig verhindern. Wie in Abbildung 4.3 dargestellt, sollte der Anti-PMP22-Antikörper theoretisch an den C-Terminus von PMP22 und BS3 an die intrazellulären Lysine bzw. den N-Terminus (Sinz 2010) binden, sodass die Bindestelle für den Antikörper durch BS3 nicht direkt verlegt werden würde. Die genaue Ultrastruktur von PMP22 ist jedoch nicht bekannt, sodass die Abstände von den Lysinen zum C-Terminus des Proteins nicht berechnet werden können. Lysinreste haben eine flexible Seitenkettengröße von 6 \AA und das BS3-Molekül hat eine Abstandslänge von $11,4 \text{ \AA}$ (Sinz 2010; Yang et al. 2012), sodass vom Lysin ausgehend mind. ca. $17,4 \text{ \AA}$ durch das an PMP22 bindende BS3-Molekül „verdeckt“ werden. An das zweite Ende von BS3 ist idealerweise der Interaktionspartner von PMP22 gebunden. In Abhängigkeit von der Größe des potentiellen Interaktionspartners könnte auch der durch BS3 örtlich fixierte Interaktionspartner und nicht BS3 selbst die Bindestelle für den Antikörper verlegen. Die nicht-proteinquervernetzten PMP22-Monomere wären von dieser Blockade nicht betroffen und könnten weiterhin ungestört gebunden werden. Da sich nur PMP22-Monomere im IP-Eluat (mittels Western Blot) nachweisen ließen, erscheint diese Erklärung plausibel.

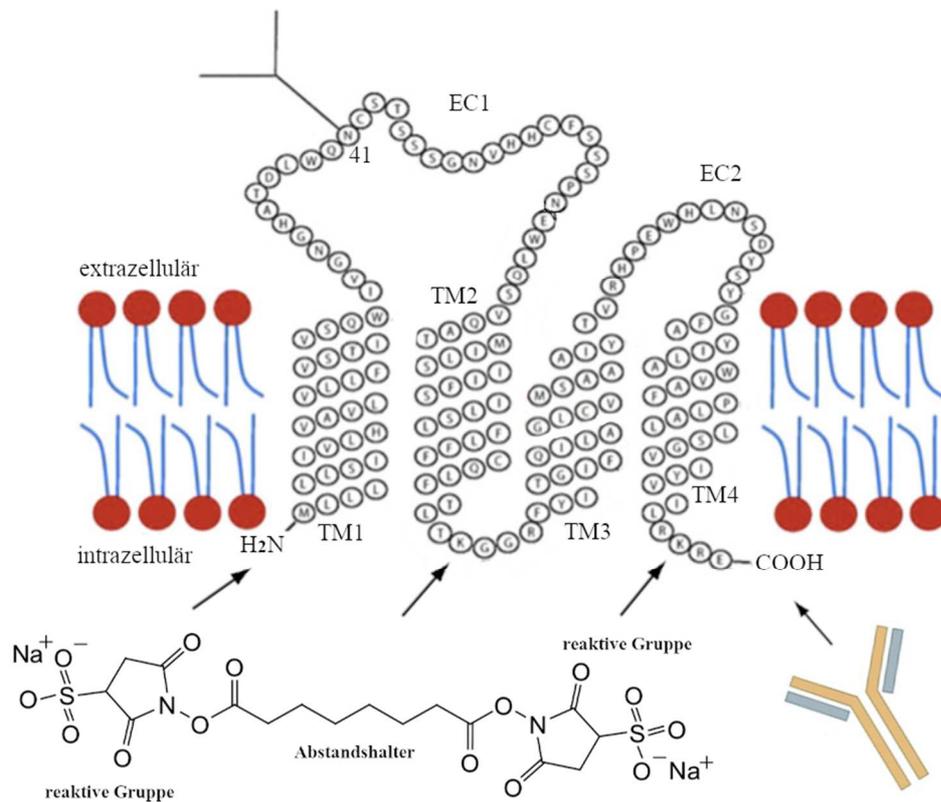


Abbildung 4.3: **Schematische Darstellung der Bindestellen von BS3 und dem Anti-PMP22-Antikörper am PMP22-Molekül:** BS3 ist ein homodimerer Proteinquervernetzer, der normalerweise an Lysin und den N-Terminus von Proteinen bindet (schwarze Pfeile). Der Anti-PMP22-Antikörper (gelb, grau) bindet an den C-Terminus von PMP22 (schwarzer Pfeil). Die genaue Struktur des PMP22-Moleküls ist nicht eindeutig bekannt, sodass der Abstand zwischen den Lysinen bzw. N-Terminus und dem C-Terminus nicht definitiv bestimmbar ist. Die durch BS3 gebundenen Proteine in der Nähe von PMP22 könnten ebenso die Bindestelle für den Antikörper blockieren. Die Abbildungen entstammen Wang et al. (2017), der Amboss GmbH⁴ und Thermo Fisher Scientific⁵. Die Verwendung der Abbildungen erfolgt mit freundlicher Genehmigung von John Wiley & Sons, der AMBOSS GmbH sowie Thermo Fisher Scientific.

Um diesem Problem zu begegnen könnte die Verwendung eines *zerolength*-Proteinquervernetzers wie in der Arbeit zur Interaktion von PRX und β 4-Integrin von Raasakka et al. (2019) infrage kommen, da eine kleinere Größe des Proteinquervernetzers weniger Einfluss auf andere Bindestellen des Proteins haben könnte. Allerdings wäre ein verändertes

⁴ Name der Abbildung: Funktion der Immunglobuline; Kapitel: spezifisches Immunsystem, URL: <https://next.amboss.com/de/article/p60LNS#Zc34f7aacdfc98d372ed9418d6b27b9d>; [Kapitel zuletzt aktualisiert am 16.10.2020, URL abgerufen am 18.11.2020]

⁵ Name der Abbildung: *Chemical Structure of BS3 crosslinking reagent*, URL: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/21580?SID=srch-hj-21580#/21580?SID=srch-hj-21580>; [URL abgerufen am 21.11.2020]

Antigen-Bindungsverhalten des Antikörpers oder eine Blockade der Antikörper-Bindungsstelle durch den örtlich fixierten Protein-Interaktionspartner auch durch Verwendung solch eines Proteinquervernetzters nicht ausgeschlossen.

4.5.2 Die Anzahl der Massenspektrometrie-Messungen und Abundanz der detektierten Proteine

Neben dem fehlenden direkten Nachweis von mit BS3 an PMP22 gebundenen Proteinen sind zwei weitere Aspekte zu diskutieren, welche die Aussagekraft der im Rahmen dieser Arbeit gezeigten potentiellen Interaktionspartner von PMP22 limitieren. Erstens ist die Anzahl der MS-Experimente für eine statistisch valide Aussage zu gering. Die MS-Messungen wurden für proteinquervernetzte Proben je einmal mit Trypsin und Chymotrypsin durchgeführt bzw. für nicht-proteinquervernetzte Proben je zweimal mit Trypsin und Chymotrypsin. Sie müssen daher vor dem Hintergrund betrachtet werden, dass es sich um zufällige und eventuell nicht reproduzierbare Daten handeln könnte. Da der Fokus dieser Arbeit auf der Etablierung des IP-Protokolls für mit BS3 proteinquervernetzte Ratten-Ischias-Homogenisate lag, wurde der Datensatz dennoch so aufgenommen und ist als Pilotexperiment für die folgenden darauf aufbauenden Versuche zu werten. Auch aufgrund der geringen Wiederholungsanzahl der Versuche wurden die in beiden IP-Listen vorkommenden Proteine als potentielle Interaktionspartner beschrieben, damit eine rein zufällig detektierte potentielle Interaktion weniger wahrscheinlich wird. Zweitens werden bei der MS in der Regel Proteine, die in hohen Mengen im Ausgangsmaterial vorhanden sind, auch in großen Mengen detektiert (Cox et al. 2014). Sie sind daher oft als Kontaminanten bzw. unspezifisch auftretende Proteine anzusehen. Man kann dieser Schwierigkeit auf verschiedene Arten begegnen, z.B. indem man die Daten auf die Menge von häufig vorkommenden Proteinen normalisiert (Subbotin und Chait 2014). Aufgrund von Material-Mangel wurde der *Input* der hier vermessenen IP-Eluate nicht mitvermessen. Eine für die Auswertung und v. a. den Vergleich der Anreicherungsmengen zwischen den IPs nötige Normalisierung dieser Daten auf die Menge im Ausgangsmaterial war daher leider nicht möglich. Die Literaturrecherche nach Proteom-Daten zu Ratten-Ischias-Nerven als Abhilfe für diese Limitation ergab wenige Ergebnisse. Arbeiten zum Myelin-Proteom in Mäusen (Patzig et al. 2011; Siems et al. 2020) boten zumindest Anhaltspunkte für die Mengen von im Myelin auffindbaren Proteinen und ließen eine Einordnung einiger der hier detektierten Proteine zu. So könnten (wie bereits erwähnt) MPZ und PRX nicht aufgrund ihrer Interaktion mit PMP22 sondern wegen hoher Abundanz im *Input* angereichert

sein. Diese Einschränkungen ließen sich im Rahmen dieser Arbeit leider nicht endgültig ausräumen.

4.5.3 Ausblick auf folgende Experimente

Aus den beschriebenen Limitationen der generierten Daten ergibt sich die Notwendigkeit, die hier detektierten potentiellen Interaktionspartner von PMP22 zu validieren. So ist an erster Stelle die Erhöhung der Anzahl der bisher durchgeführten IP-MS-Versuche inklusive Vermessung des *Inputs* zu nennen, um eine Normalisierung auf die Abundanz des jeweiligen Proteins im Homogenisat zu ermöglichen.

Um dem Problem der fehlenden Detektion von über BS3 mit PMP22 assoziierter Proteine zu begegnen, könnten verschiedene Wege eingeschlagen werden. Eine Möglichkeit wäre es, die IP nur aus sicher proteinquervernetzten Homogenisaten durchzuführen und hierfür das Homogenisat nach Solubilisierung mithilfe von Größenaufreinigungssäulen zu trennen. Nach der Solubilisierung und vor der IP waren anhand der Western Blots ja noch hochmolekulare PMP22-haltige Proteinspezies nachweisbar. Es muss hier aber auf die in Kapitel 4.5.1 diskutierten möglichen Einflüsse von BS3 auf die Antikörperbindung an PMP22 hingewiesen werden. Sollte das wirklich die Ursache für die fehlende Detektion von PMP22-BS3-Proteinen sein, würde die Größenaufreinigung vor der IP das Problem nicht lösen. Eine andere, schon oft angewendete Option, wäre es das proteinquervernetzte Homogenisat (ohne IP) direkt massenspektrometrisch zu vermessen und mittels pLink2 zu analysieren. So beschreiben viele Autoren die Verknüpfung von Proteinquervernetzung und MS als vielversprechendes Mittel zur Identifizierung von Protein-Protein-Interaktionen aus komplexen Proteinproben (Sinz 2006; Singh et al. 2010; Rappsilber 2011; Schmidt und Urlaub 2017). Die so identifizierten Proteine als potentielle Interaktionspartner von PMP22 könnten mittels Co-IP (und Colokalisationsexperimenten) bestätigt werden. Um die eingangs gestellte Frage nach der biologischen Funktion von PMP22 mithilfe der Identifikation von Protein-Protein-Interaktionen zu beantworten, sollten nähere Untersuchungen der interagierenden Proteine im Tiermodell z.B. mithilfe von Einzel- und Doppel-*knock-outs* Aufschluss geben. So könnten neue Therapieansätze, die auf das Wiederherstellen der physiologischen Funktion von PMP22 abzielen, für Patienten, die an der CMT1A-Erkrankung leiden, entwickelt werden.

5 Zusammenfassung

Die häufigste hereditäre Neuropathie, die Charcot-Marie-Tooth-Erkrankung Typ 1A, ist durch eine Duplikation des für das *peripheral myelin protein 22* (PMP22) codierenden Gens bedingt. Trotz jahrzehntelanger Forschung ist die Funktion des Transmembranproteins PMP22 und damit einhergehend der pathophysiologische Mechanismus der Erkrankung nach wie vor nicht endgültig entschlüsselt und es gibt bislang neben allgemeinen Therapiemaßnahmen nur wenig klinisch erprobte Wirkstoffe zur Behandlung. Um die biologische bzw. pathophysiologische Funktion eines Proteins zu entschlüsseln und somit neue Therapieansätze zu begründen, ist u. a. die Untersuchung der Protein-Protein-Interaktionen des Zielproteins sinnvoll.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher ein Protokoll zur Identifizierung von *In-vivo*-Interaktionspartnern von PMP22 im peripheren Nerven der Ratte entwickelt, welches auf Immunopräzipitation und anschließender Massenspektrometrie basierte. Um den Einsatz denaturierender Detergenzien zur Anreicherung des Transmembranproteins PMP22 vor der Immunopräzipitation zu ermöglichen und um transiente sowie schwache Protein-Protein-Interaktionen von PMP22 zu bewahren, wurde ein Proteinquervernetzungsschritt zur kovalenten Verknüpfung von PMP22 und dessen benachbarten Proteinen etabliert. Neben der Proteinquervernetzung wurde die Solubilisierung für PMP22 und die Immunopräzipitation selbst mit und ohne Proteinquervernetzung optimiert. Hierbei zeigten die verwendeten Detergenzien unterschiedliche Wirksamkeit und Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid war als einziges Detergenz in der Lage, PMP22 aus proteinquervernetzten Homogenisaten zu solubilisieren. In nicht-proteinquervernetzten Proben zeigte Dodecyl- β -D-maltosid das beste Solubilisierungsergebnis. Die Immunopräzipitationsprotokolle wurden durch Optimierung des Einsatzes von Antikörpermengen und *Dynabeads* etabliert. Die durch die optimierten Immunopräzipitationsverfahren gewonnenen Proben aus Ratten-Ischias-Nerven wurden dann massenspektrometrisch vermessen, um erstmalig das gesamte Interaktom von PMP22 zu untersuchen. Die Analyse der probatorischen Massenspektrometrie-Ergebnisse legte eine Funktion von PMP22 bzw. dessen Interaktionspartnern für Zell-Zell-Adhäsionen, Fokal-Adhäsionen und das Aktin-Zytoskelett sowie für die Regulation intrazellulärer Signalkaskaden nahe. Konkret wurden u. a. *myelin protein zero*, Periaxin, 14-3-3-Proteine und das Aktin-bindende Protein Cofilin-1 spezifisch in den PMP22-Immunopräzipitationen angereichert. Interaktionen von PMP22 mit *myelin protein zero*

und Periaxin könnten die Funktion von PMP22 als Myelinarchitektur-Stabilisator erklären, während die Interaktion von PMP22 mit 14-3-3-Proteinen und/oder Cofilin-1 die molekularen Korrelate der bei der Charcot-Marie-Tooth-1A-Erkrankung gestörten Schwann-Zell-Ausrichtung, Formgebung und Polarisierung in der Entwicklung des Ischias-Nerven darstellen könnten. Mithilfe des im Rahmen dieser Arbeit etablierten Protokolls und der für PMP22 etablierten Proteinquervernetzung sollte es in folgenden Arbeiten möglich sein, die hier diskutierten Interaktionspartner zu validieren und somit neue Therapieansätze zur Behandlung der Charcot-Marie-Tooth-1A-Erkrankung zu begründen.

6 Literaturverzeichnis

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

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

Aebersold R, Mann M (2003): Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* 422, 198–207

Agnew BJ, Minamide LS, Bamberg JR (1995): Reactivation of phosphorylated actin depolymerizing factor and identification of the regulatory site. *J Biol Chem* 270, 17582–17587

Amici SA, Dunn WA, Murphy AJ, Adams NC, Gale NW, Valenzuela DM, Yancopoulos GD, Notterpek L (2006): Peripheral myelin protein 22 is in complex with alpha6beta4 integrin, and its absence alters the Schwann cell basal lamina. *J Neurosci* 26, 1179–1189

Aragona M, Panciera T, Manfrin A, Giulitti S, Michielin F, Elvassore N, Dupont S, Piccolo S (2013): A mechanical checkpoint controls multicellular growth through YAP/TAZ regulation by actin-processing factors. *Cell* 154, 1047–1059

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

Baechner D, Liehr T, Hameister H, Altenberger H, Grehl H, Suter U, Rautenstrauss B (1995): Widespread expression of the peripheral myelin protein-22 gene (PMP22) in neural and non-neural tissues during murine development. *J Neurosci Res* 42, 733–741

Bamberg JR (1999): Proteins of the ADF/cofilin family: essential regulators of actin dynamics. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15, 185–230

Bamberg JR, Wiggan OP (2002): ADF/cofilin and actin dynamics in disease. *Trends Cell Biol* 12, 598–605

Bavassano C, Marvaldi L, Langeslag M, Sarg B, Lindner H, Klimaschewski L, Kress M, Ferrer-Montiel A, Knaus HG (2013): Identification of voltage-gated K(+) channel beta 2 (Kvβ2) subunit as a novel interaction partner of the pain transducer Transient Receptor Potential Vanilloid 1 channel (TRPV1). *Biochim Biophys Acta* 1833, 3166–3175

- Bello-Morales R, Pérez-Hernández M, Rejas MT, Matesanz F, Alcina A, López-Guerrero JA (2011): Interaction of PLP with GFP-MAL2 in the Human Oligodendroglial Cell Line HOG. *PLoS One* 6, e19388
- Berciano MT, Calle E, Fernández R, Lafarga M (1998): Regulation of Schwann cell numbers in tellurium-induced neuropathy: apoptosis, supernumerary cells and internodal shortening. *Acta Neuropathol* 95, 269–279
- Berger P, Niemann A, Suter U (2006): Schwann cells and the pathogenesis of inherited motor and sensory neuropathies (Charcot-Marie-Tooth disease). *Glia* 54, 243–257
- Bernstein BW, Bamberg JR (2010): ADF/cofilin: a functional node in cell biology. *Trends Cell Biol* 20, 187–195
- Bielow C, Mastrobuoni G, Kempa S (2016): Proteomics Quality Control: Quality Control Software for MaxQuant Results. *J Proteome Res* 15, 777–787
- Birouk N, Gouider R, Le Guern E, Gugenheim M, Tardieu S, Maisonobe T, Le Forestier N, Agid Y, Brice A, Bouche P (1997): Charcot-Marie-Tooth disease type 1A with 17p11.2 duplication. Clinical and electrophysiological phenotype study and factors influencing disease severity in 119 cases. *Brain* 120, 813–823
- Bonifacino JS, Gershlick DC, Dell'Angelica EC (2016): Immunoprecipitation. *Curr Protoc Cell Biol* 71, 7.2.1-7.2.24
- Bosse F, Zoidl G, Wilms S, Gillen CP, Kuhn HG, Müller HW (1994): Differential expression of two mRNA species indicates a dual function of peripheral myelin protein PMP22 in cell growth and myelination. *J Neurosci Res* 37, 529–537
- Carenini S, Neuberg D, Schachner M, Suter U, Martini R (1999): Localization and functional roles of PMP22 in peripheral nerves of P0-deficient mice. *Glia* 28, 256–264
- Chance PF, Bird TD, Matsunami N, Lensch MW, Brothman AR, Feldman GM (1992): Trisomy 17p associated with Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 1A phenotype: evidence for gene dosage as a mechanism in CMT1A. *Neurology* 42, 2295–2299
- Chance PF, Alderson MK, Leppig KA, Lensch MW, Matsunami N, Smith B, Swanson PD, Odelberg SJ, Distèche CM, Bird TD (1993): DNA deletion associated with hereditary neuropathy with liability to pressure palsies. *Cell* 72, 143–151
- Chang CC, Chow CC, Tellier LC, Vattikuti S, Purcell SM, Lee JJ (2015): Second-generation PLINK: rising to the challenge of larger and richer datasets. *Gigascience* 4, 7

- Chavez JD, Bruce JE (2019): Chemical cross-linking with mass spectrometry: a tool for systems structural biology. *Curr Opin Chem Biol* 48, 8–18
- Chavez JD, Schweppe DK, Eng JK, Zheng C, Taipale A, Zhang Y, Takara K, Bruce JE (2015): Quantitative interactome analysis reveals a chemoresistant edgotype. *Nat Commun* 6, 7928
- Chen ZA, Jawhari A, Fischer L, Buchen C, Tahir S, Kamenski T, Rasmussen M, Lariviere L, Bukowski-Wills JC, Nilges M, et al. (2010): Architecture of the RNA polymerase II-TFIIF complex revealed by cross-linking and mass spectrometry. *EMBO J* 29, 717–726
- Chen ZL, Meng JM, Cao Y, Yin JL, Fang RQ, Fan SB, Liu C, Zeng WF, Ding YH, Tan D, et al. (2019): A high-speed search engine pLink 2 with systematic evaluation for proteome-scale identification of cross-linked peptides. *Nat Commun* 10, 3404
- Colby J, Nicholson R, Dickson KM, Orfali W, Naef R, Suter U, Snipes GJ (2000): PMP22 carrying the trembler or trembler-J mutation is intracellularly retained in myelinating Schwann cells. *Neurobiol Dis* 7, 561–573
- Cornell B, Toyooka K (2017): 14-3-3 Proteins in Brain Development: Neurogenesis, Neuronal Migration and Neuromorphogenesis. *Front Mol Neurosci* 10, 318
- Court FA, Sherman DL, Pratt T, Garry EM, Ribchester RR, Cottrell DF, Fleetwood-Walker SM, Brophy PJ (2004): Restricted growth of Schwann cells lacking Cajal bands slows conduction in myelinated nerves. *Nature* 431, 191–195
- Court FA, Hewitt JE, Davies K, Patton BL, Uncini A, Wrabetz L, Feltri ML (2009): A laminin-2, dystroglycan, utrophin axis is required for compartmentalization and elongation of myelin segments. *J Neurosci* 29, 3908–3919
- Cox J, Mann M (2008): MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat Biotechnol* 26, 1367–1372
- Cox J, Neuhauser N, Michalski A, Scheltema RA, Olsen JV, Mann M (2011): Andromeda: a peptide search engine integrated into the MaxQuant environment. *J Proteome Res* 10, 1794–1805
- Cox J, Hein MY, Lubner CA, Paron I, Nagaraj N, Mann M (2014): Accurate proteome-wide label-free quantification by delayed normalization and maximal peptide ratio extraction, termed MaxLFQ. *Mol Cell Proteomics* 13, 2513–2526

- Dickson KM, Bergeron JJM, Shames I, Colby J, Nguyen DT, Chevet E, Thomas DY, Snipes GJ (2002): Association of calnexin with mutant peripheral myelin protein-22 ex vivo: a basis for „gain-of-function“ ER diseases. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 9852–9857
- Domènech-Estévez E, Baloui H, Meng X, Zhang Y, Deinhardt K, Dupree JL, Einheber S, Chrast R, Salzer JL (2016): Akt Regulates Axon Wrapping and Myelin Sheath Thickness in the PNS. *J Neurosci* 36, 4506–4521
- Dranchak P, Moran JJ, MacArthur R, Lopez-Anido C, Inglese J, Svaren J (2018): Genome-Edited Cell Lines for High-Throughput Screening. *Methods Mol Biol* 1755, 1–17
- Duquesne K, Prima V, Sturgis JN (2016): Membrane Protein Solubilization and Composition of Protein Detergent Complexes. *Methods Mol Biol* 1432, 243–260
- D’Urso D, Müller HW (1997): Ins and outs of peripheral myelin protein-22: mapping transmembrane topology and intracellular sorting. *J Neurosci Res* 49, 551–562
- D’Urso D, Ehrhardt P, Müller HW (1999): Peripheral myelin protein 22 and protein zero: a novel association in peripheral nervous system myelin. *J Neurosci* 19, 3396–3403
- Fan SB, Meng JM, Lu S, Zhang K, Yang H, Chi H, Sun RX, Dong MQ, He SM (2015): Using pLink to Analyze Cross-Linked Peptides. *Curr Protoc Bioinformatics* 49, 8.21.1-8.21.19
- Fang L, Kaake RM, Patel VR, Yang Y, Baldi P, Huang L (2012): Mapping the protein interaction network of the human COP9 signalosome complex using a label-free QTAX strategy. *Mol Cell Proteomics* 11, 138–147
- Feltri ML, Scherer SS, Nemni R, Kamholz J, Vogelbacker H, Scott MO, Canal N, Quaranta V, Wrabetz L (1994): Beta 4 integrin expression in myelinating Schwann cells is polarized, developmentally regulated and axonally dependent. *Development* 120, 1287–1301
- Fields S, Sternglanz R (1994): The two-hybrid system: an assay for protein-protein interactions. *Trends Genet* 10, 286–292
- Filbin MT, Walsh FS, Trapp BD, Pizzey JA, Tennekoon GI (1990): Role of myelin P0 protein as a homophilic adhesion molecule. *Nature* 344, 871–872

- Fledrich R, Schlotter-Weigel B, Schnizer TJ, Wichert SP, Stassart RM, Meyer zu Hörste G, Klink A, Weiss BG, Haag U, Walter MC, et al. (2012): A rat model of Charcot-Marie-Tooth disease 1A recapitulates disease variability and supplies biomarkers of axonal loss in patients. *Brain* 135, 72–87
- Fledrich R, Stassart RM, Klink A, Rasch LM, Prukop T, Haag L, Czesnik D, Kungl T, Abdelaal TAM, Keric N, et al. (2014): Soluble neuregulin-1 modulates disease pathogenesis in rodent models of Charcot-Marie-Tooth disease 1A. *Nat Med* 20, 1055–1061
- Fledrich R, Abdelaal T, Rasch L, Bansal V, Schütza V, Brügger B, Lüchtenborg C, Prukop T, Stenzel J, Rahman RU, et al. (2018): Targeting myelin lipid metabolism as a potential therapeutic strategy in a model of CMT1A neuropathy. *Nat Commun* 9, 3025
- Fledrich R, Akkermann D, Schütza V, Abdelaal TA, Hermes D, Schöffner E, Soto-Bernardini MC, Götze T, Klink A, Kusch K, et al. (2019): NRG1 type I dependent autocrine stimulation of Schwann cells in onion bulbs of peripheral neuropathies. *Nat Commun* 10, 1467
- Flores AI, Narayanan SP, Morse EN, Shick HE, Yin X, Kidd G, Avila RL, Kirschner DA, Macklin WB (2008): Constitutively active Akt induces enhanced myelination in the CNS. *J Neurosci* 28, 7174–7183
- Fortun J, Dunn WA, Joy S, Li J, Notterpek L (2003): Emerging role for autophagy in the removal of aggregates in Schwann cells. *J Neurosci* 23, 10672–10680
- Fortun J, Go JC, Li J, Amici SA, Dunn WA, Notterpek L (2006): Alterations in degradative pathways and protein aggregation in a neuropathy model based on PMP22 overexpression. *Neurobiol Dis* 22, 153–164
- Fowler S, Akins M, Bennett SAL (2016): Preparation of Gap Junctions in Membrane Microdomains for Immunoprecipitation and Mass Spectrometry Interactome Analysis. *Methods Mol Biol* 1437, 113–132
- Gabreëls-Festen AA, Bolhuis PA, Hoogendijk JE, Valentijn LJ, Eshuis EJ, Gabreëls FJ (1995): Charcot-Marie-Tooth disease type 1A: morphological phenotype of the 17p duplication versus PMP22 point mutations. *Acta Neuropathol* 90, 645–649

- Gabriel JM, Erne B, Pareyson D, Sghirlanzoni A, Taroni F, Steck AJ (1997): Gene dosage effects in hereditary peripheral neuropathy. Expression of peripheral myelin protein 22 in Charcot-Marie-Tooth disease type 1A and hereditary neuropathy with liability to pressure palsies nerve biopsies. *Neurology* 49, 1635–1640
- Giambonini-Brugnoli G, Buchstaller J, Sommer L, Suter U, Mantei N (2005): Distinct disease mechanisms in peripheral neuropathies due to altered peripheral myelin protein 22 gene dosage or a Pmp22 point mutation. *Neurobiol Dis* 18, 656–668
- 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, 565–576
- Gillespie CS, Sherman DL, Blair GE, Brophy PJ (1994): Periaxin, a novel protein of myelinating Schwann cells with a possible role in axonal ensheathment. *Neuron* 12, 497–508
- Gillespie CS, Sherman DL, Fleetwood-Walker SM, Cottrell DF, Tait S, Garry EM, Wallace VC, Ure J, Griffiths IR, Smith A, Brophy PJ (2000): Peripheral demyelination and neuropathic pain behavior in periaxin-deficient mice. *Neuron* 26, 523–531
- Gohla A, Bokoch GM (2002): 14-3-3 regulates actin dynamics by stabilizing phosphorylated cofilin. *Curr Biol* 12, 1704–1710
- Gómez-Suárez M, Gutiérrez-Martínez IZ, Hernández-Trejo JA, Hernández-Ruiz M, Suárez-Pérez D, Candelario A, Kamekura R, Medina-Contreras O, Schnoor M, Ortiz-Navarrete V, et al. (2016): 14-3-3 Proteins regulate Akt Thr308 phosphorylation in intestinal epithelial cells. *Cell Death Differ* 23, 1060–1072
- Gridley S, Lane WS, Garner CW, Lienhard GE (2005): Novel insulin-elicited phosphoproteins in adipocytes. *Cell Signal* 17, 59–66
- Gudz TI, Schneider TE, Haas TA, Macklin WB (2002): Myelin proteolipid protein forms a complex with integrins and may participate in integrin receptor signaling in oligodendrocytes. *J Neurosci* 22, 7398–7407
- Guerrero C, Tagwerker C, Kaiser P, Huang L (2006): An integrated mass spectrometry-based proteomic approach: quantitative analysis of tandem affinity-purified in vivo cross-linked protein complexes (QTAX) to decipher the 26 S proteasome-interacting network. *Mol Cell Proteomics* 5, 366–378

- Guilbot A, Williams A, Ravisé N, Verny C, Brice A, Sherman DL, Brophy PJ, LeGuern E, Delague V, Bareil C, et al. (2001): A mutation in periaxin is responsible for CMT4F, an autosomal recessive form of Charcot-Marie-Tooth disease. *Hum Mol Genet* 10, 415–421
- Guo J, Wang L, Zhang Y, Wu J, Arpag S, Hu B, Imhof BA, Tian X, Carter BD, Suter U, Li J (2014): Abnormal junctions and permeability of myelin in PMP22-deficient nerves. *Ann Neurol* 75, 255–265
- Guo T, Zhang L, Xiao H, Yang Y, Shi Y (2020): Ezrin interacts with L-periaxin by the „head to head and tail to tail“ mode and influences the location of L-periaxin in Schwann cell RSC96. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 1864, 129520
- Hagedorn L, Suter U, Sommer L (1999): P0 and PMP22 mark a multipotent neural crest-derived cell type that displays community effects in response to TGF-beta family factors. *Development* 126, 3781–3794
- Hammer JA, O’Shannessy DJ, De Leon M, Gould R, Zand D, Daune G, Quarles RH (1993): Immunoreactivity of PMP-22, P0, and other 19 to 28 kDa glycoproteins in peripheral nerve myelin of mammals and fish with HNK1 and related antibodies. *J Neurosci Res* 35, 546–558
- Han L, Stope MB, de Jesús ML, Oude Weernink PA, Urban M, Wieland T, Roskopf D, Mizuno K, Jakobs KH, Schmidt M (2007): Direct stimulation of receptor-controlled phospholipase D1 by phospho-cofilin. *EMBO J* 26, 4189–4202
- Hanemann CO, Rosenbaum C, Kupfer S, Wosch S, Stoegbauer F, Müller HW (1998): Improved culture methods to expand Schwann cells with altered growth behaviour from CMT1A patients. *Glia* 23, 89–98
- Hara T, Hashimoto Y, Akuzawa T, Hirai R, Kobayashi H, Sato K (2014): Rer1 and calnexin regulate endoplasmic reticulum retention of a peripheral myelin protein 22 mutant that causes type 1A Charcot-Marie-Tooth disease. *Sci Rep* 4, 6992
- Hasse B, Bosse F, Hanenberg H, Müller HW (2004): Peripheral myelin protein 22 kDa and protein zero: domain specific trans-interactions. *Mol Cell Neurosci* 27, 370–378
- Hirt N, Eggermann K, Hyrenbach S, Lambeck J, Busche A, Fischer J, Rudnik-Schöneborn S, Gaspar H (2015): Genetic dosage compensation via co-occurrence of PMP22 duplication and PMP22 deletion. *Neurology* 84, 1605–1606

- Hotulainen P, Paunola E, Vartiainen MK, Lappalainen P (2005): Actin-depolymerizing factor and cofilin-1 play overlapping roles in promoting rapid F-actin depolymerization in mammalian nonmuscle cells. *Mol Biol Cell* 16, 649–664
- Hu B, Arpag S, Zhang X, Möbius W, Werner H, Sosinsky G, Ellisman M, Zhang Y, Hamilton A, Chernoff J, Li J (2016): Tuning PAK Activity to Rescue Abnormal Myelin Permeability in HNPP. *PLoS Genet* 12, e1006290
- Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA (2009a): Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res* 37, 1–13
- Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA (2009b): Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* 4, 44–57
- Hulsen T, de Vlieg J, Alkema W (2008): BioVenn - a web application for the comparison and visualization of biological lists using area-proportional Venn diagrams. *BMC Genomics* 9, 488
- Inglese J, Dranchak P, Moran JJ, Jang S-W, Srinivasan R, Santiago Y, Zhang L, Guha R, Martinez N, MacArthur R, et al. (2014): Genome editing-enabled HTS assays expand drug target pathways for Charcot-Marie-tooth disease. *ACS Chem Biol* 9, 2594–2602
- Ionasescu VV (1995): Charcot-Marie-Tooth neuropathies: from clinical description to molecular genetics. *Muscle Nerve* 18, 267–275
- Jahn O, Tenzer S, Werner HB (2009): Myelin proteomics: molecular anatomy of an insulating sheath. *Mol Neurobiol* 40, 55–72
- Jang SW, Lopez-Anido C, MacArthur R, Svaren J, Inglese J (2012): Identification of drug modulators targeting gene-dosage disease CMT1A. *ACS Chem Biol* 7, 1205–1213
- Jessen KR, Mirsky R (2005): The origin and development of glial cells in peripheral nerves. *Nat Rev Neurosci* 6, 671–682
- Jetten AM, Suter U (2000): The peripheral myelin protein 22 and epithelial membrane protein family. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 64, 97–129
- Johnsson N, Varshavsky A (1994): Split ubiquitin as a sensor of protein interactions in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 10340–10344
- Jones EA, Lopez-Anido C, Srinivasan R, Krueger C, Chang LW, Nagarajan R, Svaren J (2011): Regulation of the PMP22 gene through an intronic enhancer. *J Neurosci* 31,

4242–4250

Jones EA, Brewer MH, Srinivasan R, Krueger C, Sun G, Charney KN, Keles S, Antonellis A, Svaren J (2012): Distal enhancers upstream of the Charcot-Marie-Tooth type 1A disease gene PMP22. *Hum Mol Genet* 21, 1581–1591

Kaboord B, Perr M (2008): Isolation of proteins and protein complexes by immunoprecipitation. *Methods Mol Biol* 424, 349–364

Kaku DA, Parry GJ, Malamut R, Lupski JR, Garcia CA (1993): Nerve conduction studies in Charcot-Marie-Tooth polyneuropathy associated with a segmental duplication of chromosome 17. *Neurology* 43, 1806–1808

Kinter J, Lazzati T, Schmid D, Zeis T, Erne B, Lützelshwab R, Steck AJ, Pareyson D, Peles E, Schaeren-Wiemers N (2013): An essential role of MAG in mediating axon-myelin attachment in Charcot-Marie-Tooth 1A disease. *Neurobiol Dis* 49, 221–231

Kligys K, Claiborne JN, DeBiase PJ, Hopkinson SB, Wu Y, Mizuno K, Jones JCR (2007): The slingshot family of phosphatases mediates Rac1 regulation of cofilin phosphorylation, laminin-332 organization, and motility behavior of keratinocytes. *J Biol Chem* 282, 32520–32528

Kligys K, Yao J, Yu D, Jones JCR (2009): 14-3-3zeta/tau heterodimers regulate Slingshot activity in migrating keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 383, 450–454

Köcher T, Superti-Furga G (2007): Mass spectrometry-based functional proteomics: from molecular machines to protein networks. *Nat Methods* 4, 807–815

Krajewski KM, Lewis RA, Fuerst DR, Turansky C, Hinderer SR, Garbern J, Kamholz J, Shy ME (2000): Neurological dysfunction and axonal degeneration in Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Brain* 123, 1516–1527

Kun A, Canclini L, Rosso G, Bresque M, Romeo C, Hanusz A, Cal K, Calliari A, Sotelo Silveira J, Sotelo JR (2012): F-actin distribution at nodes of Ranvier and Schmidt-Lanterman incisures in mammalian sciatic nerves. *Cytoskeleton (Hoboken)* 69, 486–495

Laemmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685

Lassuthova P, Rebelo AP, Ravenscroft G, Lamont PJ, Davis MR, Manganelli F, Feely SM, Bacon C, Brožková DŠ, Haberlova J, et al. (2018): Mutations in ATP1A1 Cause Dominant Charcot-Marie-Tooth Type 2. *Am J Hum Genet* 102, 505–514

- Le Maire M, Champeil P, Moller JV (2000): Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents. *Biochim Biophys Acta* 1508, 86–111
- Lee K, Jung J, Kim M, Guidotti G (2001): Interaction of the alpha subunit of Na,K-ATPase with cofilin. *Biochem J* 353, 377–385
- Lee S, Amici S, Tavori H, Zeng WM, Freeland S, Fazio S, Notterpek L (2014): PMP22 is critical for actin-mediated cellular functions and for establishing lipid rafts. *J Neurosci* 34, 16140–16152
- Lee YC, Bååth JA, Bastle RM, Bhattacharjee S, Cantoria MJ, Dornan M, Gamero-Estevéz E, Ford L, Halova L, Kernan J, et al. (2018): Impact of Detergents on Membrane Protein Complex Isolation. *J Proteome Res* 17, 348–358
- Li J (2017): Caveats in the Established Understanding of CMT1A. *Ann Clin Transl Neurol* 4, 601–607
- Li J, Parker B, Martyn C, Natarajan C, Guo J (2013): The PMP22 gene and its related diseases. *Mol Neurobiol* 47, 673–698
- Lichtenberg D, Ahyayauch H, Goñi FM (2013): The mechanism of detergent solubilization of lipid bilayers. *Biophys J* 105, 289–299
- Lin JS, Lai EM (2017): Protein-Protein Interactions: Co-Immunoprecipitation. *Methods Mol Biol* 1615, 211–219
- Linden A, Deckers M, Parfentev I, Pflanz R, Homberg B, Neumann P, Ficner R, Rehling P, Urlaub H (2020): A cross-linking mass spectrometry approach defines protein interactions in yeast mitochondria. *Mol Cell Proteomics* 19, 1161–1178
- Linke D (2009): Detergents: an overview. *Meth Enzymol* 463, 603–617
- Liu F, Rijkers DTS, Post H, Heck AJR (2015): Proteome-wide profiling of protein assemblies by cross-linking mass spectrometry. *Nat Methods* 12, 1179–1184
- Lopez-Anido C, Poitelon Y, Gopinath C, Moran JJ, Ma KH, Law WD, Antonellis A, Feltri ML, Svaren J (2016): Tead1 regulates the expression of Peripheral Myelin Protein 22 during Schwann cell development. *Hum Mol Genet* 25, 3055–3069
- Lupski JR, Chance PF: Hereditary Motor and Sensory Neuropathies Involving Altered Dosage or Mutation of PMP22: The CMT1A Duplication and HNPP Deletion. In: Dyck PJ, Thomas PK (Hrsg.): *Peripheral Neuropathy*. 4. Auflage; Elsevier, Philadelphia, Pennsylvania 2005, 1659–1680

- Lupski JR, de Oca-Luna RM, Slaugenhaupt S, Pentao L, Guzzetta V, Trask BJ, Saucedo-Cardenas O, Barker DF, Killian JM, Garcia CA, et al. (1991): DNA duplication associated with Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Cell* 66, 219–232
- Lupski JR, Wise CA, Kuwano A, Pentao L, Parke JT, Glaze DG, Ledbetter DH, Greenberg F, Patel PI (1992): Gene dosage is a mechanism for Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Nat Genet* 1, 29–33
- Ma X, Zhu Y, Lu J, Xie J, Li C, Shin WS, Qiang J, Liu J, Dou S, Xiao Y, et al. (2020): Nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase uses its NAD⁺ substrate-binding site to chaperone phosphorylated Tau. *Elife* 9, e51859
- Maier M, Berger P, Nave KA, Suter U (2002): Identification of the regulatory region of the peripheral myelin protein 22 (PMP22) gene that directs temporal and spatial expression in development and regeneration of peripheral nerves. *Mol Cell Neurosci* 20, 93–109
- Maier M, Castagner F, Berger P, Suter U (2003): Distinct elements of the peripheral myelin protein 22 (PMP22) promoter regulate expression in Schwann cells and sensory neurons. *Mol Cell Neurosci* 24, 803–817
- Makowski MM, Willems E, Jansen PWTC, Vermeulen M (2016): Cross-linking immunoprecipitation-MS (xIP-MS): Topological Analysis of Chromatin-associated Protein Complexes Using Single Affinity Purification. *Mol Cell Proteomics* 15, 854–865
- Manganelli F, Pisciotta C, Reilly MM, Tozza S, Schenone A, Fabrizi GM, Cavallaro T, Vita G, Padua L, Gemignani F, et al. (2016): Nerve conduction velocity in CMT1A: what else can we tell? *Eur J Neurol* 23, 1566–1571
- Marchesi C, Milani M, Morbin M, Cesani M, Lauria G, Scaioli V, Piccolo G, Fabrizi GM, Cavallaro T, Taroni F, Pareyson D (2010): Four novel cases of periaxin-related neuropathy and review of the literature. *Neurology* 75, 1830–1838
- Mashtalir N, D'Avino AR, Michel BC, Luo J, Pan J, Otto JE, Zullo HJ, McKenzie ZM, Kubiak RL, St Pierre R, et al. (2018): Modular Organization and Assembly of SWI/SNF Family Chromatin Remodeling Complexes. *Cell* 175, 1272–1288.e20

- Matsunami N, Smith B, Ballard L, Lensch MW, Robertson M, Albertsen H, Hanemann CO, Müller HW, Bird TD, White R (1992): Peripheral myelin protein-22 gene maps in the duplication in chromosome 17p11.2 associated with Charcot-Marie-Tooth 1A. *Nat Genet* 1, 176–179
- McLaughlin M, Hunter DJB, Thomson CE, Yool D, Kirkham D, Freer AA, Griffiths IR (2002): Evidence for possible interactions between PLP and DM20 within the myelin sheath. *Glia* 39, 31–36
- Meyer K, Selbach M (2015): Quantitative affinity purification mass spectrometry: a versatile technology to study protein-protein interactions. *Front Genet* 6, 237
- Mittendorf KF, Kroncke BM, Meiler J, Sanders CR (2014): The homology model of PMP22 suggests mutations resulting in peripheral neuropathy disrupt transmembrane helix packing. *Biochemistry* 53, 6139–6141
- Mittendorf KF, Marinko JT, Hampton CM, Ke Z, Hadziselimovic A, Schleich JP, Law CL, Li J, Wright ER, Sanders CR, Ohi MD (2017): Peripheral myelin protein 22 alters membrane architecture. *Sci Adv* 3, e1700220
- Mizuno K (2013): Signaling mechanisms and functional roles of cofilin phosphorylation and dephosphorylation. *Cell Signal* 25, 457–469
- Mobley CK, Myers JK, Hadziselimovic A, Ellis CD, Sanders CR (2007): Purification and initiation of structural characterization of human peripheral myelin protein 22, an integral membrane protein linked to peripheral neuropathies. *Biochemistry* 46, 11185–11195
- Moon A, Drubin DG (1995): The ADF/cofilin proteins: stimulus-responsive modulators of actin dynamics. *Mol Biol Cell* 6, 1423–1431
- Moriyama K, Iida K, Yahara I (1996): Phosphorylation of Ser-3 of cofilin regulates its essential function on actin. *Genes Cells* 1, 73–86
- Mostacciolo ML, Micaglio G, Fardin P, Danieli GA (1991): Genetic epidemiology of hereditary motor sensory neuropathies (type I). *Am J Med Genet* 39, 479–481
- Myers JK, Mobley CK, Sanders CR (2008): The peripheral neuropathy-linked Trembler and Trembler-J mutant forms of peripheral myelin protein 22 are folding-destabilized. *Biochemistry* 47, 10620–10629

- Naef R, Suter U (1999): Impaired intracellular trafficking is a common disease mechanism of PMP22 point mutations in peripheral neuropathies. *Neurobiol Dis* 6, 1–14
- Nagata-Ohashi K, Ohta Y, Goto K, Chiba S, Mori R, Nishita M, Ohashi K, Kousaka K, Iwamatsu A, Niwa R, et al. (2004): A pathway of neuregulin-induced activation of cofilin-phosphatase Slingshot and cofilin in lamellipodia. *J Cell Biol* 165, 465–471
- Napoli I, Noon LA, Ribeiro S, Kerai AP, Parrinello S, Rosenberg LH, Collins MJ, Harrisingh MC, White IJ, Woodhoo A, Lloyd AC (2012): A central role for the ERK-signaling pathway in controlling Schwann cell plasticity and peripheral nerve regeneration in vivo. *Neuron* 73, 729–742
- Nave KA, Sereda MW, Ehrenreich H (2007): Mechanisms of disease: inherited demyelinating neuropathies—from basic to clinical research. *Nat Clin Pract Neurol* 3, 453–464
- Ngounou Wetie AG, Sokolowska I, Woods AG, Roy U, Loo JA, Darie CC (2013): Investigation of stable and transient protein-protein interactions: past, present and future. *Proteomics* 13, 538–557
- Niemann S, Sereda MW, Suter U, Griffiths IR, Nave KA (2000): Uncoupling of myelin assembly and schwann cell differentiation by transgenic overexpression of peripheral myelin protein 22. *J Neurosci* 20, 4120–4128
- Ning Z, Hawley B, Chiang CK, Seebun D, Figeys D (2014): Detecting protein-protein interactions/complex components using mass spectrometry coupled techniques. *Methods Mol Biol* 1164, 1–13
- Nishita M, Wang Y, Tomizawa C, Suzuki A, Niwa R, Uemura T, Mizuno K (2004): Phosphoinositide 3-kinase-mediated activation of cofilin phosphatase Slingshot and its role for insulin-induced membrane protrusion. *J Biol Chem* 279, 7193–7198
- Nobbio L, Vigo T, Abbruzzese M, Levi G, Brancolini C, Mantero S, Grandis M, Benedetti L, Mancardi G, Schenone A (2004): Impairment of PMP22 transgenic Schwann cells differentiation in culture: implications for Charcot-Marie-Tooth type 1A disease. *Neurobiol Dis* 16, 263–273
- Nobbio L, Sturla L, Fiorese F, Usai C, Basile G, Moreschi I, Benvenuto F, Zocchi E, De Flora A, Schenone A, Bruzzone S (2009): P2X7-mediated increased intracellular calcium causes functional derangement in Schwann cells from rats with CMT1A neuropathy. *J Biol Chem* 284, 23146–23158

- Nodari A, Previtali SC, Dati G, Occhi S, Court FA, Colombelli C, Zambroni D, Dina G, Del Carro U, Campbell KP, et al. (2008): Alpha6beta4 integrin and dystroglycan cooperate to stabilize the myelin sheath. *J Neurosci* 28, 6714–6719
- Notterpek L, Ryan MC, Tobler AR, Shooter EM (1999): PMP22 accumulation in aggregates: implications for CMT1A pathology. *Neurobiol Dis* 6, 450–460
- Notterpek L, Roux KJ, Amici SA, Yazdanpour A, Rahner C, Fletcher BS (2001): Peripheral myelin protein 22 is a constituent of intercellular junctions in epithelia. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 14404–14409
- Ohsawa Y, Murakami T, Miyazaki Y, Shirabe T, Sunada Y (2006): Peripheral myelin protein 22 is expressed in human central nervous system. *J Neurol Sci* 247, 11–15
- O'Reilly FJ, Rappsilber J (2018): Cross-linking mass spectrometry: methods and applications in structural, molecular and systems biology. *Nat Struct Mol Biol* 25, 1000–1008
- Palau F, Löfgren A, De Jonghe P, Bort S, Nelis E, Sevilla T, Martin JJ, Vilchez J, Prieto F, Van Broeckhoven C (1993): Origin of the de novo duplication in Charcot-Marie-Tooth disease type 1A: unequal nonsister chromatid exchange during spermatogenesis. *Hum Mol Genet* 2, 2031–2035
- Palsdottir H, Hunte C (2004): Lipids in membrane protein structures. *Biochim Biophys Acta* 1666, 2–18
- Pantera H, Moran JJ, Hung HA, Pak E, Dutra A, Svaren J (2018): Regulation of the neuropathy-associated Pmp22 gene by a distal super-enhancer. *Hum Mol Genet* 27, 2830–2839
- Pantera H, Shy ME, Svaren J (2019): Regulating PMP22 expression as a dosage sensitive neuropathy gene. *Brain Res* 1726, 146491
- Pareek S, Suter U, Snipes GJ, Welcher AA, Shooter EM, Murphy RA (1993): Detection and processing of peripheral myelin protein PMP22 in cultured Schwann cells. *J Biol Chem* 268, 10372–10379
- Parmantier E, Cabon F, Braun C, D'Urso D, Müller HW, Zalc B (1995): Peripheral myelin protein-22 is expressed in rat and mouse brain and spinal cord motoneurons. *Eur J Neurosci* 7, 1080–1088

- Passage E, Norreel JC, Noack-Fraissignes P, Sanguedolce V, Pizant J, Thirion X, Robaglia-Schlupp A, Pellissier JF, Fontés M (2004): Ascorbic acid treatment corrects the phenotype of a mouse model of Charcot-Marie-Tooth disease. *Nat Med* 10, 396–401
- Patzig J, Jahn O, Tenzer S, Wichert SP, de Monasterio-Schrader P, Rosfa S, Kuharev J, Yan K, Bormuth I, Bremer J, et al. (2011): Quantitative and integrative proteome analysis of peripheral nerve myelin identifies novel myelin proteins and candidate neuropathy loci. *J Neurosci* 31, 16369–16386
- Pentao L, Wise CA, Chinault AC, Patel PI, Lupski JR (1992): Charcot-Marie-Tooth type 1A duplication appears to arise from recombination at repeat sequences flanking the 1.5 Mb monomer unit. *Nat Genet* 2, 292–300
- Perea J, Robertson A, Tolmachova T, Muddle J, King RH, Ponsford S, Thomas PK, Huxley C (2001): Induced myelination and demyelination in a conditional mouse model of Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Hum Mol Genet* 10, 1007–1018
- Pereira JA, Lebrun-Julien F, Suter U (2012): Molecular mechanisms regulating myelination in the peripheral nervous system. *Trends Neurosci* 35, 123–134
- Poitelon Y, Lopez-Anido C, Catignas K, Berti C, Palmisano M, Williamson C, Ameroso D, Abiko K, Hwang Y, Gregorieff A, et al. (2016): YAP and TAZ control peripheral myelination and the expression of laminin receptors in Schwann cells. *Nat Neurosci* 19, 879–887
- Poitelon Y, Matafora V, Silvestri N, Zambroni D, McGarry C, Serghany N, Rush T, Vizzuso D, Court FA, Bachi A, et al. (2018): A dual role for Integrin $\alpha 6\beta 4$ in modulating hereditary neuropathy with liability to pressure palsies. *J Neurochem* 145, 245–257
- Privé GG (2007): Detergents for the stabilization and crystallization of membrane proteins. *Methods* 41, 388–397
- Prukop T, Stenzel J, Wernick S, Kungl T, Mroczek M, Adam J, Ewers D, Nabirotkin S, Nave KA, Hajj R, et al. (2019): Early short-term PXT3003 combinational therapy delays disease onset in a transgenic rat model of Charcot-Marie-Tooth disease 1A (CMT1A). *PLoS ONE* 14, e0209752
- Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MAR, Bender D, Maller J, Sklar P, de Bakker PIW, Daly MJ, Sham PC (2007): PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet* 81, 559–575

- Puts CF, Lenoir G, Krijgsveld J, Williamson P, Holthuis JCM (2010): A P4-ATPase protein interaction network reveals a link between aminophospholipid transport and phosphoinositide metabolism. *J Proteome Res* 9, 833–842
- Qualtiere LF, Anderson AG, Meyers P (1977): Effects of ionic and nonionic detergents on antigen-antibody reactions. *J Immunol* 119, 1645–1651
- Quattrini A, Previtali S, Feltri ML, Canal N, Nemni R, Wrabetz L (1996): Beta 4 integrin and other Schwann cell markers in axonal neuropathy. *Glia* 17, 294–306
- Raasakka A, Kursula P (2020): Flexible Players within the Sheaths: The Intrinsically Disordered Proteins of Myelin in Health and Disease. *Cells* 9, 470
- Raasakka A, Linxweiler H, Brophy PJ, Sherman DL, Kursula P (2019): Direct Binding of the Flexible C-Terminal Segment of Periaxin to β 4 Integrin Suggests a Molecular Basis for CMT4F. *Front Mol Neurosci* 12, 84
- Raeymaekers P, Timmerman V, Nelis E, De Jonghe P, Hoogendijk JE, Baas F, Barker DF, Martin JJ, De Visser M, Bolhuis PA (1991): Duplication in chromosome 17p11.2 in Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 1a (CMT 1a). The HMSN Collaborative Research Group. *Neuromuscul Disord* 1, 93–97
- Ramisetty SR, Washburn MP (2011): Unraveling the dynamics of protein interactions with quantitative mass spectrometry. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 46, 216–228
- Rappsilber J (2011): The beginning of a beautiful friendship: cross-linking/mass spectrometry and modelling of proteins and multi-protein complexes. *J Struct Biol* 173, 530–540
- Reiter LT, Murakami T, Koeuth T, Pentao L, Muzny DM, Gibbs RA, Lupski JR (1996): A recombination hotspot responsible for two inherited peripheral neuropathies is located near a mariner transposon-like element. *Nat Genet* 12, 288–297
- Roa BB, Dyck PJ, Marks HG, Chance PF, Lupski JR (1993): Dejerine-Sottas syndrome associated with point mutation in the peripheral myelin protein 22 (PMP22) gene. *Nat Genet* 5, 269–273
- Rossor AM, Carr AS, Devine H, Chandrashekar H, Pelayo-Negro AL, Pareyson D, Shy ME, Scherer SS, Reilly MM (2017): Peripheral neuropathy in complex inherited diseases: an approach to diagnosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 88, 846–863

- Roux KJ, Amici SA, Notterpek L (2004): The temporospatial expression of peripheral myelin protein 22 at the developing blood-nerve and blood-brain barriers. *J Comp Neurol* 474, 578–588
- Roux KJ, Amici SA, Fletcher BS, Notterpek L (2005): Modulation of epithelial morphology, monolayer permeability, and cell migration by growth arrest specific 3/peripheral myelin protein 22. *Mol Biol Cell* 16, 1142–1151
- Roy A (2015): Membrane preparation and solubilization. *Meth Enzymol* 557, 45–56
- Sahenk Z, Chen L, Mendell JR (1999): Effects of PMP22 duplication and deletions on the axonal cytoskeleton. *Ann Neurol* 45, 16–24
- Saher G, Quintes S, Möbius W, Wehr MC, Krämer-Albers EM, Brügger B, Nave KA (2009): Cholesterol regulates the endoplasmic reticulum exit of the major membrane protein P0 required for peripheral myelin compaction. *J Neurosci* 29, 6094–6104
- Sakakura M, Hadziselimovic A, Wang Z, Schey KL, Sanders CR (2011): Structural basis for the Trembler-J phenotype of Charcot-Marie-Tooth disease. *Structure* 19, 1160–1169
- Sancho S, Young P, Suter U (2001): Regulation of Schwann cell proliferation and apoptosis in PMP22-deficient mice and mouse models of Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Brain* 124, 2177–2187
- Saporta MA, Katona I, Lewis RA, Masse S, Shy ME, Li J (2009): Shortened internodal length of dermal myelinated nerve fibres in Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Brain* 132, 3263–3273
- Schenone A, Nobbio L, Monti Bragadin M, Ursino G, Grandis M (2011): Inherited neuropathies. *Curr Treat Options Neurol* 13, 160–179
- Schlebach JP, Narayan M, Alford C, Mittendorf KF, Carter BD, Li J, Sanders CR (2015): Conformational Stability and Pathogenic Misfolding of the Integral Membrane Protein PMP22. *J Am Chem Soc* 137, 8758–8768
- Schmidt C, Urlaub H (2017): Combining cryo-electron microscopy (cryo-EM) and cross-linking mass spectrometry (CX-MS) for structural elucidation of large protein assemblies. *Curr Opin Struct Biol* 46, 157–168
- Schweppe DK, Chavez JD, Lee CF, Caudal A, Kruse SE, Stuppard R, Marcinek DJ, Shadel GS, Tian R, Bruce JE (2017): Mitochondrial protein interactome elucidated by chemical cross-linking mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci USA* 114, 1732–1737

- Seddon AM, Curnow P, Booth PJ (2004): Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera. *Biochim Biophys Acta* 1666, 105–117
- Sedzik J, Tsukihara T (2000): Solubilization of PNS myelin membrane proteins by detergents. *Neuroreport* 11, 2559–2563
- Sedzik J, Kotake Y, Uyemura K (1998): Purification of PASII/PMP22--an extremely hydrophobic glycoprotein of PNS myelin membrane. *Neuroreport* 9, 1595–1600
- Sedzik J, Uyemura K, Tsukihara T (2002): Towards crystallization of hydrophobic myelin glycoproteins: P0 and PASII/PMP22. *Protein Expr Purif* 26, 368–377
- Sehgal BU, DeBiase PJ, Matzno S, Chew TL, Claiborne JN, Hopkinson SB, Russell A, Marinkovich MP, Jones JCR (2006): Integrin beta4 regulates migratory behavior of keratinocytes by determining laminin-332 organization. *J Biol Chem* 281, 35487–35498
- Sereda M, Griffiths I, Pühlhofer A, Stewart H, Rossner MJ, Zimmerman F, Magyar JP, Schneider A, Hund E, Meinck HM, et al. (1996): A transgenic rat model of Charcot-Marie-Tooth disease. *Neuron* 16, 1049–1060
- Sereda MW, Nave KA (2006): Animal models of Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Neuromolecular Med* 8, 205–216
- Sereda MW, Meyer zu Hörste G, Suter U, Uzma N, Nave KA (2003): Therapeutic administration of progesterone antagonist in a model of Charcot-Marie-Tooth disease (CMT-1A). *Nat Med* 9, 1533–1537
- Shapiro L, Doyle JP, Hensley P, Colman DR, Hendrickson WA (1996): Crystal structure of the extracellular domain from P0, the major structural protein of peripheral nerve myelin. *Neuron* 17, 435–449
- Sherman DL, Brophy PJ (2018): A murine model of Charcot-Marie-Tooth disease 4F reveals a role for the C-terminus of periaxin in the formation and stabilization of Cajal bands. *Wellcome Open Res* 3, 20
- Sherman DL, Fabrizi C, Gillespie CS, Brophy PJ (2001): Specific disruption of a schwann cell dystroglycan-related protein complex in a demyelinating neuropathy. *Neuron* 30, 677–687
- Sherman DL, Wu LMN, Grove M, Gillespie CS, Brophy PJ (2012): Drp2 and periaxin form Cajal bands with dystroglycan but have distinct roles in Schwann cell growth. *J Neurosci* 32, 9419–9428

Shy M, Lupski JR, Chance PF, Klein CJ, Dyck PJ: Hereditary Motor and Sensory Neuropathies: An Overview of Clinical, Genetic, Electrophysiologic, and Pathologic Features. In: Dyck PJ, Thomas PK (Hrsg.): *Peripheral Neuropathy*. 4. Auflage; Elsevier, Philadelphia, Pennsylvania 2005, 1623–1658

Shy ME (2006): Peripheral neuropathies caused by mutations in the myelin protein zero. *J Neurol Sci* 242, 55–66

Siems SB, Jahn O, Eichel MA, Kannaiyan N, Wu LMN, Sherman DL, Kusch K, Hesse D, Jung RB, Fledrich R, et al. (2020): Proteome profile of peripheral myelin in healthy mice and in a neuropathy model. *Elife* 9, e51406

Singh P, Panchaud A, Goodlett DR (2010): Chemical cross-linking and mass spectrometry as a low-resolution protein structure determination technique. *Anal Chem* 82, 2636–2642

Sinz A (2006): Chemical cross-linking and mass spectrometry to map three-dimensional protein structures and protein-protein interactions. *Mass Spectrom Rev* 25, 663–682

Sinz A (2007): Investigation of protein-ligand interactions by mass spectrometry. *ChemMedChem* 2, 425–431

Sinz A (2010): Investigation of protein-protein interactions in living cells by chemical crosslinking and mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 397, 3433–3440

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

Smith BJ, Cassoli JS, Guest PC, Martins-de-Souza D (2017): Co-immunoprecipitation for Deciphering Protein Interactomes. *Adv Exp Med Biol* 974, 229–236

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

Snipes GJ, Suter U, Shooter EM (1993): Human peripheral myelin protein-22 carries the L2/HNK-1 carbohydrate adhesion epitope. *J Neurochem* 61, 1961–1964

Sociali G, Visigalli D, Prukop T, Cervellini I, Mannino E, Venturi C, Bruzzone S, Sereda MW, Schenone A (2016): Tolerability and efficacy study of P2X7 inhibition in experimental Charcot-Marie-Tooth type 1A (CMT1A) neuropathy. *Neurobiol Dis* 95, 145–157

- Sonoda Y, Cameron A, Newstead S, Omote H, Moriyama Y, Kasahara M, Iwata S, Drew D (2010): Tricks of the trade used to accelerate high-resolution structure determination of membrane proteins. *FEBS Lett* 584, 2539–2547
- Sparrow N, Manetti ME, Bott M, Fabianac T, Petrilli A, Bates ML, Bunge MB, Lambert S, Fernandez-Valle C (2012): The actin-severing protein cofilin is downstream of neu-regulin signaling and is essential for Schwann cell myelination. *J Neurosci* 32, 5284–5297
- Spisák S, Guttman A (2009): Biomedical applications of protein microarrays. *Curr Med Chem* 16, 2806–2815
- Spreyer P, Kuhn G, Hanemann CO, Gillen C, Schaal H, Kuhn R, Lemke G, Müller HW (1991): Axon-regulated expression of a Schwann cell transcript that is homologous to a „growth arrest-specific“ gene. *EMBO J* 10, 3661–3668
- Stögbauer F, Young P, Kuhlenbäumer G, De Jonghe P, Timmerman V (2000): Hereditary recurrent focal neuropathies: clinical and molecular features. *Neurology* 54, 546–551
- Subbotin RI, Chait BT (2014): A pipeline for determining protein-protein interactions and proximities in the cellular milieu. *Mol Cell Proteomics* 13, 2824–2835
- Suter B, Kittanakom S, Stagljar I (2008): Two-hybrid technologies in proteomics research. *Curr Opin Biotechnol* 19, 316–323
- Tardiff DF, Abruzzi KC, Rosbash M (2007): Protein characterization of *Saccharomyces cerevisiae* RNA polymerase II after in vivo cross-linking. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 19948–19953
- Tate CG (2010): Practical considerations of membrane protein instability during purification and crystallisation. *Methods Mol Biol* 601, 187–203
- Timmerman V, Nelis E, Van Hul W, Nieuwenhuijsen BW, Chen KL, Wang S, Ben Othman K, Cullen B, Leach RJ, Hanemann CO (1992): The peripheral myelin protein gene PMP-22 is contained within the Charcot-Marie-Tooth disease type 1A duplication. *Nat Genet* 1, 171–175
- Tobler AR, Notterpek L, Naef R, Taylor V, Suter U, Shooter EM (1999): Transport of Trembler-J mutant peripheral myelin protein 22 is blocked in the intermediate compartment and affects the transport of the wild-type protein by direct interaction. *J Neurosci* 19, 2027–2036

- Tobler AR, Liu N, Mueller L, Shooter EM (2002): Differential aggregation of the Trembler and Trembler J mutants of peripheral myelin protein 22. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 483–488
- Tran BQ, Goodlett DR, Goo YA (2016): Advances in protein complex analysis by chemical cross-linking coupled with mass spectrometry (CXMS) and bioinformatics. *Biochim Biophys Acta* 1864, 123–129
- Trotter JL, Wegescheide CL (1985): Isolation and purification of myelin proteolipid protein using high speed gel filtration in sodium dodecyl sulfate. *Neurochem Res* 10, 865–869
- Turriziani B, von Kriegsheim A, Pennington SR (2016): Protein-Protein Interaction Detection Via Mass Spectrometry-Based Proteomics. *Adv Exp Med Biol* 919, 383–396
- Unal B, Tan H, Orbak Z, Kiki I, Bilici M, Bilici N, Aslan H, Kaplan S (2005): Morphological alterations produced by zinc deficiency in rat sciatic nerve: a histological, electron microscopic, and stereological study. *Brain Res* 1048, 228–234
- Valentijn LJ, Bolhuis PA, Zorn I, Hoogendijk JE, van den Bosch N, Hensels GW, Stanton VP, Housman DE, Fischbeck KH, Ross DA (1992): The peripheral myelin gene PMP-22/GAS-3 is duplicated in Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Nat Genet* 1, 166–170
- Van Troys M, Huyck L, Leyman S, Dhaese S, Vandekerckhove J, Ampe C (2008): Ins and outs of ADF/cofilin activity and regulation. *Eur J Cell Biol* 87, 649–667
- Vanoye CG, Sakakura M, Follis RM, Trevisan AJ, Narayan M, Li J, Sanders CR, Carter BD (2019): Peripheral myelin protein 22 modulates store-operated calcium channel activity, providing insights into Charcot-Marie-Tooth disease etiology. *J Biol Chem* 294, 12054–12065
- Vartiainen MK, Mustonen T, Mattila PK, Ojala PJ, Thesleff I, Partanen J, Lappalainen P (2002): The three mouse actin-depolymerizing factor/cofilins evolved to fulfill cell-type-specific requirements for actin dynamics. *Mol Biol Cell* 13, 183–194
- Vasilescu J, Guo X, Kast J (2004): Identification of protein-protein interactions using in vivo cross-linking and mass spectrometry. *Proteomics* 4, 3845–3854
- Verrier JD, Lau P, Hudson L, Murashov AK, Renne R, Notterpek L (2009): Peripheral myelin protein 22 is regulated post-transcriptionally by miRNA-29a. *Glia* 57, 1265–1279

- Vigo T, Nobbio L, Hummelen PV, Abbruzzese M, Mancardi G, Verpoorten N, Verhoeven K, Sereda MW, Nave KA, Timmerman V, Schenone A (2005): Experimental Charcot-Marie-Tooth type 1A: a cDNA microarrays analysis. *Mol Cell Neurosci* 28, 703–714
- Visigalli D, Castagnola P, Capodivento G, Geroldi A, Bellone E, Mancardi G, Pareyson D, Schenone A, Nobbio L (2016): Alternative Splicing in the Human PMP22 Gene: Implications in CMT1A Neuropathy. *Hum Mutat* 37, 98–109
- Wagner FR, Dienemann C, Wang H, Stützer A, Tegunov D, Urlaub H, Cramer P (2020): Structure of SWI/SNF chromatin remodeller RSC bound to a nucleosome. *Nature* 579, 448–451
- Wang DS, Wu X, Bai Y, Zaidman C, Grider T, Kamholz J, Lupski JR, Connolly AM, Shy ME (2017): PMP22 exon 4 deletion causes ER retention of PMP22 and a gain-of-function allele in CMT1E. *Ann Clin Transl Neurol* 4, 236–245
- Wang H, He M, Willard B, Wu Q (2019): Cross-linking, Immunoprecipitation and Proteomic Analysis to Identify Interacting Proteins in Cultured Cells. *Bio Protoc* 9, e3258
- Wang X, Huang L (2018): Dissecting Dynamic and Heterogeneous Proteasome Complexes Using In Vivo Cross-Linking-Assisted Affinity Purification and Mass Spectrometry. *Methods Mol Biol* 1844, 401–410
- Welcher AA, Suter U, De Leon M, Snipes GJ, Shooter EM (1991): A myelin protein is encoded by the homologue of a growth arrest-specific gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 7195–7199
- Welcher AA, De Leon M, Suter U, Snipes GJ, Meakin SO, Shooter EM (1992): Isolation of transcriptionally regulated sequences associated with neuronal and non-neuronal cell interactions. *Prog Brain Res* 94, 163–176
- Williamson MP, Sutcliffe MJ (2010): Protein-protein interactions. *Biochem Soc Trans* 38, 875–878
- Yang B, Wu YJ, Zhu M, Fan SB, Lin J, Zhang K, Li S, Chi H, Li YX, Chen HF, et al. (2012): Identification of cross-linked peptides from complex samples. *Nat Methods* 9, 904–906

- Yang W, Steen H, Freeman MR (2008): Proteomic approaches to the analysis of multi-protein signaling complexes. *Proteomics* 8, 832–851
- Yang Z, Wang C, Zhou Q, An J, Hildebrandt E, Aleksandrov LA, Kappes JC, DeLucas LJ, Riordan JR, Urbatsch IL, et al. (2014): Membrane protein stability can be compromised by detergent interactions with the extramembranous soluble domains. *Protein Sci* 23, 769–789
- Yonezawa N, Homma Y, Yahara I, Sakai H, Nishida E (1991): A short sequence responsible for both phosphoinositide binding and actin binding activities of cofilin. *J Biol Chem* 266, 17218–17221
- Yu C, Yang Y, Wang X, Guan S, Fang L, Liu F, Walters KJ, Kaiser P, Huang L (2016): Characterization of Dynamic UbR-Proteasome Subcomplexes by In vivo Cross-linking (X) Assisted Bimolecular Tandem Affinity Purification (XBAP) and Label-free Quantitation. *Mol Cell Proteomics* 15, 2279–2292
- Zal T (2008): Visualization of protein interactions in living cells. *Adv Exp Med Biol* 640, 183–197
- Zanetta JP, Sarlieve LL, Mandel P, Vincendon G, Gombos G (1977): Fractionation of glycoproteins associated to adult rat brain myelin fractions. *J Neurochem* 29, 827–838
- Zhao HT, Damle S, Ikeda-Lee K, Kuntz S, Li J, Mohan A, Kim A, Hung G, Scheideler MA, Scherer SS, et al. (2018): PMP22 antisense oligonucleotides reverse Charcot-Marie-Tooth disease type 1A features in rodent models. *J Clin Invest* 128, 359–368
- Zhou Y, Miles JR, Tavori H, Lin M, Khoshbouei H, Borchelt DR, Bazick H, Landreth GE, Lee S, Fazio S, Notterpek L (2019): PMP22 Regulates Cholesterol Trafficking and ABCA1-Mediated Cholesterol Efflux. *J Neurosci* 39, 5404–5418
- Zoidl G, D'Urso D, Blass-Kampmann S, Schmalenbach C, Kuhn R, Müller HW (1997): Influence of elevated expression of rat wild-type PMP22 and its mutant PMP22Trembler on cell growth of NIH3T3 fibroblasts. *Cell Tissue Res* 287, 459–470
- Zoltewicz SJ, Lee S, Chittoor VG, Freeland SM, Rangaraju S, Zacharias DA, Notterpek L (2012): The palmitoylation state of PMP22 modulates epithelial cell morphology and migration. *ASN Neuro* 4, 409–421

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. M. W. Sereda für die Möglichkeit bedanken, an einem renommierten Wissenschaftsstandort mit ausgezeichneter personeller und materieller Ausstattung meine ersten Erfahrungen im wissenschaftlichen Arbeiten zu sammeln. Weiterhin möchte ich mich für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die Förderung meiner Fähigkeiten auf dem Gebiet der experimentellen Forschung bedanken. Dieser Dank gilt ebenso Herrn Prof. Dr. H. Urlaub, der durch die Ko-Betreuung meiner Arbeit entscheidende Grundsteine in der Projektentwicklung, insbesondere im Hinblick auf die technisch-methodische Optimierung gelegt hat. Ich bedanke mich weiterhin bei Herrn Dr. David Ewers und Dr. Robert Fledrich für die Supervision meiner theoretisch-gedanklichen sowie der praktischen Arbeit im Labor. Für die geduldige und lehrreiche Einarbeitung bzw. Unterstützung bei der Laborarbeit bedanke ich mich bei Dr. Susanne Quintes, Dr. Theresa Kungl, Stefanie Wernicke, Doris Krauter, Lisa Linhoff, Lorenz Winter und Beate Veith ohne die eine Vielzahl der Experimente meiner Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Mein Dank gilt allen Genannten ebenso im Hinblick auf die vielen anregende Diskussionen und unterhaltsamen Stunden im Labor, die meine Arbeit außerordentlich bereichert haben. Für das Korrektur-Lesen bedanke ich mich ganz besonders bei Dr. David Ewers, Doris Krauter und Nils Groger.

Lebenslauf

Ich wurde am 03.02.1993 in Aachen als dritte Tochter von vier Kindern von Dr. Ursula Arlt (geb. Baron) und Dr. Georg Arlt geboren. 1998 zogen wir nach Berlin um, hier besuchte ich eine bilinguale Grundschule und schloss im Juni 2011 mit Abitur die Schule am Humboldt-Gymnasium in Berlin Tegel ab. Ich begann im Wintersemester 2011/2012 das Medizinstudium an der Charité in Berlin und wechselte zum Sommersemester 2013 den Studienort an die Universitätsmedizin Göttingen. Nach Abschluss des Physikums im Herbst 2014 durfte ich meine wissenschaftliche Arbeit mit einem Laborpraktikum im Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Sereda beginnen. Hier erfolgte schließlich auch die Arbeit für meine Promotion ab dem Februar 2016. Im Juni 2019 schloss ich mein Medizinstudium mit sehr gutem Studienergebnis ab, hiernach arbeitete ich in der digitalen Lehre für die AMBOSS GmbH. Seit dem 01.06.2020 bin ich als Assistenzärztin in der Neurologie der Charité, am Campus Berlin Mitte beschäftigt.