Aus der Abteilung Neurogenetik
(Leiter: Prof. Dr. rer.nat. K.-A. Nave)
des Max-Planck-Instituts für experimentelle Medizin
in Göttingen

**Einfluss von Rapamycin auf Myelinmissbildungen
in einem Mausmodell
einer tomakulösen Neuropathie**

INAUGURAL – DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Susanne Wolfer

aus
Merseburg

Göttingen 2010

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

I. Berichterstatter: Prof. Dr. med. T. Moser

II. Berichterstatter / in:

III. Berichterstatter / in:

Tag der mündlichen Prüfung:

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	4
1.1. Myelinisierung im peripheren Nervensystem	5
1.1.1. Schwannzellen	5
1.1.2. Axon-Schwannzell-Interaktion	9
1.1.3. Myelinopathien im PNS	11
1.2. Der PI3K/AKT-Signaltransduktionsweg	16
1.2.1. Bestandteile des PI3K/AKT-Signaltransduktionsweges	17
1.2.2. PTEN	19
1.2.3. Rapamycin – ein spezifischer mTOR-Inhibitor	21
1.3. Hypothese und Zielsetzung	25
2. Material und Methoden	27
2.1. Material	27
2.1.1. Chemikalien und Bioreagenzien	27
2.1.2. Verbrauchsmaterial	28
2.1.3. Geräte	29
2.1.4. Antikörper	30
2.1.5. Lösungen und Puffer	30
2.2. Methoden	33
2.2.1. Manipulation und Analyse von Versuchstieren	33
2.2.2. Proteinanalyse mittels Western Blot	37
2.2.3. Statistische Methoden	40

3. Ergebnisse	41
3.1. Behandlung Schwannzell-spezifischer PTEN-Mausmutanten mit Rapamycin	41
3.1.1. Effekte von Rapamycin auf den PI3K/AKT-Signalweg	41
3.1.2. Effekte von Rapamycin auf myelinisierende Schwannzellen	43
3.1.3. Effekte von Rapamycin auf nicht myelinisierende Schwannzellen	52
3.2. Zusammenfassung der Ergebnisse	56
4. Diskussion	59
4.1. Phosphoinositide als Schlüsselregulatoren in peripheren Nerven	59
4.2. Veränderung des Phosphoinositid-Levels beeinflusst Signalwege.....	60
4.3. mTOR-abhängige und -unabhängige Beeinflussung der Myelinisierung.....	61
4.4. Beeinflussung der Myelinmissbildungen durch Rapamycin	63
4.5. Schwannzell-Größenzunahme bei gesteigertem PI3K/AKT-Signalweg.....	65
4.6. Humane tomakulöse Neuropathien.....	66
4.7. Schlussfolgerungen	68
5. Zusammenfassung.....	69
6. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	71
7. Abkürzungsverzeichnis	72
8. Literaturverzeichnis.....	74

1. Einleitung

Das Nervensystem ist in vieler Hinsicht das komplizierteste funktionelle System des menschlichen Körpers. Zu seinen wichtigsten Funktionen gehören die Wahrnehmung von äußeren Reizen und die Steuerung der Reaktion auf diese Reize, die Verarbeitung von Informationen und die Kontrolle komplexer Vorgänge und Verhaltensweisen. Es ermöglicht dem Menschen, mit seiner Umwelt zu kommunizieren und liefert damit die Basis für ein an diese Umwelt sinnvoll angepasstes Leben. Das Nervensystem gliedert sich in das zentrale Nervensystem (ZNS), bestehend aus Gehirn und Rückenmark, und in das periphere Nervensystem (PNS), die Gesamtheit der den Körper durchziehenden Nerven. Dabei kann das PNS als Rezeptions- und Ausführungsorgan des ZNS bezeichnet werden, wohingegen die Integration und Verarbeitung des Wahrgenommenen sowie die Steuerungs- und Kontrollfunktion eher dem ZNS zugeordnet werden können.

Die funktionelle Grundeinheit des Nervensystems ist die Nervenzelle (Neuron), welche aus einem Zellkörper (Soma oder Perikarion) mit Zellkern, erregungsempfangenden Fortsätzen (Dendriten) und erregungsweiterleitenden Fortsätzen (Axonen) besteht. Neben den Neuronen gibt es Gliazellen im Nervensystem. Diese sind für die neuronale Funktion unentbehrlich und dienen unter anderem der funktionellen Effizienz, dem Schutz und der Versorgung der Nervenzelle. Astrozyten, Oligodendrozyten und Mikrogliazellen sind die Gliazellen des ZNS. Im PNS sind es die Schwannzellen. Zur elektrischen Isolierung und somit für die Beschleunigung der Impulsweiterleitung bilden im ZNS die Oligodendrozyten und im PNS die Schwannzellen eine Myelinscheide um bestimmte Axone. Die Ausbildung der Myelinscheide erfordert eine genaue Regulierung. Störungen in dieser Regulierung und/oder im Ablauf der Myelinisierung können die Erregungsweiterleitung beeinflussen.

Bei hereditären peripheren Neuropathien weisen die Bildung oder der Erhalt einer geordneten Myelinstruktur Defizite auf. Dabei hat die Gruppe der Charcot-Marie-Tooth-Erkrankungen (CMT), auch hereditäre motorisch-sensible Neuropathien (HMSN) genannt, eine besondere Bedeutung. Einige Formen der HMSN zeigen charakteristische Myelinmissbildungen. Die genaue Aufschlüsselung des Ablaufs und der Regulierung der Myelinisierung im PNS sowie der Interaktionen zwischen Axon und Schwannzelle könnten zum pathophysiologischen Verständnis der hereditären peripheren Neuropathien beitragen.

1.1. Myelinisierung im peripheren Nervensystem

1.1.1. Schwannzellen

Schwannzellen wurden nach dem deutschen Anatom und Physiologen Theodor Schwann (1810-1882) benannt. Es sind abgeflachte Zellen, zu deren Hauptaufgabe die Bildung der Myelinscheide um bestimmte Axone, aber auch der Erhalt des Myelins gehört (Raine 1984). Weiterhin sind axonprotektive Funktionen der Schwannzellen unabhängig von der Myelinisierung bekannt (Nave und Salzer 2006).

Die Myelinscheide ist eine das Axon umhüllende, multilamelläre Struktur, welche durch eine Differenzierung der Plasmamembran der Schwannzelle gebildet wird. Aufgrund ihrer isolierenden Eigenschaften ermöglicht sie die Beschleunigung der Impulsweiterleitung entlang des Axons. Dabei umhüllt eine myelinisierende Schwannzelle jeweils nur ein Segment eines Axons. So entstehen in regelmäßigen Abständen Unterbrechungen der Isolation zwischen zwei Segmenten (Ranviersche Schnürringe), an denen Aktionspotentiale generiert werden (Abb.1). Die daraus resultierende Form der Erregungsweiterleitung wird saltatorische Erregungsleitung genannt (Ritschie 1984). Bei nicht myelinisierten Axonen erfolgt die Erregungsweiterleitung kontinuierlich entlang des Axons, da sich hier im Gegensatz zu myelinisierten Axonen die für die Depolarisation nötigen Natriumkanäle kontinuierlich entlang des Axons und nicht hochkonzentriert an den Ranvierschen Schnürringen befinden (Waxman 1997). Eine langsamere Nervenleitgeschwindigkeit ist die Folge. Die Myelinscheide sorgt nicht nur für eine schnellere Nervenleitgeschwindigkeit, sondern spart auch Energie und Platz. Sollte in einem nicht myelinisierten Axon eine vergleichbare Nervenleitgeschwindigkeit wie in einem myelinisierten Axon erzeugt werden, so müsste der Durchmesser des Axons 40mal größer sein und der Energieverbrauch wäre 500mal höher (Garbay et al. 2000). Für eine effektive elektrische Isolierung benötigt die Myelinscheide eine große Menge an nicht leitendem Material und den maximalen Ausschluss von Wasser und Zytoplasma. Andererseits muss zur gleichen Zeit der Zugang zu allen ihrer Schichten, zum einen für die eigene Instandhaltung und zum anderen für eine effiziente intrazelluläre Kommunikation gewährleistet sein. Ersteres ist in einer lipidreichen Membran mit 70-80% Lipiden und 20-30% Proteinen verwirklicht, die sehr dicht und mehrfach um das Axon gewunden ist (Garbay et al. 2000). Die zytoplasmatischen Seiten der Plasmamembran der Schwannzelle nähern sich so weit an, dass sie optisch verschmelzen und die Hauptlinie (major

dense line) bilden. Die Annäherung der extraplasmatischen Seiten der Membranen aufeinanderfolgender Lamellen bildet die Intermediärlinie (intraperiode line) (Abb.1). Der Zugang zu und die Kommunikation zwischen den Schichten der Myelinscheide ist sichergestellt durch schmale, zytoplasmatische, sie spiralförmig durchziehende Kanäle (Schmidt-Lantermann-Inzisuren), durch die inneren und äußeren Mesaxone, die paranodalen Regionen (lateral der Enden jedes Myelinsegments) und durch die Ranvierschen Schürringe (Garbay et al. 2000).

Myelin kann eingeteilt werden in kompaktes und nicht kompaktes Myelin. Nicht kompaktes Myelin findet sich in den Paranodien. Aus kompaktem Myelin besteht das Internodium, welches zwischen zwei Ranvierschen Schnürringen lokalisiert ist (Raine 1984). Jedes myelinisierte Axon ist auf der ganzen Länge kontinuierlich von einer Basallamina umgeben (Raine 1984). Diese ist essentiell bei der Regeneration nach einer Axonläsion oder -durchtrennung. Sie stellt die Leitstruktur für das neu auswachsende Axonende dar (Raine 1984). Unmyelinisierte Axone hingegen teilen sich zu mehreren eine Basallamina, da sie auch als Gruppe von nur einer Schwannzelle umgeben sind und ein sogenanntes „Remakbündel“ bilden (Raine 1984).

Abbildung 1: Schema peripherer Nerv; aus Garbay et al. 2000, S. 270

Periodische Unterbrechungen des kompakten Myelins sind Schmidt-Lantermann-Inzisuren. Als „funktionelle“ Gap Junctions verbinden sie die angrenzenden Lamellen innerhalb der Myelinscheide. Weitere Gap Junctions befinden sich in den paranodalen Regionen. Sie alle bieten eine Möglichkeit der Abkürzung für die Diffusion von kleinen Molekülen ($<400\text{kDa}$) zwischen adaxonalem und perinukleärem Zytoplasma. Dieser rasche radiale Weg ist ca. 1.000.000mal schneller als der zirkumferente entlang der Lamellen (Balice-Gordon et al. 1998). Auf diese Weise könnten kleine Moleküle wie Ionen, Metabolite und second messenger durch passive Diffusion rasch die Strecke zwischen axonalem und zellkernnahem Zytoplasma direkt durch die Myelinscheide überwinden und somit die intrazelluläre Kommunikation beschleunigen. Dies schließt aber die Möglichkeit eines aktiven Transports von großen Molekülen über zytoplasmatische Kanäle nicht aus (Garbay et al. 2000).

Vor der Differenzierung zu einer myelinisierenden oder zu einer nicht myelinisierenden Schwannzelle, lagern sich die von der Neuralleiste abstammenden Schwannzell-Vorläuferzellen den Axonen entlang an und migrieren mit diesen (Nave und Salzer 2006). Aus den Vorläuferzellen entwickeln sich frühe Schwannzellen, die mehrere Axone mit einer dünnen Schicht ihres Zytoplasmas umgeben. Der dabei entstehende Kontakt erlaubt nun die Interaktionen zwischen Schwannzelle und Axon. Dies ist die Entscheidungsbasis für die Differenzierung der Schwannzellen: entweder bei großem Axondurchmesser zu einer myelinisierenden oder bei kleinem Axondurchmesser zu einer nicht myelinisierenden Schwannzelle mit Bildung eines Remakbündels. Bei der Entwicklung myelinisierender Schwannzellen bilden sich zunächst promyelinisierende Schwannzellen. Diese umgeben anfänglich, nach schrittweiser Vereinzelung, mit einigen Spiralen das Axon. Mit fortschreitender Myelinisierung nimmt die Anzahl der Lamellen zu und es entstehen Abschnitte kompakten Myelins (Nave und Salzer 2006; Garbay et al. 2000) (Abb.2).

Abbildung 2: Schema der Schwannzell-Differenzierung; aus Nave und Salzer (2006), Seite 494

Bei der Betrachtung eines Ischiasnervs der Maus zeigt sich mit zunehmendem Alter die fortschreitende Entwicklung hin zur myelinisierenden Schwannzelle an der Morphologie der Axone. Im Alter von einem Tag sind kaum Myelinlamellen oder gar myelinisierte Axone zu finden. Bei der zwei Wochen alten Maus ist die große Mehrheit der Axone kompakt mit ca. 36 Lamellen myelinisiert und ähnelt schon reifen Axonen. Die maximale Myelinbildung tritt während der ersten 3 Wochen postnatal auf, was an der Anzahl der Myelinlamellen pro Axon abgeschätzt werden kann. Danach reduziert sich die Bildungsrate wieder. In erwachsenen Mäusen sind die Axone von durchschnittlich 50 bis 80 Lamellen umgeben (Garbay et al. 2000). Dabei gibt es eine Beziehung zwischen Anzahl der Myelinlamellen und Axondurchmesser, beziehungsweise Axonoberfläche. Das Verhältnis zwischen Axon und dem Axon mit seiner umgebenden Myelinscheide wird g-ratio genannt. Ein kleines g-ratio stellt eine dicke Myelinscheide dar und umgekehrt. (Abb.3)

Abbildung 3: "g-ratio" als Maß für die Myelinscheidendicke

Der Quotient aus Axondurchmesser (A) und dem Durchmesser des Axons mit Myelinscheide (B) wird als sogenanntes „g-ratio“ bezeichnet. Es dient als Maß für die Dicke des Myelins. Bei nicht ganz kreisrunden Myelinscheiden kann der Quotient aus innerem und äußerem Umfang als ausreichendes Maß für das Verhältnis der Durchmesser gelten.

1.1.2. Axon-Schwannzell-Interaktion

Die Entwicklung von myelinisierten Nervenfasern im PNS ist abhängig von komplexen Interaktionen zwischen Schwannzellen und Axonen. Dies beinhaltet auch die Feinregulation der Myelinisierung, welche zur präzisen, Millisekunden genauen Impulsweiterleitung über das Axon beiträgt (Waxman 1997). Die Myelinisierung muss also ein genau kontrollierter Vorgang sein. Störungen in dieser Regulierung sowie im Ablauf der Myelinisierung können die Impulsweiterleitung beeinträchtigen.

Jede Schwannzelle hat das Potential Myelin zu bilden, macht es aber nur bei Kontakt mit bestimmten Axonen (Aguayo et al. 1976, Bray et al. 1981). Die Myelinisierung wird zum Beispiel über die Axongröße beeinflusst, wobei typischerweise größere Axone ($> 1\mu\text{m}$) myelinisiert werden (Voivodic 1989). Die Abhängigkeit der Schwannzelle und ihrer Myelinscheide von einem intakten Axon gibt Grund zur Annahme einer regulierenden, axonalen Sekretion (Aguayo et al. 1976). Der kontinuierliche Kontakt zwischen Axon und Schwannzelle ist ebenso wichtig, führt doch der Verlust des Axonkontaktes zu einer Herabsetzung der Myelingenexpression (LeBlanc und Poduslo 1990). Dieser kontinuierliche Axonkontakt legt nahe, dass ein Signal zwischen einem axonalen Liganden und einem glialen Rezeptor weitergegeben wird, wie zum Beispiel durch Neureguline (NRG) und ErbB-Rezeptoren. Neureguline sind eine Familie von EGF (epidermal growth factor) -ähnlichen Liganden mit einer weiten funktionellen Bandbreite im Nervensystem. Sie interagieren mit ErbB-Tyrosin-Kinasen. Neuregulin-1 (NRG1) ist eine Unterform mit bedeutenden Effekten in der Entwicklung wie auch in der Aufrechterhaltung des reifen PNS (Esper et al. 2006). Neben der Funktion in der Axon-Glia Signalübertragung im PNS und im ZNS werden ebenfalls Funktionen bei der Entwicklung von motorischen Endplatten, der Migration von Interneuronen, der Synaptogenese und der synaptischen Plastizität im ZNS diskutiert (Esper et al. 2006). Drei Subtypen von NRG1 (NRG1-Typ I, II, III) mit unterschiedlichen Sequenzen an ihren Aminoenden können unterschieden werden (Esper et al. 2006). Alle besitzen eine EGF-ähnliche Domäne, welche für die Aktivierung des jeweiligen Rezeptors und damit für die Signalübertragung nötig ist (Esper et al. 2006). NRG1-Typ III ist, von Neuronen exprimiert, die Hauptisoform im PNS (Taveggia et al. 2005). Sie ist definiert durch ihre cysteinreiche Domäne (CRD), welche als Transmembrandomäne NRG1-Typ III an der Axonmembranoberfläche fixiert. NRG1-Typ III funktioniert, bezogen auf die Förderung der Myelinisierung, als juxtakrines Signal,

was wieder die Kontaktabhängigkeit von Axon und Schwannzelle herausstellt (Esper et al. 2006, Taveggia et al. 2005).

Die ErbB-Rezeptoren gehören zu der EGF-Rezeptor-Superfamilie. ErbB2-ErbB3-Heterodimere sind die relevanten NRG1-Rezeptoren, die von Schwannzellen exprimiert werden. Nach deren Aktivierung werden nachfolgend Signaltransduktionswege aktiviert (Nave und Salzer 2006). Untersuchungen an transgenen und konditionellen Mausmutanten konnten zeigen, dass axonales NRG1-Typ III über die Korezeptoren ErbB2/3 die Dicke der Myelinscheide beeinflusst (Michailov et al. 2004). In NRG1-Typ-III-heterozygoten Mausmutanten, mit reduzierter NRG1-Genexpression, waren die Axone hypomyelinisiert. Dieser Effekt trat vor allem bei kleinkalibrigen Axonen auf. Umgekehrt bewirkte eine neuronale NRG1-Typ-III-Überexpression eine Hypermyelinisierung. Wieder war der Effekt bei den kleinkalibrigen Axonen deutlicher. In beiden Fällen war die Ultrastruktur des Myelins, der lamellenartige Aufbau, nicht beeinträchtigt. In weiteren Untersuchungen mit NRG1-Typ-III-heterozygoten Mäusen zeigten sich Veränderungen im Remakbündel. In NRG1-Typ-III^{+/-}-Mäusen waren nicht myelinisierende Schwannzellen mit mehr Axonen assoziiert. Diese Axone waren teilweise inkomplett von Schwannzellausläufern umgeben und lagen sehr eng aneinander (Taveggia et al. 2005).

In-vitro-Experimente zeigten, dass durch eine bestimmte Schwellenkonzentration von NRG1-Typ III festgelegt werden kann, ob ein Axon myelinisiert oder, wie im Remakbündel, nur umhüllt wird (Taveggia et al. 2005). Niedrige NRG1-Typ-III-Level resultierten in einer Umhüllung des Axons durch nicht myelinisierende Schwannzellen, hohe Level hingegen förderten die Myelinisierung. Je höher die Menge an NRG1-Typ III über die die Myelinisierung initiiierende Schwellenkonzentration hinaus war, umso stärker war die Myelinbildung. Weiterhin zeigte sich, dass NRG1-Typ III auch für die regelrechte Aussortierung der Axone nötig ist. NRG1-Typ-III^{-/-}-Axone wurden von Schwannzellen nicht myelinisiert, was darauf hinweisen könnte, dass die Schwannzellen unfähig sind, diese Axone in ein 1:1-Verhältnis auszusortieren als Voraussetzung für die Myelinisierung (Taveggia et al. 2005).

Infolge des axonalen Kontakts mit der Bindung von NRG1-Typ III an ErbB2/3-Rezeptoren werden in den Schwannzellen Signaltransduktionswege, darunter der Weg über die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K), aktiviert und dessen Aktivität reguliert (Taveggia et al. 2005). *In-vitro*-Experimente weisen darauf hin, dass die PI3K-Aktivität die Schwannzellproliferation und -differenzierung, das Überleben der

Schwannzellen sowie die frühen Phasen der Myelinisierung der Axone beeinflusst, wie die Separation von großkalibrigen Axonen und das Auswachsen der Schwannzellmembran um das Axon (Ogata et al. 2004; Chuenkova et al. 2001; Maurel und Salzer 2000). Die Wichtigkeit des Kontaktes zwischen Axon und Schwannzelle für die Myelinisierung stellten Untersuchungen zum Protein Par-3 heraus. Dieses Protein ist in Schwannzellen nach Kontakt mit einem Axon asymmetrisch an der Axon-Glia-Kontaktstelle lokalisiert. Die Initiierung der Myelinisierung erfolgt ausschließlich an diesem Kontaktbereich und definiert so die Myelinisierung als fokalen Prozess (Chan et al. 2006). Par-3 Lokalisationsstörungen führten zur Myelinisierungshemmung (Chan et al. 2006).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass der Kontakt und die Interaktionen zwischen Axon und Schwannzelle essentiell für die Myelinisierung im PNS sind, sie aber einer genauen Regulation bedürfen.

1.1.3. Myelinopathien im PNS

Neuropathien sind häufige neurologische Erkrankungen mit breitem klinischem Spektrum und verschiedenen Ursachen. Schwannzellen und Neurone sind eine intensiv miteinander kommunizierende und dynamische Einheit. Die Unterbrechung dieses funktionierenden Systems kann zu peripheren Neuropathien führen. Die Charcot-Marie-Tooth-Erkrankungen (CMT), oder auch hereditäre motorisch-sensible Neuropathien (HMSN) genannt, sind mit einer Prävalenz von 1: 2500 eine heterogene Gruppe von genetischen Erkrankungen, die die peripheren Nerven betreffen (Skre 1974). In Abhängigkeit von den zugrunde liegenden veränderten Genen oder der Art der Mutation entstehen Defizite entweder in Schwannzellen oder in Neuronen oder in beiden. Dies führt direkt oder indirekt über eine gestörte Schwannzell-Axon-Interaktion zu Störungen in der Myelinisierung (Berger et al. 2006). Dabei können einerseits Mutationen in verschiedenen Genen zu ähnlichen Phänotypen und andererseits verschiedene Mutationen desselben Gens zu verschiedenen Phänotypen führen (Niemann et al. 2006). Klinisch sind CMT-Erkrankungen charakterisiert durch längenabhängige Schädigung der Axone im PNS, welche zu progressiver, distaler, symmetrischer Polyneuropathie mit Muskelschwäche führt, die die Füße und Unterschenkel, weniger die Hände betrifft. Eine progressive Muskelatrophie am Fuß führt zum Steppergang und zu sekundären Fußdeformitäten, wie Hohlfuß und Krallenzehen (Nave et al. 2007). CMT-Erkrankungen können klassischerweise eingeteilt wer-

den in primär demyelinisierende und primär axonale Formen. Bei den selteneren axonalen Formen sind initial die Neurone (Axone) betroffen. Bei demyelinisierenden Neuropathien wird angenommen, dass der Defekt in den Schwannzellen beginnt und zu Störungen des Myelins in Form von Dys- und Demyelinisierung mit folgendem längenabhängigen axonalem Verlust führt (Niemann et al. 2006; Suter und Scherer 2003). In Tabelle 1 sind ausgewählte Beispiele von CMT Erkrankungen in Kürze dargestellt. Molekulargenetische Untersuchungen konnten mutierte Myelinproteine, wie z.B. PMP22, P0/MPZ und Cx32 identifizieren. Aber auch Transkriptionsfaktoren und intrazelluläre Schwannzell-Proteine, wie MTMR2 und MTMR13 sind bei der Entstehung von demyelinisierenden CMT-Erkrankungen beteiligt (Berger et al. 2006). Eine regelmäßig aktualisierte Liste der hereditären Neuropathien und der verantwortlichen Mutationen ist verfügbar unter: <http://www.molgen.ua.ac.be/CMTMutations/>.

Beispiele von CMT-Erkrankungen		
Erkrankung	Mutation / mutiertes Gen	Klinik
autosomal oder x-chromosomal dominante, demyelinisierende Neuropathien		
HNPP	Deletion eines PMP22-Allels	episodisch, wiederkehrende Druckpareisen, Tomakula, Beginn Adoleszenz, chronische Verläufe möglich, besonders betroffen: N. medianus, N. ulnaris, N. peroneus
CMT1A	Duplikation eines PMP22-Allels	distal, symmetrische Muskelatrophie und -schwäche; Sensibilitätsverlust, Beginn in Füßen mit Progression nach proximal
CMT1B	P0/MPZ	ähnlich wie CMT1A, aber früherer Beginn und schwerere Verläufe
CMT1X	GJB1 (CX32)	ähnlich wie CMT1A, aber distale Atrophie deutlicher, Männer mehr betroffen als Frauen
autosomal dominante axonale Neuropathien		
CMT2A	KIF1B β	Beginn mit ca. 10. LJ, progressive Schwäche und Atrophie der distalen Beinmuskulatur und milder Sensibilitätsverlust
CMT2B	RAB7	Beginn in 2.bis 3. Lebensdekade, schwere Sensibilitätsverluste und distale Ulzerationen, Muskelschwäche
schwere demyelinisierende Neuropathien (autosomal dominant oder rezessiv ; CMT3)		
DSS	dominant: PMP22;P0/MPZ; GJB1 (CX32); rezessiv: MTMR 2	Beginn im frühen Kindesalter, schwere Muskelschwäche und -atrophie, v.a. distal mit Progredienz nach proximal, schwere Sensibilitätsverluste
autosomal rezessive demyelinisierende Neuropathien (CMT4)		
CMT4B1	MTMR2	Beginn im frühen Kindesalter, Progression bis zur Rollstuhlabhängigkeit möglich, fokal gefaltete Myelinscheiden
CMT4B2	MTMR13	Beginn im Kindesalter, Progression bis zum Gebrauch von Gehhilfen, fokal gefaltete Myelinscheiden, Glaukom

Tabelle 1: ausgewählte Beispiele von CMT-Erkrankungen mit mutierten Genen und typischer Klinik
in Anlehnung an; Nave et al.2007, S.454; Grossman et al. 2007; Chance 2006; Suter und Scherer 2003, S.715

Einige CMT-Erkrankungen weisen besondere Myelinmissbildungen auf. Diese histologischen Befunde können nach ihren Erscheinungsformen als kommaförmige Ausfaltungen, Einfaltungen, rückwärts gerichtete Schleifen und Tomakula (lat: Würstchen) bezeichnet werden (Abb.: 11). Tomakula sind fokale Hypermyelinisierungen, die als instabile Strukturen zur Degeneration und damit zur Demyelinisierung neigen (Adlkofer et al. 1997). 1972 beschrieben Behse und Buchthal als erstes diese „wurstförmigen Schwellungen“ der Myelinscheide (Behse et al. 1972). Madrid und Bradley gaben darauffolgend den Namen tomakulöse Neuropathie einer Erkrankung, deren Hauptmerkmal Tomakula sind (Madrid und Bradley 1975). Dies ist die HNPP (hereditary neuropathy with liability to pressure palsies, hereditäre Neuropathie mit Neigung zu Druckparesen). Tomakula können ebenso in IgM-paraproteinämischen Neuropathien, in chronisch entzündlichen, demyelinisierenden Neuropathien und in einigen weiteren Formen der CMT-Erkrankungen gefunden werden (Sander et al. 2000; Adlkofer et al. 1997). Im Folgenden sollen einige, mit Myelinmissbildungen assoziierte Formen der HMSN und ihre zugrundeliegenden mutierten Proteine vorgestellt werden.

Das in CMT-Erkrankungen am häufigsten betroffene Protein ist PMP22 (peripheres Myelinprotein mit 22kDa). Es ist ein glykosyliertes Transmembranprotein, welches ca. 2-5% des Myelinproteins im PNS ausmacht und an frühen Schritten der Myelinisierung beteiligt ist. Neben seiner strukturellen Funktion im kompakten Myelin mit Verantwortlichkeit für die Adhäsion zwischen den Myelinmembranen, reguliert es auch die Zellmigration und die Apoptose (Berger et al. 2006; Niemann et al. 2006; Suter und Scherer 2003). Eine Regulation des Zellwachstums wird ebenso diskutiert (Suter und Scherer 2003). Mutationen von PMP22 sind, je nach Gendosis, ursächlich für die autosomal dominanten Neuropathien HNPP und CMT1A (Nave et al. 2007; Berger et al. 2006). Der HNPP liegt eine heterozygote 1,5-Megabasen-Deletion auf Chromosom 17 zugrunde. Die ersten Symptome manifestieren sich in der Adoleszenz mit episodischen Druckparesen, welche durch leichte Traumata hervorgerufen werden (Adlkofer et al. 1997). Eine Rückbildung dieser Symptome erfolgt meist innerhalb von Tagen bis Monaten (Suter und Scherer 2003). Die klinische Progression und Schwere dieser Erkrankung ist sehr variabel. In speziellen Fällen können sich chronische periphere Neuropathien entwickeln. Als pathohistologische Veränderungen sind in Nervus-suralis-Biopsien typischerweise Tomakula zu finden. Heterozygote PMP22-Mausmutanten zeigten eine mit dem Alter progressive Zunahme der To-

makula (Adlkofer et al. 1997). Eine Duplikation des PMP22-Gens führt zur CMT1A. Es ist die am häufigsten auftretende demyelinisierende CMT-Form (Nave et al. 2007; Niemann et al. 2006). Die Klinik beginnt im jungen Erwachsenenalter mit distal akzentuierter, symmetrischer Muskelatrophie, Muskelschwäche und Sensibilitätsverlust der unteren Extremitäten sowie Steppergang, Fußdeformitäten und Reflexverlust (Nave et al. 2007; Suter und Scherer 2003). Die PMP22-Gendosis korreliert mit der Schwere der Erkrankung. Eine heterozygote Duplikation mit 1,5facher Überexpression von PMP22 führt zu eben beschriebener Klinik. Eine schwerere Verlaufsform wird durch eine homozygote Duplikation mit zweifacher Überexpression verursacht, was in einem Teil der Fälle zum Dejerine-Sottas-Syndrom (DSS) führt (Nave et al. 2007; Meyer zu Hörste 2005). Als histopathologische Befunde der CMT1A zeigen sich segmentale Demyelinisierungen und Zwiebelschalenformationen (Nave et al. 2007). Studien mit transgenen Mäusen mit regulierbarer Überexpression von PMP22 zeigten, dass die Demyelinisierung reversibel war, wenn die Überexpression ausgeschaltet wurde (Perea et al. 2001). Der zugrunde liegende Mechanismus ist aber noch nicht im Detail geklärt, evtl. ist ein genereller Signaltransduktionsweg verändert (Berger et al. 2006).

Das Hauptmyelinprotein P0/MPZ (Myelinprotein Zero), welches ca. 50% des Gesamtproteins im peripheren Nerven ausmacht, ist ein einfaches Transmembranprotein von 30kDa. Es gehört zu einer Familie von Adhäsionsproteinen mit einer Immunglobulin ähnlichen Domäne und wird im kompakten Myelin und nur von Schwannzellen exprimiert (Nave et al. 2007). Seine Beteiligung an der Verbindung aneinander liegender Myelinlamellen der Myelinscheide macht es unentbehrlich für die Myelinkompaktierung und somit für die effektive Myelinisierung und für den Myelinerhalt (Nave et al. 2007; Berger et al. 2006; Niemann et al. 2006; Suter und Scherer 2003;). Es wird eine Interaktion zwischen P0 und PMP22 angenommen, wobei sich die adhäsive, strukturelle Funktion verstärken soll (Niemann et al. 2006). Verschiedene P0-Mutationen konnten in verschiedenen CMT-Formen, z.B. der CMT1B durch eine Mutation auf Chromosom 1, nachgewiesen werden (Nave et al. 2007; Suter und Scherer 2003). So kann eine Störung des Myelinisierungs- und Kompaktierungsprozesses oder eine Störung in der Schwannzell-Axon-Interaktion mit axonaler Degeneration auftreten. Welcher molekulare Signalweg beteiligt ist, ist noch unklar. Diskutiert wird die Beteiligung des Neuregulinsignalweges, weil er eine wichtige Funktion in der Regulation vieler Aspekte der Schwannzell-Axon-Interaktion hat

(Berger et al. 2006). Ein Hinweis für die Beteiligung eines Signalweges könnte die Feststellung sein, dass das Expressionslevel von P0 mit der Ausprägung der Myelinveränderungen korreliert. So zeigen P0^{-/-}-Mäuse unkompaktes Myelin, Myelininstabilität und schwere Demyelinisierung, eine P0 Überexpression führt zu Dysmyelinisierungen mit bizarren Myelininformationen (Berger et al. 2006; Suter und Scherer 2003). Eine tomakulöse Neuropathie mit Assoziation zu einer P0-Mutation wurde als erstes von Thomas et al. 1994 beschrieben (Sander et al. 2000).

MTMR's sind Phosphoinositidlipid-3-Phosphatasen mit einer Spezifität für die Phosphoinositide PI3P und PI(3,5)P₂. Diese Substrate sind Regulatoren der Membranhomöostase und des Vesikeltransports (Berger et al. 2006; Niemann et al. 2006). Als Phosphatase interagiert MTMR2 mit dem Phosphatase-inaktiven Homodimer MTMR13, was zu einer drastischen Steigerung in der enzymatischen Aktivität in Bezug auf die Substrate PI3P und PI(3,5)P₂ führt (Berger et al. 2006). MTMR13 wird in vielen Geweben exprimiert inkl. Gehirn, Rückenmark und dem Nervus ischiadicus. Mutationen in MTMR2 oder MTMR13 führen zu CMT4B1 oder CMT4B2 mit der Ausbildung der gleichen Neuropathie. MTMR2-Mutationen reduzieren die Phosphataseaktivität drastisch. So wird angenommen, dass der Verlust der Phosphataseaktivität im Pathomechanismus von CMT4B1/2 involviert ist (Niemann et al. 2006). CMT4B1 ist eine rezessive, motorisch-sensible, demyelinisierende Neuropathie mit Myelinausfaltungen als typisches pathohistologisches Zeichen. Die Erkrankung beginnt im Kindesalter zwischen dem 2. und 4. Lebensjahr mit Schwäche und Sensibilitätsverlust der unteren Extremitäten und kann bis zum Erwachsenenalter bis zur Rollstuhlabhängigkeit fortschreiten (Bolino et al. 2004; Suter und Scherer 2003). Als Ursache wird eine Schwannzell-spezifische Störung der MTMR2-Funktion angenommen, da Experimente mit MTMR2-Null-Mäusen und die spezifische Inaktivierung von MTMR2 in Schwannzellen ähnliche, mit den Alter progrediente Neuropathien mit Myelinausfaltungen und rückwärts gerichteten Schleifen zeigten (Bolino et al. 2004). CMT1X ist mit ca. 10% die zweithäufigste auftretende erbliche Neuropathie. Sie ist x-Chromosom gekoppelt und nur schwer von der CMT1A zu unterscheiden. Eine Beinmähmung des Gehens und die Ausbildung eines Fallfußes sind klinische Zeichen, denen ein Sensibilitätsverlust und eine Atrophie der Handmuskulatur folgen können. Als Ursache wird eine Mutation im Gap-Junction-Protein Connexin 32 (Cx32) angenommen (Nave et al. 2007). Cx32 ist ein Transmembranprotein, welches den Austausch von Ionen und kleinen Metaboliten zwischen aneinander liegenden

Zellen reguliert (Berger et al. 2006). Im Myelin von peripheren Nerven wurde Cx32 in Regionen von Schmidt-Lantermann-Inzisuren und paranodalen Regionen in verschiedenen Membranlamellen derselben Schwannzelle gefunden (Berger et al. 2006; Niemann et al. 2006). Die Bildung solch spezieller Gap Junctions bietet die Möglichkeit eines wichtigen und schnellen Weges für den Durchtritt von Signalmolekülen über die Myelinscheide. (Nave et al. 2007, Suter und Scherer 2003). Ihre fehlerhafte Ausbildung durch Cx32-Mutationen könnte Störungen der Myelinisierung im peripheren Nerven verursachen (Suter und Scherer 2003). Welche Moleküle über die Cx32-spezifischen Kanäle gelangen, ist noch unklar (Niemann et al. 2006).

Das Wissen von den Ursachen der Dys- und Demyelinisierung durch die Erforschung von zellulären und molekularen Signaltransduktionswegen als Zugang zu den zugrunde liegenden Mechanismen in der normalen Entwicklung und in den Neuropathien ist eine wichtige Grundlage für die Entwicklung von potentiellen Behandlungsstrategien. Die bisherige Therapie von CMT-Erkrankungen beschränkt sich auf eine symptomatische Therapie mit supportiver Physiotherapie und Stressvermeidung wie optimale Diabetes-Einstellung, Alkoholverzicht und ausgewogener Ernährung. Experimentelle Therapieansätze beinhalten die Behandlung mit Progesteronantagonisten (Sereda et al. 2003), Vitamin C und Neurotrophen (Nave et al. 2007).

1.2. Der PI3K/AKT-Signaltransduktionsweg

Proteinphosphorylierung und -dephosphorylierung, angeregt durch extrazelluläre Stimuli, spielen bei der intrazellulären Signaltransduktion eine wichtige Rolle. Der PI3K/AKT-Signaltransduktionsweg ist eingebunden in die Regulation von vielen zellulären Prozessen, wie z.B. Wachstum, Apoptose, Proliferation, Zelladhäsion und Zellmigration und dient der Kontrolle von Organ- und Organismusgröße. Ein gestörter PI3K/AKT-Signalweg kann zur Entwicklung von Karzinomen oder Tumorprädispositionssyndromen beitragen (Marone et al. 2008). Bezogen auf das Nervensystem von Säugetieren ist dieser Signaltransduktionsweg beteiligt an komplexen Prozessen wie synaptischer Plastizität, dem Überleben von Neuronen und der Ausbildung axonaler Verzweigungen (Known et al. 2003). Detailliertes Wissen über die einzelnen Komponenten des PI3K/AKT-Signalweges ist bedeutend für das Verständnis von normalen zellulären Funktionen und ebenso für das Management von humanen Erkrankungen,

hervorgerufen durch Fehlregulation dieses Signalwegs. Im Folgenden sollen die wichtigsten Bausteine dieses Signalweges näher vorgestellt werden (Abb. 4).

Abbildung 4: PI3K/AKT-Signalweg; in Anlehnung an Stiles et al. 2004, S. 177 und Dancey 2006, S. 1066
Der PI3K/AKT-Signalweg ist dargestellt mit Effekten des PTEN-Verlustes und der mTOR-Inhibition.

1.2.1. Bestandteile des PI3K/AKT-Signaltransduktionsweges

Phosphoinositide sind membrangebundene, phosphorylierte Metabolite von Phosphatidylinositol und Bestandteile von Signaltransduktionswegen. Darunter ist $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$ (Phosphatidylinositol(3,4,5)Trisphosphat, PIP3) ein bedeutender second messenger. Die Level der Phosphoinositide werden reguliert durch Phosphoinositid-Kinasen und -phosphatasen. Dadurch entsteht ein „on-off“ (an/aus) -Wechsel des jeweiligen Signaltransduktionsweges. Der PI3K/AKT-Signaltransduktionsweg ist „an“, wenn $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ (Phosphatidylinositol(4,5)Bisphosphat, PIP2) durch die Phosphatidyl-

inositol-3-Kinase (PI3K) zu $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$ phosphoryliert wird (Marone et al. 2008). Er ist „aus“, wenn die Phosphatase PTEN $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$ wieder zu $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ dephosphoryliert (Sansal und Sellers 2004). Es wird angenommen, dass noch andere Mechanismen zur Regulation der $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$ -Level existieren, z.B. durch die Phosphoinositid-5-phosphatase SHIP (Marone et al. 2008; Maehama und Dixon 1998). Phosphoinositide scheinen wichtige regulatorische Faktoren in peripheren Nerven, Neuronen und myelinisierenden Schwannzellen zu sein. Die präzise Regulation der Phosphoinositidlevel innerhalb neuronaler Zellen ist möglicherweise wichtig für die akkurate Funktion myelinisierter peripherer Nerven (Suter 2007). Phosphoinositide könnten einen Zugang zu den noch zu großem Teil unbekannten molekularen Prozessen, wie der Regulierung der Myelinisierung peripherer Nerven, bieten. Die exakte Mitwirkung der Phosphoinositide an Signalwegen in Neuronen und Schwannzellen, die verschiedenen Formen der Regulationsmechanismen und der Beitrag und Einfluss anderer zellulärer Mechanismen daran, müssen noch näher untersucht werden (Suter 2007).

AKT, auch bekannt als Protein-Kinase-B (PKB), ist eine Serin/Threonin-Protein-Kinase. Sie ist für verschiedene zelluläre Prozesse wie Zellwachstum und Apoptose verantwortlich (Hanada et al. 2004). Mit der am Aminoende befindlichen PH (pleckstrin homology) -Domäne bindet AKT Phosphoinositide wie PIP_3 (James et al. 1996). Diese Bindung ist der geschwindigkeitslimitierende Schritt für die Aktivierung von AKT (Hay und Sonenberg 2004). Es sind über 50 AKT-Substrate bekannt, welche die vielfältigen Funktionen von AKT erklären könnten. Besonders in Signalwegen wie dem PI3K/AKT-Signalweg spielt AKT eine zentrale Rolle (Hanada et al. 2004).

Die 290-kDa-Serin/Threonin-Kinase mTOR reguliert wichtige Signaltransduktionswege, hat regulatorische Zellfunktionen und verbindet Signale von Wachstumsfaktoren mit der Proteintranslation (Dancey 2006; Neuhaus et al. 2001). Die Kinase-Domäne von mTOR besitzt Ähnlichkeit mit der katalytischen Domäne von PI3K. Somit gehört mTOR zur Familie der PI3K-ähnlichen Kinasen (PIKK) (Dancey 2006; Hay und Sonenberg 2004; Hidalgo und Rowinsky 2000). Die Effekte von mTOR vermittelten Signalwegen sind vielfältig und noch nicht vollständig verstanden. Viele experimentelle Daten weisen darauf hin, dass mTOR nachfolgend auf den stimulierten PI3K/AKT-Signalweg funktioniert (Hidalgo und Rowinsky 2000). mTOR reguliert die Proteinsynthese durch Phosphorylierung und Inaktivierung von 4E-BP, einem Repressor der mRNA-Translation, und durch die Phosphorylierung und Aktivierung der S6-Kinase, einem Initiator der mRNA-Translation (Neshat et al. 2001). Der Phosphorylierungs-

status von 4E-BP und S6 wird oft als Maß für die mTOR-Aktivität genutzt (Hay und Sonnenberg 2004). mTOR spielt eine zentrale Rolle beim Zellwachstum und der Zellproliferation (Hay und Sonnenberg 2004). Ebenso zeigen sich Effekte auf die Zellzyklusprogression und auf die Apoptose. Eine gesteigerte mTOR-Aktivierung kann zur Entstehung von Karzinomen beitragen (Dancey 2006). Weiterhin konnte eine mTOR-abhängige neuronale Hypertrophie bei PTEN-Defizienz gezeigt und somit mTOR als ein Schlüsseffektor für Hypertrophie vermittelnde Wachstumssignale in Neuronen herausgestellt werden (Known et al. 2003).

Verschiedene Erkrankungen sind von einem permanent stimulierten PI3K/AKT-Signalweg mit resultierender kontinuierlicher Proliferation oder längerem Überleben von Zellen abhängig. Dies bietet eine Möglichkeit des therapeutischen Eingriffs in diesen Signalweg in Form von direkter Beeinflussung einzelner Komponenten, z.B. durch Inhibition von PI3K, AKT, Rezeptor-Tyrosin-Kinasen oder durch die Inhibition von mTOR.

1.2.2. PTEN

PTEN ist ein Tumorsuppressorgen, welches den PI3K/AKT-Signalweg antagonisiert. Dabei steht PTEN für phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10, weil Sequenzanalysen ergaben, dass dieses Gen, lokalisiert auf Chromosom 10q23, stellenweise große Übereinstimmung zu dem Zytoskelettprotein Tensin aufweist und als Phosphatase fungiert (Sansal und Sellers 2004; Stiles et al 2004; Dahia 2000; Stambolic et al. 1998). Die Expression von PTEN ist schon im embryonalen Stammzellstadium nachweisbar und erfolgt in extraembryonalen und embryonalen Geweben. In frühen Entwicklungsstadien wird PTEN ubiquitär, später beschränkt in bestimmten Organen und Geweben gebildet. Eine hohe Expression findet sich im ZNS, in der Leber, der Haut, im Herz und im Gastrointestinaltrakt (Stiles et al. 2004). Auf zellulärer Ebene ist PTEN sowohl im Zytosol als auch im Nukleus präsent. Seine biologische Funktion ist evolutionär festgelegt von *C. elegans* bis zum Menschen (Stiles et al. 2004). PTEN weist sowohl eine Protein- als auch eine Lipidphosphataseaktivität auf. Dabei ist die Lipidphosphataseaktivität wichtig für seine Tumorsuppressorfunktion (Myers et al. 1998). Das spezifische Hauptsubstrat von PTEN ist PIP₃, welches an der D3-Position des Inositolringes dephosphoryliert wird (Maehama und Dixon 1998; Myers et al. 1998). Die 3-Phosphataseaktivität konnte aber auch bei anderen Phosphoinositiden nachgewiesen werden (Maehama und Dixon 1998). Katalytisch

inaktives PTEN führt zu einer Akkumulation von PIP3 in den Zellen. Eine Überexpression von PTEN reduziert die zellulären Level von PIP3 und reguliert damit als Antagonist der PI3K den PI3K/AKT-Signalweg negativ (Maehama und Dixon 1998). In PTEN^{-/-}-Zellen konnte eine gesteigerte AKT-Aktivität in Form von Phospho-AKT (P-AKT) festgestellt werden (Stambolic et al. 1998). Ein PTEN-kontrollierter Signaltransduktionsweg reguliert zelluläre Prozesse, die entscheidend sind für Wachstum und Entwicklung, inkl. Zellproliferation, Zellwachstum, Zelltod und Zellmigration.

PTEN-Keimbahnmutationen führen zur Entstehung von hereditären Karzinom-Prädispositionssyndromen wie Cowdens Syndrom (CS), Lhermitte-Duclos-Disease (LDD) und Bannayan-Zonana-Syndrom (BZS). CS und BZS fallen durch die vermehrte Bildung von Hamartomen in multiplen Organen auf, aber auch Makrozephalie, Lipome und Hämangiome sind zu beobachten. Während CS gehäuft zwischen der zweiten und dritten Lebensdekade auftritt, beginnen die Symptome von BZS in der Kindheit (Pilarski 2009). LDD manifestiert sich mit einer langen Anamnese von unklaren neurologischen Symptomen hohen intrakraniellen Druckes bei jungen Erwachsenen. Ursächlich ist eine langsam wachsende Raumforderung in der Kleinhirnrinde, histopathologisch korrespondierend mit einem zerebellärem Hamartom (Nowak und Trost 2002). Alle diese Syndrome haben ein erhöhtes Risiko für die Ausbildung von Mamma- und Schilddrüsen-Karzinomen ebenso wie für die Entwicklung von Endometrium-Karzinomen. Der genetische Locus für sie ist auf Chromosom 10q23, dem Genort für PTEN. In 80% der Familien mit CS und in 60% in Personen mit BZS wurden Keimbahnmutationen von PTEN nachgewiesen (Sansal und Sellers 2004). Oft, aber nicht ausschließlich befand sich bei CS die Mutation in Exon 5, der Ort wo die Phosphatasefunktion von PTEN kodiert ist (Dahia 2000). Genetische Alterationen des PTEN-Tumorsuppressorgens gehören zu den häufigsten somatischen Mutationen in humanen Tumoren, z.B. mit einer hohen Rate in Glioblastoma multiforme und im Endometrium-Karzinom, einer moderaten Rate im Prostata-Karzinom und einer niedrigen Rate im Blasen-, Ovar- und Mamma-Karzinom sowie im Kleinzelligen-Lungenkarzinom und hämatologischen Tumoren (Dahia 2000). In glialen Tumoren ist die Frequenz von PTEN-Mutationen positiv korreliert mit dem Tumorgrad und assoziiert mit einer schlechten Prognose der Patienten (Sansal und Sellers 2004).

Um die Funktion von PTEN zu untersuchen, wurden verschiedene Tiermodelle mit PTEN-Mutationen entwickelt. Da PTEN-Null-Tiere schon zeitig während der Embryogenese sterben, wurden gewebespezifische PTEN-Mutanten mit Hilfe des CreLoxP-

Systems für diese Untersuchungen generiert (Kishimoto et al. 2003). Konditionelle PTEN-Mausmutanten zeigten Organomegalien in Herz, Prostata und Haut (Stiles et al. 2004). In speziellen PTEN-Deletionen im Mausgehirn zeigten sich zweifach größere Gehirne mit höherem Gewicht, die aus Zellproliferationssteigerung, Apoptosehemmung und Zellgrößenzunahme resultierten, was mit einer Dysregulation des PI3K/AKT-Signaltransduktionsweges in Einklang gebracht werden könnte. Auch die Histoarchitektur der mutierten Gehirne war gestört (Stiles et al. 2004; Kishimoto et al. 2003). In der Molekularschicht des Kleinhirns fand sich eine gesteigerte Myelinisierung (Kishimoto et al. 2003). Zwischen den Körnerzellen des Gyrus dentatus war der Interzellularraum erweitert. Die Körnerzellen des Kleinhirns waren zweifach größer als in den Kontrollen und wiesen verstärkte Level von P-AKT auf (Kishimoto et al. 2003).

Experimente zur Untersuchung von beteiligten Signalwegen an der Myelinisierung im PNS konditioneller Mausmutanten, in denen PTEN speziell in Schwannzellen ausgeschaltet wurde, ergaben eine vermehrte Bildung von Tomakula und anderen Myelinabnormalitäten, ähnlich zu denen in den CMT-Erkrankungen (Goebbels 2008). Eine Progression mit dem Alter konnte nachgewiesen werden. Weiterhin stieg die Anzahl der myelinisierten Axone, die Axondichte verringerte sich jedoch bei gleichzeitig stark gestiegenem Durchmesser der Nerven. Eine Tendenz zur Hypermyelinisierung zeigte sich besonders an kleinkalibrigen Axonen. In Bezug auf die Remakbündel mit unmyelinisierten Axonen war die Ordnung in den Mutanten aufgehoben. Manche Remakaxone zeigten anstelle der normalen einfachen Umhüllung mehrere Umwicklungen von unkompakten Myelinlamellen. Diese Mausmutanten mit spezifischem Verlust von PTEN in Schwannzellen können als ein Tiermodell einer experimentellen Neuropathie angesehen werden (Goebbels 2008).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass PTEN wichtige zelluläre Prozesse wie die Zellproliferation, Zellwachstum und Apoptose reguliert. Der Verlust von PTEN führt zu Veränderungen in der Zellhomöostase, welche vom Aktivitätsgrad des PI3K/AKT-Signalwegs abhängig ist.

1.2.3. Rapamycin – ein spezifischer mTOR-Inhibitor

Rapamycin, auch als Sirolimus bekannt, wurde ursprünglich 1969 auf der Osterinsel Rapa Nui als Antimycotikum aus dem Ascomyceten *Streptomyces hygroscopicus* isoliert. Es ist ein 914Da-Makrolidlacton mit potenten antimycotischen, immunsupp-

ressiven, antiproliferativen und antitumorösen Eigenschaften. Rapamycin bindet kompetitiv an seinen intrazellulären, zytosolischen Rezeptor der Immunophilinfamilie, an das Peptidyl-Prolyl-cis-trans-Isomerase-FK506-Bindungsprotein mit 12 kDa (FKBP12). Der entstandene FKBP12-Rapamycin-Komplex interagiert mit und hemmt die Aktivität von mTOR. Der Komplex bindet nah an die Kinase-Domäne von mTOR und hemmt aufgrund von veränderter Konformation oder Zusammensetzung deren Proteinkinaseaktivität. Die Hemmung von mTOR blockiert die folgenden Signaltransduktionswege der S6-Kinase und von 4E-BP. Somit werden die Zellproliferation und das Zellwachstum unterbunden (Weischer et al. 2007; Dancey 2006; Mutschler et al. 2006; Kaefer und Resch 2005; Neuhaus et al. 2001; Hidalgo und Rowinsky 2000).

Rapamycin wird interindividuell sehr variabel, aber schnell im Gastrointestinaltrakt (GIT) absorbiert und erreicht seine maximale Konzentration im Blut mit einer oralen Bioverfügbarkeit von ca. 15% in weniger als einer Stunde. Die mittlere Halbwertszeit von Rapamycin beträgt ca. 62 Stunden. Ein steady state wird nach etwa 7 bis 14 Tagen erreicht. Vollständig metabolisiert wird Rapamycin durch das in Leber und Darm vorkommende Cytochrom-P450-Enzym CYP 3A4. Daraus können vielseitige Interaktionen mit anderen Medikamenten und Substanzen (CYP 3A4-Induktoren oder CYP 3A4-Hemmern) resultieren. Die Metabolite werden zu 91% durch den GIT und zu 2% über die Nieren eliminiert. Um die Inhibition von mTOR zu bestätigen, kann das pharmakodynamische Monitoring durch die Messung der S6-Kinase-Aktivität erfolgen (Dancey 2006; Mutschler et al. 2006; Kaefer und Resch 2005; Neuhaus et al. 2001). Als unerwünschte Arzneimittelwirkungen von Rapamycin wurden Hypercholesterinämie, Hypertriglycerinämie, Hyperglykämie, Thrombozytopenie, Anämie, Lymphocytose, Wundheilungsstörungen, Ödeme, Diarrhoe, Elektrolytabweichungen, Mukositis und Infektionen beschrieben (Dancey 2006; Mutschler et al. 2006; Kaefer und Resch 2005; Neuhaus et al. 2001). Die Toxizität wird als generell mild, reversibel und oft dosisabhängig beschrieben. Eine Dosisreduktion, das Absetzen des Medikaments oder sowohl diätische als auch konservative Maßnahmen können der Toxizität entgegen wirken (Dancey 2006; Neuhaus et al. 2001). Rapamycin zeigt keine Neurotoxizität und keine eigene Nephrotoxizität. Eine Verstärkung der Nephrotoxizität anderer Substanzen ist aber möglich. (Mutschler et al. 2006; Kaefer und Resch 2005; Neuhaus et al. 2001).

Aufgrund der immunsuppressiven Eigenschaften wurde Rapamycin initial als Mittel zur Prävention gegen die Abstoßung von allogenen Transplantaten eingesetzt. In

präklinischen Studien wurde überprüft, dass Rapamycin hocheffektiv in Prävention und Behandlung bei akuten und chronischen Abstoßungsreaktionen in verschiedenen Transplantatmodellen ist. Es wird klinisch bei der Aufrechterhaltung der Immunsuppression bei Nierentransplant-Patienten eingesetzt (Neuhaus et al. 2001). Weiterhin findet es Verwendung als Stentbeschichtung zur Vermeidung von Restenosen in Koronararterien (Dancey 2006).

Rapamycin wurde umfassend bei Organtransplantatpatienten, die unter immunsuppressiver Therapie ein erhöhtes Risiko für Malignome aufweisen, bewertet und die daraus resultierenden Ergebnisse zeigten eine antitumoröse Aktivität (Dancey 2006). In den Tumorgeweben war nach Rapamycinbehandlung unter anderem die Aktivität der S6-Kinase vermindert und das Wachstum verlangsamt durch Hemmung von 4E-BP (Weischer et al. 2007; Dancey 2006). Weiterhin wurde der antitumoröse Effekt von Rapamycin durch Wachstumshemmung *in vitro* bei Tumorzellen von Kleinzelligen-Lungenkarzinomen, Rhabdomyosarkomen, Neuroblastomen, Glioblastomen, Osteosarkomen, Pankreas-, Mamma- und Prostatakarzinomen, Leukämien und B-Zelllymphomen demonstriert (Weischer et al. 2007).

Obwohl Rapamycin eindrucksvolle Ergebnisse in experimentellen Behandlungen von Tumoren aufweist, wird es aufgrund seiner schlechten Wasserlöslichkeit und schlechten chemischen Stabilität bei der klinischen Entwicklung als Anti-Tumor-Mittel ausgeschlossen. Dafür treten neu synthetisierte Rapamycin-Analoga mit besserer Wasserlöslichkeit und Stabilität an dessen Stelle: Temsirolimus (CCI-779) und Everolimus (RAD001). CCI-779 ist ein wasserlösliches Esteranalogon mit hervortretendem antitumorösen Profil und guten pharmazeutischen und toxikologischen Eigenschaften. Es beeinflusst gleichermaßen wie Rapamycin die Zellzyklusprogression und hemmt ebenso die mRNA-Translation von essentiellen Zellzyklusproteinen. Seine Aktivität gegen eine breite Palette von humanen Tumoren konnte in Gewebekulturen und Xenograft-Modellen nachgewiesen werden. CCI-779 hat bereits verschiedene Phase-1-Studien durchlaufen und zeigt sich als gut verträglich (Hidalgo und Rowinsky 2000). Rapamycin und seine Derivate mit verschiedener Bioverfügbarkeit und pharmakologischen Eigenschaften zeigen ähnliche Toxizität, es sind aber Unterschiede in der Schwere und Frequenz erkennbar (Dancey 2006). Obwohl die Regression von etablierten Tumoren in präklinischen Studien mit CCI-779 beschrieben wurde, ist die Tumorstillstandsverzögerung der prinzipielle therapeutische Effekt des Mittels (Hidalgo und Rowinsky 2000). Alle in klinischer Entwicklung befindlichen

mTOR-Inhibitoren haben eine antiproliferative Aktivität in verschiedenen hämatologischen und soliden Tumoren, entweder als Einzeltherapeutikum oder in Kombination mit Standard-Chemotherapie oder Radiotherapie (Dancey 2006). Es ist aber wichtig zu erkennen, dass nicht alle Funktionen von mTOR durch Rapamycin beeinflusst werden können und es so wohlmöglich nicht das einzige Mittel der mTOR-Inhibition darstellt. mTOR-Inhibitoren können aber längere stabile Krankheitsstadien und sogar Tumorregression in einem Teil der Patienten hervorrufen. Für eine genaue Definition von optimalen Dosierungen, der Patientenauswahl und von Kombinationsstrategien sind noch weitere Forschungen nötig (Dancey 2006).

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass Zellen mit einem aberranten PI3K/AKT-Signalweg sensitiv auf die Behandlung mit Rapamycin reagieren (Neshat et al. 2001; Dancey 2006; Hidalgo und Rowinsky 2000). Studien, die die potentielle Beteiligung des mTOR/S6K-Signalweges in PTEN-defizienten Mäusen und den Effekt der mTOR-Inhibition mit dem Rapamycinester CCI-779 untersuchten, haben gezeigt, dass die Wirkung der Inhibition sensitiver im veränderten, aktivierten Signalweg ist im Vergleich zu Wildtypen (Podsypanina et al. 2001). Eine langfristige Gabe von CCI-779 verhinderte in PTEN^{+/-}-Maus-Tumor-Modellsystemen das Tumorwachstum und die Tumorphiliferation ohne Effekt auf die AKT-Aktivität. Die S6K-Aktivität hingegen wurde unterdrückt (Podsypanina et al. 2001). Weiterhin ergaben Studien, in denen Mauszellen und humane Karzinomzellen mit definitivem PTEN-Status verwendet wurden, dass das Wachstum von PTEN-Null-Zellen durch eine mTOR-Inhibition mit CCI-779 blockiert werden kann. In Bezug auf die Inhibition ergab sich ebenso eine höhere Sensitivität der PTEN^{-/-}-Mauszellen und der PTEN-defizienten humanen Tumorzelllinien auf die Behandlung mit CCI-779 (Neshat et al. 2001). Um den Einfluss vom mTOR-Signalweg auf die durch PTEN beeinflusste Wachstumsregulierung im Nervensystem der Säugetiere zu untersuchen, wurden konditionelle PTEN-Mausmutanten (PTEN^{loxP/loxP}, Gfap-cre) mit CCI-779 behandelt (Known et al. 2003). Die selektive Inaktivierung von PTEN in Körnerzellen des Kleinhirns und des Gyrus dentatus von Mäusen verursachte zellautonome Hypertrophien, Makrozephalien, Krampfanfälle und Tod. Die mTOR-Inhibition konnte die Anfallshäufigkeit und die Todesrate senken sowie eine Zunahme der Neuronensomagröße in jungen Mäusen verhindern und in erwachsenen Mäusen reduzieren. Dabei wurde die Somagröße der Neurone in Wildtypmäusen nicht vermindert. Es wurden regionale Unterschiede innerhalb des ZNS auf die Effektivität der mTOR-Inhibition festgestellt. Hippokampale

Regionen reagierten *in vivo* mit einer größeren Sensitivität auf die CCI-779-Behandlung als zerebelläre. *In-vitro*-Versuche konnten dieses Ergebnis nicht wiederholen. Dies legt nahe, dass regional verschiedene Aufnahmen des Mittels ursächlich sind und nicht zelleigene Unterschiede (Known et al. 2003). Es konnte gezeigt werden, dass in jeweils adäquaten Dosen die durch den PTEN-Mangel hervorgerufenen Abnormalitäten sowohl im Gyrus dentatus als auch im Zerebellum bedeutend, wenn auch inkomplett, korrigiert werden konnten (Known et al. 2003). Eventuell ist eine Komponente des Hypertrophiesignals mTOR-unabhängig und es könnte auch schwieriger sein, bereits fortgeschrittene Hypertrophieerscheinungen, welche schon sekundäre Veränderungen verursacht haben, umzukehren, wie z.B. die kompensatorische Vergrößerung der Gliazellen im vergrößerten Kleinhirn oder eine gesteigerte Myelinisierung (Known et al. 2003).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass Rapamycin und seine Derivate eine Hemmung eines Teils des PI3K/AKT-Signaltransduktionsweges durch die spezifische Hemmung von mTOR induzieren können. Ein gestörter PI3K/AKT-Signalweg, z.B. durch PTEN-Defizienz, weist eine besondere Sensitivität für die mTOR-Inhibition auf. Nicht alle durch mTOR angeregten Funktionen sind durch Rapamycin beeinflussbar und das Ansprechen auf Rapamycin ist nicht in allen Geweben identisch.

1.3. Hypothese und Zielsetzung

Bei hereditären peripheren Neuropathien treten Störungen in der Myelinscheidenbildung auf. Die Myelinscheide im PNS ist eine spiralförmige Ausstülpung der Schwannzellmembran, welche Axone umhüllt und isoliert mit der Folge einer schnellen und effizienten Erregungsweiterleitung. Bei der Regulation der Myelinisierung besteht ein intensives Zusammenspiel zwischen Schwannzelle und Axon. Die beteiligten Signalwege sind noch weitgehend unbekannt, aber eine Signaltransduktion über PI3K und AKT ist wahrscheinlich. Experimente mit in Maus Schwannzellen konditionell inaktiviertem PTEN, einer PI3K-antagonisierenden Lipidphosphatase, zeigten unter anderem eine mit dem Alter progressive Ausbildung von Myelinmissbildungen, eine Hypermyelinisierung der Axone, Veränderungen der Anzahl und der Dichte von myelinisierten Axonen und eine aufgehobene Ordnung in den Remakbündeln. Gleichzeitig wurde eine verstärkte Aktivierung des AKT/mTOR-Signalweges auf Proteinebene nachgewiesen. Einige Formen der hereditären peripheren Neuropathien weisen ähn-

liche Myelinmissbildungen, wie bei durch PTEN-Verlust hervorgerufenem, gesteigerten PI3K/AKT/mTOR-Signalweg auf.

Die Hypothese der vorliegenden Arbeit basiert darauf, dass eine Blockade des gesteigerten AKT/mTOR-Signalweges die auftretenden Myelinveränderungen verhindern könnte. Dazu wurden konditionelle PTEN-Mausmutanten mit dem selektiven mTOR-Inhibitor Rapamycin behandelt und auf die Anzahl und Dichte von myelinisierten Axonen, die Ausbildung von Myelinmissbildungen, die Myelindicke sowie auf die Ordnung innerhalb der Remakbündel hin untersucht. Als Vergleichsgruppen dienten mit Rapamycin behandelte Wildtyptiere sowie unbehandelte PTEN-Mausmutanten und unbehandelte Wildtyptiere. Ebenso könnten die Ergebnisse dieser Arbeit erste Ansätze einer möglichen Therapieoption für, durch gesteigerten AKT/mTOR-Signalweg hervorgerufene und mit Myelinmissbildungen assoziierte, hereditäre Neuropathien bieten.

Ziel dieser Arbeit war es, durch die experimentelle Therapie mit Rapamycin die durch PTEN-Verlust hervorgerufenen Myelinmissbildungen zu verhindern und eine Beteiligung von mTOR als Bestandteil des PI3K/AKT-Signalweges bei der Myelinisierung im PNS nachzuweisen. Dabei sollte auch die regulatorische Bedeutung von PIP3 nochmals herausgestellt werden.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien und Bioreagenzien

Aceton	Merck, Darmstadt
APS (Ammoniumperoxidsulfat)	Merck, Darmstadt
Avertin	
{1g Tribrommethanol (Aldrich); 0,81ml Amylalkohol (Merck); 71,49ml H ₂ O}	
Azur-II-Farbstoff	Merck, Darmstadt
Bleicitrat	
{1,33g Bleinitrat (Merck); 1,76g Natriumcitrat (Merck); 30ml H ₂ O}	
Chloroform	Merck, Darmstadt
Coomassie-brilliant-blue	Serva, Heidelberg
DDSA	
(2-Duodeceny succinic acid anhydrid)	Serva, Heidelberg
DMP-30	
(2,4,6-tris-dimethylaminomethyl-Phenol)	Serva, Heidelberg
ECL (enhanced chemiluminescence kit)	Perkin Elmer LifeSciences, Boston
EGTA	Serva, Heidelberg
Ethanol	J.T.Baker, Deventer, Holland
Formvar	Plano, Wetzlar
Glycerin	Merck, Darmstadt
Glycidether 100	Serva, Heidelberg
Glycin	Merck, Darmstadt
HBSS (Hank's Balanced Salt Solution)	Lonza, Bio Whittaker
HCl (Salzsäure)	Serva, Heidelberg
Hepes	Roth, Karlsruhe
Isobutanol	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Methanol	J.T.Baker, Deventer, Holland
Methylenblau	Merck, Darmstadt
MgCl ₂ (Magnesiumchlorid)	Merck, Darmstadt
Milchpulver (frema reform)	Granovita, Lüneburg
MNA (Methylnadic Anhydrid)	Serva, Heidelberg
NaCl (Natriumchlorid)	Merck, Darmstadt
NaH ₂ PO ₄ ·xH ₂ O	
(Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat)	Merck, Darmstadt
Na ₂ HPO ₄ ·x2H ₂ O	
(Dinatriumhydrogenphosphat-2-hydrat)	Merck, Darmstadt

Na ₃ VO ₄	
(Trinatriumvanadatetrihydrat)	Merck, Darmstadt
Natriumacit	Merck, Darmstadt
OsO ₄ (2%) Osmiumtetroxid	Serva, Heidelberg
PAA (Polyacrylamid) 30%	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
PBS (phosphate buffered saline)	Merck, Darmstadt
PEG400 (Polyethylenglycol 400)	Fluka, Buchs, CH
PFA (Paraformaldehyd)	Serva, Heidelberg
Precision Plus Protein (dual color standards)	Bio-Rad, München
Propylenoxid	Serva, Heidelberg
Rapamycin	LC Laboratories, USA
RHL Document Type Developer (Entwickler)	Rollei GmbH, Braunschweig
Roentogen Superfix (Fixierer)	Tetenal AG&CoKG, Norderstedt
SDS (Sodiumdodecylsulfat)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
TEMED (Tetramethylethyldiamin)	Serva, Heidelberg
Tris (Tris(hydroxymethyl)aminomethan-Base)	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Tween 20	Merck, Darmstadt
Tween 80	Fluka, Buchs, CH
Uranylacetat	SPI-Chem, West Chester, USA
β-Merkaptoethanol	Merck, Darmstadt

2.1.2. Verbrauchsmaterial

Amersham Hyperfilm ECL	GE Healthcare, UK
Deckgläser	Menzel-Gläser, Braunschweig
Einbettkörbchen Segment Baskets	Science Services, München
Einmalhandschuhe Peha soft powderfree	Hartmann, Heidenheim
Eppendorfgefäße	Eppendorf, Hamburg
Eukitt (histologisches Einschlussmittel)	Kindler, Freiburg
Falconröhrchen 50ml	Becton & Dickinson, USA
Grids	Agar-Scientific, UK
Immersol 518N	Zeiss, Oberkochen
Injektionskanülen	Becton & Dickinson, USA
Linsenpapier (MN13B)	Machery-Nagel, Düren
Maco-EM-Films EMS (schwarz-weiß Negativ)	Maco, Stapelfeld
Microtiterplatte 96 well	Becton & Dickinson, USA
Nitrocellulosemembran	GE Healthcare, UK
Objektträger	Menzel-Gläser, Braunschweig;
Parafilm „M“	Pechiney Plastic Packaging, USA
Pipettenspitzen	Molecular Bioproducts, San Diego, CA, USA
	Roth, Karlsruhe

Spritzen

Syringe Driven Filter Unit "Millex"

Trockeneis

Venenpunktionsbesteck (Venofix)

Becton & Dickinson, USA;

Braun, Melsungen

Millipor Corporation, USA

Messer-Griesheim, Krefeld

Braun, Melsungen

2.1.3. Geräte

Diamantmesser

(Ultrathin Diamond Knife 45°)

EM-Mikroskop

„Transmissions EM „EM900PC“

Entwickler „Kodak X-omat 1000

Feinwaage „extend“

Filmbox 18x24cm

Fräse EM-Trim m.stereo2

Gefrierschränke -20°

-80°

Gelgießvorrichtung

Gelkämme (10 well; 1,5mm)

Gelkammer

Gewebeeinbettautomat „Lynx el“

Gewebehomogenisierer „Polytron 1200E“

Glasplatten

Glaswaren

Heizplatte HI1120

Kamera auf Leica LM

„C14 Resolution Colour Camera“

LM-Mikroskop „LeicaDM RXA“

Magnetrührer „IKA-Combimag_MCH“

Peristaltikpumpe „Heraeus SR70“

Pipetten (10;20;200;1000µl)

Reax 2

Reinstwasseranlage „arium 611“

Ultramicrotom „Ultracut S“

Vortex „Genie2“

Zentrifuge

„Capsule Tomy HF120“

„Eppendorffzentrifuge 5415C“

Diatome, Biel, CH

Zeiss, Oberkochen

Kodak, Rochester, NY, USA

Sartorius, Göttingen

INTAS, Göttingen

Leica, Microsystems, Wetzlar

Liebherr, Ochsenhausen

New Brunswick Scientific, Nürting

Bio-Rad, München

Bio-Rad, München

Bio-Rad, München

Vision BioSystems Inc, Norwell, MA
USA

Kinematica, Littau/Luzern, CH

Bio-Rad, München

Scott, Mainz

Leica Microsystems, Wetzlar

Jenoptik, Jena

Leica Microsystems, Wetzlar

IKA Labortechnik, Staufen

Heraeus Instruments, Langenselbold

Gilson, Frankreich

Heidolph, Schwabach

Sartorius, Göttingen

Leica Microsystems, Wetzlar

Bender & Hobein AG, München

Tomy Tech, USA

Eppendorf, Hamburg

2.1.4. Antikörper

2.1.4.1. Primärantikörper

Anti-Akt (#9272)	Cell Signaling, Danvers, USA
Anti-Phospho-Akt (Ser473) (#9271)	Cell Signaling, Danvers, USA
Anti-S6-Ribosomal-Protein (#2212)	Cell Signaling, Danvers, USA
Anti-Phospho-S6-Ribosomal-Protein (Ser235/236) (#2211)	Cell Signaling, Danvers, USA

2.1.4.2. Sekundärantikörper

HRP anti-rabbit IgG	Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA
HRP anti-mouse IgG	Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA

2.1.5. Lösungen und Puffer

2.1.5.1. Fixation von Versuchstieren

EPON Mischungsansatz:
21,4g Glycidether 100 14,4g DDSA 11,3g MNA
10 min. rühren,
0,84ml DMP-30
20 min. rühren, Polymerisation bei 60° für 24 Stunden

Fixans nach Karlson & Schultz (für 500ml)
200ml Paraformaldehyd (PFA), (20g in 200ml ddH ₂ O)
Kochen und dann „klären“ mit 6-8 Tropfen NaOH 1M, abkühlen lassen
0,9g NaH ₂ PO ₄ xH ₂ O 7,75g Na ₂ HPO ₄ x2H ₂ O 2,5g NaCl 250ml ddH ₂ O
dazu geben und alles steril filtern

Rapamycin-Injektionslösung 0,5mg/ml

100mg Rapamycinpulver lösen in 2ml EtOH (50mg/ml)

Dies 1:50 lösen in PEG400/8% EtOH (1mg/ml)

Dies 1:2 lösen in 10% Tween 80 (0,5mg/ml)

Für die als Placebo verwendete Injektionslösung wurde der eben beschriebene Ansatz ohne Rapamycinpulver verwendet.

2.1.5.2. Western Blot**Laufpuffer (10fach konzentriert):**

250mM Tris

1920mM Glycin

1% SDS

vor Verwendung 10fach verdünnen

Blotting Puffer:

48mM Tris

39mM Glycin

20% Methanol

(ohne SDS 0,1%)

Blocking Puffer (1l):

100ml PBS 10fach

50g Magermilchpulver

500µl Tween 20

900ml ddH₂O

mit Magnetrührer vermischen und filtrieren

TBS-T Waschlösung (10l):

500ml TBS (20fach)

5ml Tween 20

9500ml ddH₂O

TBS:

1M Tris

3M NaCl

Mit ddH₂O auffüllen, auf pH 7,4 einstellen mit HCl

Lysis Puffer:

50mM Hepes, pH 7,5
 150mM NaCl
 1,5mM MgCl₂
 5mM EGTA
 10% Glycerin
 1% Triton X-100

Direkt vor Anwendung hinzugeben (für 25ml Lysis Puffer):

125µl 2mM Na₃VO₄

½ Tbl. Roch Complete Proteinase-Inhibitor (enthält 10µg/ml Aprotinin; 10µg/ml Leupeptin; 1mM PMSF)

Trenngelpuffer (pH8,8):

1,5mM Tris (45,42g)
 0,4%SDS (1,0g oder 10ml 10%ige Lösung)

Auffüllen mit ddH₂O auf 250ml

Sammelgelpuffer (pH6,8):

0,5M Tris (15,15g)
 0,4%SDS ((1,0g oder 10ml 10%ige Lösung)

Auffüllen mit ddH₂O auf 250ml

Probenpuffer:

10% Glycerin (1g)
 2,3%SDS (2,3g oder 23ml 10%ige Lösung)
 5% Mercaptoethanol

Auffüllen mit ddH₂O auf 100ml

Trenngel 12% für 1 Gel (10ml):

4ml 30%PAA
 2.5ml Trenngelpuffer
 3,5ml ddH₂O
 37,5µl APS (10%)
 10µl TEMED

Überlagern mit Isobutanol, polymerisieren für mindestens 1 Stunde, Isobutanol 4x mit ddH₂O auswaschen

Sammelgel für 2 Gele (6ml):
0,8ml 30% PAA 1,5ml Sammelgelpuffer 3,7ml ddH ₂ O 30µl APS (10%) 20µl TEMED
Kamm einfügen und für 20 min. polymerisieren

2.2. Methoden

2.2.1. Manipulation und Analyse von Versuchstieren

Für die vorliegende Arbeit wurden Mäuse aus der Zucht des MPI für experimentelle Medizin, Göttingen verwendet. Diese Tiere stammen aus der Zucht von CNP-Cre-Mäusen (Lappe-Siefke et al. 2003) mit PTEN-flox-Mäusen (Lesche et al. 2002). Mit dieser Kreuzung wurden konditionelle PTEN-Null-Mutanten in Schwannzellen und Oligodendrozyten generiert. Weiterhin wurden Wildtypmäuse als Kontrollen verwendet. Sowohl Mutanten als auch gleichwertige Kontrollen wurden randomisiert in vier Gruppen aufgeteilt; mit 5mg/kgKG/d Rapamycin behandelte Mutanten (M_R) und Kontrollen (K_R) und mit einem Placebo behandelte Mutanten (M_N) und Kontrollen (K_N). Dazu wurde für die intraperitoneale Injektion eine Rapamycinlösung mit einer Endkonzentration von 0,5mg/ml verwendet. Die Applikation der Behandlung erfolgte täglich von montags bis freitags intraperitoneal im Alter von P13 bis P43 entsprechend dem Injektionsschema (Abb. 5). Im Alter von P43 erfolgte die Gewinnung eines Nervus ischiadicus für die Proteinanalyse und die Ganzkörperfixation für die histologische Analyse. Bei allen Tieren erfolgte eine Genotypisierung mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) aus Schwanzbiopsien. Zur Identifikation der Tiere wurden Ohrlochmarkierungen vorgenommen. Die Tierhaltung erfolgte unter standardisierten Bedingungen im Tierhaus des MPI für experimentelle Medizin, Göttingen, entsprechend den Empfehlungen der deutschen Gesellschaft für Versuchstierkunde.

Abbildung 5: Zeitschema der Rapamycinbehandlung

Vom 13ten (P13) bis zum 43sten (P43) postnatalen Tag wurde täglich (montags bis freitags) intraperitoneal 5mg/kgKG/d Rapamycinlösung injiziert. Im Alter von P43 erfolgten die Analysen.

2.2.1.1. Ganzkörperfixation von Mäusen durch Perfusion

Die Tiere aller Behandlungsgruppen wurden perfusionsfixiert. Nach tiefer Anästhesie durch eine intraperitoneale Injektion von Avertin (1g Tribrommethanol, 0,81ml Amylalkohol, 49ml H₂O) 0,2ml/10g Körpergewicht wurde das Herz des Tieres freipräpariert. Ein Venofix -Venenpunktionsbesteck (Größe 23G) wurde in den linken Ventrikel eingeführt und der rechte Vorhof durch einen Schnitt eröffnet. Über die Kanüle, welche mit der Peristaltikpumpe „Heraeus SR70“ verbunden wurde, erfolgte die Kreislaufperfusion der Maus mit 10-20ml HBSS und anschließend mit 20-30ml Fixans (nach Karlson & Schulz). Anschließend erfolgte eine Immersionsfixierung durch Lagerung des Tieres in Fixans für mindestens 24 Stunden bei 4°C. Danach konnten die zu untersuchenden Gewebe (N. ischiadicus) entnommen werden.

2.2.1.2. Präparation des Nervus ischiadicus von Versuchstieren

Zur Analyse des Peripheren Nervensystems (PNS) wurde der größte periphere Nerv, der Nervus ischiadicus, den Versuchstieren entnommen. Zur Präparation wurde nach Narkotisierung durch intraperitoneale Injektion von Avertin die Haut im Bereich der Hüfte und des dorsalen proximalen Teils der unteren, linken Extremität abpräpariert und die Muskulatur freigelegt. Durch stumpfe Präparation der Muskulatur wurde der Nervus ischiadicus dargestellt und nach Austritt aus den Foramina infrapiriforme sowie auf Höhe der Aufteilung in Nervus tibialis und Nervus peroneus durchtrennt, exzidiert und sofort in ein Eppendorfgefäß in Flüssigstickstoff überführt bis die zeitnahe Lagerung bei -80°C erfolgte. Diese Entnahme des Nervs vor der Ganzkörperfixation diente der Materialgewinnung für die Proteinanalyse.

2.2.1.3. Semi- und Ultradünnschnitte von in Kunstharz eingebetteten Nerven

Die fixierten Ischiasnerven wurden für die Herstellung von Semi- und Ultradünnschnitten in das Kunstharz Epon eingebettet. Nach der Entnahme der Nerven aus den fixierten Mäusen in der Länge von Austritt aus dem Foramen infrapiriforme bis Aufteilung in Nervus tibialis und Nervus peroneus wurden diese in definierter Höhe geteilt. Diese Nervenstücke wurden in gleicher Ausrichtung in vorgefertigte Körbchen des Einbettautomaten „Lynx el“ gelegt und mit Epon infiltriert. Diese Körbchen wurden nach folgendem Schema in den entsprechenden Lösungen geschwenkt.

Lösung	Dauer
Na-Cacodylatpuffer	2x 30 Minuten
1%- OsO ₄ (Osmiumtetroxid)	2 Stunden
Na-Cacodylatpuffer	2x 15 Minuten
30% Ethanol	15 Minuten
50% Ethanol	15 Minuten
70% Ethanol	15 Minuten
80% Ethanol	15 Minuten
90% Ethanol	15 Minuten
100% Ethanol	2x 15 Minuten
Isopropanol	15 Minuten
Propylenoxid	2x 15 Minuten
Propylenoxid:Epon-2:1-Mischung	2 Stunden
Propylenoxid:Epon-1:1-Mischung	2 Stunden
Propylenoxid:Epon-1:2-Mischung	4 Stunden
Epon	4 Stunden

Nach der Infiltration erfolgte die Einbettung in Epon. Dazu wurden die Nerventeile in Ausgießformen mit reinem Epon gegeben, welches durch Erhitzen auf 60°C für 24 Stunden polymerisierte. Es entstanden feste Epon-Kunstharzblöcke, welche in Vorbereitung auf den Schneidevorgang mit einer Fräse „EM TRIM, Leica“ an der zu un-

tersuchenden Seite zu einer stumpfen Pyramidenform bearbeitet wurden. Von diesen so vorbereiteten Blöcken wurden am Ultramicrotom „Ultracut S“, Leica, mit einem Diamantmesser „Ultrathin Diamond Knife 45°“ 0,5µm starke Semidünnschnitte und 50nm starke Ultradünnschnitte angefertigt. Ca. 20 Semidünnschnitte wurden auf einen Objektträger, jeweils ein Ultradünnschnitt auf einen mit 1,25%igem Formvar bedfilmten Grid aufgebracht.

2.2.1.4. Methylenblaufärbung von Semidünnschnitten

Die bei 60°C getrockneten Semidünnschnitte (Heizplatte HI1120, Leica) wurden mit einer Methylen-Azur-II-Färbung gefärbt. Dazu wurden Methylenblau und eine Azur-II-Lösung im Verhältnis 1:1 gemischt und mittels einer Spritze 1ml/Objektträger über eine Kanüle mit vorgeschaltetem Filter „Millex“ aufgebracht und nach 1 Minute bei 60°C mit zweifach destilliertem Wasser abgewaschen. Die gefärbten Schnitte wurden bei 60°C getrocknet und dann mit Eukit-Kleber und Deckgläschen eingedeckt.

2.2.1.5. Kontrastierung von Ultradünnschnitten

Die auf die Grids aufgebrachten Ultradünnschnitte wurden nach Trocknung bei Raumtemperatur mit 4%igem Uranylacetat und Bleicitrat kontrastiert. Dazu wurden die Schnitte als erstes für 25-30 Minuten in 4%igem Uranylacetat abgedunkelt inkubiert und danach nach dreimaligen Waschen in zweifach destilliertem Wasser für 12 bis maximal 15 Minuten in Bleicitrat inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden die Ultradünnschnitte bei Raumtemperatur an der Luft getrocknet.

2.2.1.6. Histologische Analyse von Ischiasnerven

Um histologische Untersuchungen an den Ischiasnerven vornehmen zu können, wurden von den Semidünnschnitten lichtmikroskopische und von den Ultradünnschnitten elektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt. Die lichtmikroskopischen Aufnahmen wurden mit dem Mikroskop „Leica DM RXA2“, einer Videomikroskopie-Kamera „C14 Resolution Colour Camera“ und dem Programm Openlab 2.0 gefertigt. Es wurde in 100facher Vergrößerung der gesamte Querschnitt des Nervus ischiadicus in Einzelbildern abfotografiert und mit dem Programm Photoshop 6.0 wieder zusammengesetzt. Die weitere Bearbeitung erfolgte geblindet mit dem Programm Image J. Zunächst wurde die Gesamtzahl aller myelinisierten Axone pro Querschnitt gezählt. Weiterhin wurde der Umfang des Nervenquerschnitts zur Bestimmung der Axondichte gemessen. Um die Myelinabnormalitäten erfassen zu können, wurden

vier Typen solcher Abnormalitäten bestimmt und pro Nerv ausgezählt. Als weiteres histologisches Kriterium wurde die Dicke des Myelins um das Axon bestimmt. Dazu wurde über den Umfang der Durchmesser des Axons und der Durchmesser der gesamten Faser (Axon + Myelin) von 100 zufällig ausgewählten Axonen pro Nerv gemessen und der Quotient aus beiden gebildet. Diesen Quotienten bezeichnet man als g-ratio (Abb. 3). Ein kleines g-ratio bedeutet dickes Myelin, ein großes g-ratio dünnes Myelin. Ist kein Myelin vorhanden, würde der g-ratio-Wert 1,0 ergeben. Das g-ratio ist als Quotient zweier Längeneinheiten dimensionslos.

Für die Analyse kleiner Axone ($<2,5\mu\text{m}$) und Strukturen wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen von den Ultradünnschnitten angefertigt. Dazu wurden das Transmissions-Elektronenmikroskop „EM900PC“, Zeiss, und schwarz-weiß Negativfilme „Maco-EM-Films EMS“ verwendet. Zur histologischen Auswertung wurden einzelne Axongruppen und/oder Remakbündel repräsentativ aus dem gesamten Nervenquerschnitt in 7000facher Vergrößerung aufgenommen; einzelne Motive auch in höherer Vergrößerung. Die Negative wurden in der Dunkelkammer mit dem Entwickler „RHL Document Type Developer“ und dem „Fixierer Roentogen Superfix“ entwickelt und getrocknet. Die entwickelten Filme wurden mit dem EPSON-Filmscanner „F3200“ im Hell-Dunkel-Kontrast bearbeitet und gescannt. Es wurden die g-ratios der kleinen myelinisierten Axone bestimmt sowie die Messung der Größe der Remakaxone und der Abstände zwischen den Remakaxonen eines angenommenen Remakbündels nach dem Prinzip des nächsten Nachbarn vorgenommen.

2.2.2. Proteinanalyse mittels Western Blot

Um den Einfluss von Rapamycin auf den PI3K/AKT/mTOR-Signalweg darstellen zu können, wurden spezifische Proteine mittels Western Blot nachgewiesen. Das Prinzip des Western Blots beruht auf der elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen nach ihrer Molekülgröße. Diese aufgetrennten Proteingemische werden von einer Polyacrylamidmatrix aus über ein senkrecht zu diesem Gel angelegten elektrischen Feld auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und damit immobilisiert. Danach ist es möglich, Proteine durch spezifische Antikörper, den Primärantikörpern, und diese wiederum durch passende Sekundärantikörper nachzuweisen. Die Sichtbarmachung erfolgt mittels einer Chemilumineszenzreaktion, welche die Proteine als Banden auf einer bestimmten Membranhöhe auf einem Film darstellt.

2.2.2.1. Homogenisieren des Nervus ischiadicus

Um verschiedene Proteine ihrer Größe nach auftrennen und spezifische Proteine nachweisen zu können, müssen zuvor die nativen Nerven homogenisiert werden. Da die Masse an Gewebe eines einzelnen Nervs im Alter von P43 gering ist, wurden jeweils zwei Nerven derselben Behandlungsgruppe für die Herstellung eines Homogenisats verwendet. Zum Homogenisieren wurde ein Lysispuffer hergestellt und davon jeweils 400µl in ein Zentrifugenröhrchen pipetiert. Danach wurden die zwei Nervi ischiadici dazugegeben und mit den Ultraturax „Polytron 1200E“ homogenisiert. Das Lysat wurde in ein Eppendorfgefäß überführt und bei 4°C bei 11000 RPM für 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt; das verbleibende Pellet (die Kernfraktion) wurde belassen. Beides wurde bei -80°C aufbewahrt.

2.2.2.2. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die durch das Homogenisieren gewonnenen Lysate weisen eventuell verschiedene Proteinkonzentrationen auf. Für eine optimale Vergleichbarkeit der Proteinbanden beim Western-Blot-Verfahren ist es notwendig, für alle Proben die gleiche Proteinkonzentration zu verwenden. Dazu wurde zuerst eine Verdünnungsstandardreihe erstellt. Die Proteinkonzentrationsbestimmung (nach Bradford) erfolgte mit „DC Protein Assay“, Bio-Rad, in einer 96 well Mikrotiterplatte, die sowohl mit den Standards als auch mit den Proben mit den jeweiligen Reagenzien versehen wurde. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten bei Raumtemperatur wurde bei einer Wellenlänge von 650nm die Proteinkonzentration bestimmt. Auf der Grundlage dieser Konzentrationen erfolgte die Beladung der Gele mit den Proteinlysaten in einem für alle Proben gleichem Mengenverhältnis.

2.2.2.3. Herstellung der SDS-PAGE-Gele

Die Zusammensetzung des Gels richtet sich nach der Molekülgröße der zu untersuchenden Proteine. Da die zu untersuchenden Proteine im Bereich von 30kDa bis 60kDa liegen, wurden 12%ige SDS-PAGE-Gele verwendet. Ein Gel setzt sich aus einem Trenngel, in dem die eigentliche Auftrennung der Proteine stattfindet, und einem Sammelgel für die Beladung des Gels und der Gleichrichtung der Proben vor der Auftrennung, zusammen. Das Trenngel wurde in einem Gelhalteapparat zwischen zwei Glasplatten gegossen und mit Isobutanol überlagert. Nach einer Stunde Polymerisation und anschließendem Auswaschen des Isobutanols wurde das Sam-

melgel darauf gegossen in dem nach Einbringen eines 10-Taschen-Kamms und 20minütiger Polymerisation die Taschen zum Einfüllen der Proteinproben geformt wurden. Die Gele wurden vor der Verwendung eine Nacht bei 4°C gelagert.

2.2.2.4. Elektrophoretische Auftrennung, Blotten und Detektieren von Proteinen

Die elektrophoretische Auftrennung der Proteinproben erfolgte im Bio-Rad-System. Die Gele wurden mit den verschiedenen Proben in gleichen Proteinmengen und Probenpuffer in die Taschen geladen. Eine Leerkontrolle mit ddH₂O und Probenpuffer und ein Marker zur Identifizierung der Banden wurden zusätzlich eingebracht. Bei den verschiedenen Blots ergaben sich Proteinkonzentrationen von 9µg/50µl bis 10,71µg/50µl. Die Proben wurden vor dem Beladen der Gele 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Bio-Rad-Kammersystem wurde, nach Einbringen der Gele, mit Laufpuffer gefüllt. Mit dem „Power Pac HC“ wurde eine Spannung von 70V für ca. ½ Stunde (bis die Proben in das Trenngel eingetreten waren) und dann 100V für ca. 2 Stunden angelegt.

Mit dem Prinzip des Semi-Dry-Transfers wurde das Gel auf eine für 2 Minuten in Methanol aktivierte Nitrocellulosemembran geblottet. Dafür wurde das Gel der Membran aufgelegt und zwischen Filterpapieren und Schwämmen, die zuvor in Blottingpuffer getränkt wurden, in eine Kassette eingespannt. Diese wurde mit noch zusätzlich einem Kühlakku und Blottingpuffer in die Blotkammer von Bio-Rad gegeben. Die Transferzeit betrug ca. 1 Stunde bei konstanten 350mA und 4°C. Nach diesem Blotvorgang wurden die unspezifischen Bindungsstellen auf der Membran für 1 Stunde mit Blockingpuffer geblockt. Das darin enthaltene Milchprotein wird von den später aufgebrauchten Antikörpern nicht erkannt. Die Blockierung bildet somit die Möglichkeit des spezifischen Proteinnachweises.

Um den Einfluss von Rapamycin auf den PI3K/AKT/mTOR-Signaltransduktionsweg auf Proteinebene darstellen zu können, wurden Akt und P-Akt sowie S6 und Phospho-S6 als Proteine untersucht. Dazu erfolgte eine Inkubation der gewonnenen Membran mit einem in Blockingpuffer verdünnten spezifischen Primärantikörper bei 4°C für mindestens eine Nacht. Dieser Primärantikörper ist gegen das zu untersuchende Protein gerichtet und reagiert mit der Proteinoberfläche auf der Membran. Nach mehreren Waschschritten in TBS-T (2x 5min; 2x 10min) folgte eine weitere einstündige Inkubation bei Raumtemperatur mit einem in Blockingpuffer verdünnten Sekundärantikörper, der mit dem Fc-Fragment des primären Antikörpers reagiert und an dem das Enzym HRP (Horse-Raddish-Peroxidase) gekoppelt ist. Die Verdünnungen

der Antikörper richteten sich nach den jeweiligen Empfehlungen der Hersteller. Im Anschluss erfolgte nach mehreren Waschschritten in TBS-T (2x 5min; 2x 10min) die Detektion der Proteinbanden durch eine Chemilumineszenzreaktion mittels „ECL-Kit“, Perkin Elmer LifeSciences, Boston. Dieser Vorgang beruht auf dem Prinzip der Lichtemission, welche durch die Reaktion des Enzyms HRP mit den Reagenzien des ECL-Kits hervorgerufen wird. Dabei katalysiert das Enzym die Umsetzung von Luminol oder dessen Derivaten in die oxidierte Form mit stattfindender Lumineszenz. Dazu wurde 1ml eines Gemischs der beiden ECL-Kit Reagenzien im Verhältnis 1:1 auf die Membran aufgebracht und 1min bei Raumtemperatur abgedunkelt inkubiert. Die endgültige Detektion erfolgte in einer Dunkelkammer durch Auflegen eines unbelichteten Films für eine bestimmte Zeit auf die Membran und anschließender Entwicklung des Films im „Kodak X-omat 1000“. Diese Filme wurden mittels „EPSON F3200“ gescannt und mit dem Programm Image J quantifiziert.

2.2.3. Statistische Methoden

Die in den Analysen erhobenen Daten wurden mit Excel 2000 und Excel 2007 weiterbearbeitet. Die Diagramme und die statistische Auswertung wurden mit GraphPad Prism 5 und Excel 2007 angefertigt. Die Ergebnisse wurden mit dem Student's t-test für unverbundene Stichproben auf Signifikanz geprüft. Abweichungen zwischen den getesteten Gruppen mit einem $p < 0,05$ wurden jeweils als signifikant gewertet.

3. Ergebnisse

3.1. Behandlung Schwannzell-spezifischer PTEN-Mausmutanten mit Rapamycin

Die Myelinisierung von Axonen durch Schwannzellen ermöglicht dem Organismus eine präzise Anpassung der Erregungsweiterleitung. Welche intrazellulären Signaltransduktionswege für die Bildung der Myelinscheide verantwortlich sind, ist Gegenstand von Untersuchungen. In peripheren Neuropathien kommt es zu einer Störung der axonalen Myelinisierung, wobei einige von ihnen Myelinveränderungen in Form von Tomakula und Myelinausfaltungen aufweisen (Nave et al. 2007). Ähnliche Veränderungen des Myelins traten ebenfalls bei konditionellen PTEN-Mausmutanten auf (Goebbels 2008). Der Verlust des PTEN-Gens in Schwannzellen führte weiterhin zu einer erhöhten Anzahl myelinisierter Axone, zur Ausbildung einer dickeren Myelinscheide in kleinkalibrigen Axonen sowie zu Veränderungen in den Remakbündeln. mTOR agiert als Bestandteil des PI3K/AKT-Signalweges in einer nachfolgenden Position zu PTEN (Abb. 4). Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob Rapamycin als spezifischer mTOR-Inhibitor die durch PTEN-Verlust hervorgerufenen Veränderungen der Myelinisierung beeinflussen kann. Dazu wurde die gleiche Mauslinie aus einer Kreuzung von CNP-Cre-Mäusen (Lappe-Siefke et al. 2003) mit PTEN-flox-Mäusen (Lesche et al. 2002) verwendet.

3.1.1. Effekte von Rapamycin auf den PI3K/AKT-Signalweg

Um den Einfluss von Rapamycin auf den PI3K/AKT-Signalweg darstellen zu können, wurden aktivierte, das heißt phosphorylierte Proteine mittels Western Blot nachgewiesen. Durch Anregung des PI3K/AKT-Signalweges durch PTEN-Verlust kommt es zur vermehrten Bildung von P-AKT (Stiles et al. 2004). mTOR als spezifisches Ziel von Rapamycin befindet sich in nachfolgender Position zu AKT (Hay und Sonnenberg 2004). S6 wird nach Stimulation der S6K durch mTOR zu P-S6 umgewandelt. P-S6 dient zum Nachweis der Aktivität von mTOR und ist im gesteigerten Signalweg ebenfalls erhöht (Neshat et al. 2001).

Die Ergebnisse der Western Blots zeigen, dass Rapamycin spezifisch mTOR inhibiert, da eine Steigerung von P-S6 in den unbehandelten PTEN-Mausmutanten (M_N) mit Rapamycin (M_R) verhindert werden konnte (Abb. 6 und 7). S6 hingegen war in allen vier Gruppen ähnlich nachweisbar. Die vermehrte Bildung von P-AKT

war in beiden Gruppen der PTEN-Mutanten (M_N und M_R) von Rapamycin unbeeinflusst, im Vergleich zu den Kontrollgruppen (K_N und K_R) jedoch deutlich erhöht. Diese Ergebnisse bestätigen die Aktivitätssteigerung von AKT im aberranten PI3K/AKT-Signalweg und eine Aktivität von mTOR nachfolgend zu PTEN.

Abbildung 6: Western Blots von P-S6, S6, P-AKT und AKT

Abbildung 7: Expression von P-AKT, S6 und P-S6

Die Expression von P-AKT, S6 und P-S6 ist jeweils im Verhältnis zu den unbehandelten Kontrollen (K_N) dargestellt. Dazu wurden die Expressionen von K_N gleich 1 gesetzt.

A: P-Akt ist sowohl in den nicht mit Rapamycin behandelten PTEN-Mausmutanten (M_N) als auch in den mit Rapamycin behandelten PTEN-Mausmutanten (M_R) im Vergleich zu be- und unbehandelten Kontrollgruppen (K_R und K_N) deutlich erhöht. Ein Effekt von Rapamycin ist nicht nachweisbar.

B: S6 ist in allen vier Gruppen in ähnlicher Konzentration nachweisbar.

C: P-S6 ist in den unbehandelten Mutanten (M_N) im Vergleich mit den Kontrollen deutlich erhöht. Die Behandlung der Mutanten mit Rapamycin (M_R) führte zu einer Abnahme der Expression von P-S6. Rapamycin zeigt keinen Effekt bei den behandelten Kontrollen (K_R).

3.1.2. Effekte von Rapamycin auf myelinisierende Schwannzellen

3.1.2.1. Anzahl und Dichte myelinisierter Axone

Der Einfluss von Rapamycin auf die Axonanzahl wurde untersucht. Dazu wurde die Gesamtzahl aller myelinisierten Axone pro Nervus ischiadicus bestimmt (Abb. 8). Die Anzahl variierte zwischen ca. 3000 bis ca. 5000 Axonen. In den PTEN-Mausmutanten (M_N, n=6) fanden sich signifikant mehr myelinisierte Axone im Vergleich zu den Kontrollen (K_N, n=8, $p=0,011$). Somit werden die vorherigen Beobachtungen, dass ein gesteigerter PI3K/AKT-Signalweg in Schwannzellen zu einer vermehrten Aussortierung von normalerweise nicht myelinisierten Axonen führt (Goebbels 2008), unterstützt. Auch in den mit Rapamycin behandelten Mausmutanten (M_R, n=8) wurden signifikant mehr myelinisierte Axone als in den Kontrollen (K_R) gezählt ($p=0,0058$). Weder in den Kontrollen (K_R, n=7) noch in den Mutanten (M_R, n=8) konnte ein signifikanter Effekt von Rapamycin festgestellt werden.

Abbildung 8: Anzahl myelinisierter Axone

Die Anzahl myelinisierter Axone im Ischiasnerv variierte zwischen 3000 und 5000. In den PTEN-Mausmutanten waren signifikant mehr myelinisierte Axone vorhanden. Ein Effekt der Rapamycinbehandlung konnte nicht festgestellt werden.

Die Dichte der myelinisierten Axone pro Nerv hingegen war mit Rapamycin in den PTEN-Mutanten beeinflussbar (Abb.9). Zur Untersuchung der Axondichte wurde die Anzahl der myelinisierten Axone der jeweiligen Querschnittsfläche des Nerven gegenübergestellt. Aufgrund einer Zunahme des Nervenquerschnitts in den PTEN-Mausmutanten (M_N; n=6) durch eventuelle Zunahme der Schwannzellgröße und des Interzellularraumes konnte trotz erhöhter Anzahl myelinisierter Axone eine signifikante Reduktion der Axondichte im Vergleich zur Kontrollgruppe (K_N; n=8) festgestellt werden ($p < 0,0001$). Ein ähnlicher Effekt zeigte sich im Vergleich zwischen den Gruppen mit Rapamycinbehandlung (K_R; n=7; M_R; n=8; $p = 0,0003$). Während innerhalb der Kontrollgruppen kein Effekt von Rapamycin auf die Axondichte nachzuweisen war, zeigte sich in den behandelten (M_R) im Vergleich zu den unbehandelten (M_N) PTEN-Mausmutanten eine signifikante Zunahme der Axondichte ($p = 0,0003$). Rapamycin verhindert die dichterereduzierende Wirkung der PTEN-Mutation, was durch eine Reduktion der Schwannzellgröße bedingt sein könnte.

Abbildung 9: Dichte myelinisierter Axone

Die Dichte der myelinisierten Axone pro Ischiasnerv wurde bestimmt. Eine deutliche Reduktion der Dichte zeigt sich in unbehandelten (M_N) und behandelten (M_R) Mutanten. Dieser Effekt ist in der Gruppe der mit Rapamycin behandelten Mutanten signifikant geringer. Rapamycin beeinflusst die Axondichte in den Kontrollgruppen nicht.

3.1.2.2. Einfluss auf Myelinmissbildungen

Im Ischiasnerv der PTEN-Mausmutanten wurden im Vergleich zu Wildtypmäusen vermehrt Veränderungen der Myelinscheidenausbildung festgestellt (Abb.: 10). Der Einfluss auf diese Veränderungen nach einer Behandlung mit dem mTOR-Inhibitor Rapamycin wurde untersucht.

Lichtmikroskopisch lies sich klar eine Vermehrung der Myelinmissbildungen in PTEN-Mutanten im Vergleich zu Wildtypmäusen ausmachen, während ein Effekt der Rapamycinbehandlung sowohl auf die Mutanten als auch auf die Kontrollen nicht sofort offensichtlich zur Darstellung kam.

Vier verschiedene, veränderte Formen der Myelinisierung, benannt nach ihren Erscheinungsformen, wurden pro Nervenquerschnitt gezählt. Dies waren Tomakula, kommaförmige Ausfaltungen, Einfaltungen und rückwärts gerichtete Schleifen (Abb. 11).

a) Kontrolle

b) Mutante

c) Kontrolle + Rapamycin

d) Mutante + Rapamycin

Abbildung 10: Querschnitt des Nervus ischiadicus in lichtmikroskopischer Übersicht

- a) Ein Querschnitt mit regelrechter Myelinisierung ist dargestellt.
- b) In PTEN-Mutanten treten verstärkt Myelinmissbildungen (Pfeilspitzen) auf.
- c) und d) Ähnliches stellt sich bei mit Rapamycin behandelten Tieren dar.

Abbildung 11: Einzelne Formen abnormer Myelinausbildungen A: licht- und B: elektronenmikroskopisch

Tomakula sind stellenweise auftretende Verdickungen der Myelinscheide, die im Querschnitt als fokale Hypermyelinisierungen zu sehen sind. Meist ist das Axon verdrängt und komprimiert. Die kommaförmigen Ausfaltungen sind radiale Ausstülpungen der Myelinscheide mit im Querschnitt länglich-gebogener, kommaähnlicher, Form. Bei den rückwärtsgerichteten Schleifen handelt es sich um längliche Ausfaltungen der Myelinscheide, die parallel zur Nervenfaser verlaufen und so im Querschnitt als zusätzliche Myelinringe neben dem myelinisierten Ursprungsaxon zu erkennen sind. Ähnlich verhält es sich mit den Einfaltungen. Hier sind die länglichen Myelinausstülpungen auch parallel, jedoch auf der Innenseite der Myelinmembran zu finden. Im Querschnitt imponiert ein zusätzlicher Myelinring innerhalb des Axons. Das Axon ist bei den kommaförmigen Ausfaltungen, den Einfaltungen und den rückwärtsgerichteten Schleifen nicht mit in die Ausfaltung involviert.

Die Anzahl der vier Formen pro Nervenquerschnitt wurden einzeln bestimmt und die Gesamtanzahl je Nerv errechnet. Aus der Gesamtzahl aller Myelinmissbildungen pro Nerv wurde der prozentuale Anteil der abnormen Myelinscheiden an der Gesamtzahl der myelinisierten Axone berechnet (Abb. 12). Die Auswertung ergab einen hoch signifikanten Unterschied zwischen den unbehandelten Kontrollen (K_N, n=8) mit durchschnittlich 0,7% und den unbehandelten Mutanten (M_N, n=6) mit 10% Myelinmissbildungen bezogen auf die Gesamtzahl der myelinisierten Axone ($< 0,0001$). Mit der Rapamycinbehandlung lies sich bei den PTEN-Mutanten (M_R, n=8) eine

deutliche Verhinderung dieser Myelinabnormalitäten erzielen. Der Anteil betrug lediglich 3,3% ($p < 0,0001$). Das vermehrte Auftreten von abnormer Myelinisierung bleibt aber auch nach Rapamycingabe signifikant erhöht (K_R vs. M_R, $p = 0,003$). Eine Beteiligung des mTOR-Signalweges bei der Ausbildung von fehlerhaften Myelinscheiden ist anzunehmen. Eine vollständige Verhinderung durch spezifische mTOR-Inhibition ist aber nicht erreichbar. Die Kontrollen mit und ohne Rapamycinbehandlung (K_R vs. K_N) zeigten bei diesen Untersuchungen keinen Unterschied. Eine vermehrte Sensitivität eines aberranten PI3K/AKT-Signalweges auf Rapamycin (Neshat et al. 2001; Hidalgo und Rowinsky 2000) kann damit gezeigt werden.

Abbildung 12: Einfluss von Rapamycin auf abnorme Myelinausbildungen, bezogen auf die Gesamtzahl der myelinisierten Axone

Der prozentuale Anteil aller abnormer Myelinausbildungen an der Gesamtzahl der myelinisierten Axone pro Nervquerschnitt ist dargestellt. Eine deutliche Zunahme in den PTEN-Mutanten ist zu sehen. Dieser Effekt ist mit Rapamycingabe in den Mutanten signifikant weniger, bleibt aber deutlich erhöht.

Werden die Myelinveränderungen pro Typ einzeln betrachtet, zeigt sich der größte Effekt bei den Tomakula (Abb. 13). In den Kontrollen mit (K_R, n=6) und ohne (K_N, n=8) Rapamycinbehandlung wurden zwischen 0 und 14 Tomakula pro Nervquerschnitt gefunden. In Mäusen mit PTEN-Mutation (M_N, n=6) stieg die Anzahl der Tomakula bis auf 209 an (K_N vs. M_N, $p < 0,0001$). Bei mit Rapamycin behandelten

PTEN-Mutanten (M_R, n=8) reduzierte sich die Anzahl der Tomakula pro Nervquerschnitt deutlich auf durchschnittlich 51 (M_N vs. M_R, $p < 0,0001$). Ähnliches stellte sich bei der Betrachtung der rückwärts gerichteten Schleifen dar. Hier erfolgte eine Reduktion bei Behandlung mit Rapamycin in den PTEN-Mutanten von durchschnittlich 72 (M_N, n=6) auf 18 (M_R, n=8, $p < 0,0001$). Die kommaförmigen Myelinausfaltungen reduzierten sich signifikant in den Mutanten nach Behandlung mit Rapamycin von durchschnittlich 117 (M_N, n=6) auf 60 (M_R, n=8). Der Effekt war aber weniger ausgeprägt als bei den Tomakula und den rückwärts gerichteten Schleifen ($p = 0,0051$). Im Gegensatz zu den Tomakula, den kommaförmigen Myelinausfaltungen und den rückwärts gerichteten Schleifen, die jeweils hoch signifikant weniger in den behandelten und unbehandelten Kontrollen im Vergleich zu den PTEN-Mutanten zu finden waren, war der Unterschied bei den Einfaltungen zwischen Kontrollen und Mutanten nicht so deutlich ausgeprägt. Dennoch zeigte sich eine signifikante Zunahme dieser abnormen Myelinisierung in den PTEN-Mutanten (K_N vs. M_N, $p = 0,048$). Der Effekt der Rapamycinbehandlung in den Mutanten (M_N vs. M_R) war aber nicht signifikant ($p = 0,26$) (Abb. 13).

Abbildung 13: Einfluss von Rapamycin auf Myelinmissbildungen

Abbildung 13: (fortgesetzt)

Der Einfluss von Rapamycin auf die verschiedenen Myelinmissbildungen ist dargestellt.

A und B: Die Anzahl der Tomakula und der rückwärts gerichteten Schleifen nahm in den PTEN-Mutanten (M_N) deutlich zu. Mit Rapamycinbehandlung (M_R) waren es signifikant weniger.

C: Auch die Anzahl der kommaförmigen Ausfaltungen stieg in den PTEN-Mutanten (M_N) deutlich an. Der Effekt durch Rapamycin (M_R) war aber weniger stark ausgeprägt als bei A und B.

D: Einfaltungen nahmen in PTEN-Mutanten (M_N) im Vergleich zu den Kontrollgruppen (K_N und K_R) nicht so deutlich wie in A, B und C, aber signifikant zu. Eine signifikante Reduktion dieser Myelinisierungsform konnte in mit Rapamycin behandelten Mutanten (M_R) nicht nachgewiesen werden.

3.1.2.3. Einfluss auf das g-ratio myelinisierter Axone

Der Einfluss von Rapamycin wurde auf ein weiteres histologisches Kriterium, die Dicke der Myelinscheide, hin untersucht. Dazu wurden der Umfang des Axons und der Umfang des Axons mit Myelinscheide von zufällig ausgewählten Axonen gemessen und der Quotient daraus gebildet (Abb. 14). Dieser Quotient wird „g-ratio“ genannt. Ist kein Myelin vorhanden, ergibt das g-ratio den Wert 1,0. Dickeres Myelin bedeutet ein kleineres g-ratio und umgekehrt. Bei den lichtmikroskopischen Messungen ergaben sich weder durch den PTEN-Verlust noch durch Rapamycingabe signifikante Unterschiede der g-ratios zwischen den einzelnen Gruppen. Ein Effekt deutete sich lediglich in kleinen Axonen an (Daten nicht dargestellt). Bei der Betrachtung aller gemessener g-ratios pro Nervus ischiadicus fiel aber eine unterschiedliche Verteilung zwischen beiden Kontrollgruppen (K_N, n=8 und K_R, n=6) und Mutantengruppen (M_N, n=6 und M_R, n=8) auf (Abb. 15). Während bei den Kontrollgruppen eine größere Spannbreite in der Verteilung zu erkennen war, befanden sich die g-ratio-Werte der Mutantengruppen in einem engeren Bereich. Je nach funktioneller Aktivität des Axons kann die Dicke der Myelinscheide beeinflusst und somit optimal für eine Millisekunden genaue, präzise Leitgeschwindigkeit gebildet werden (Zalc und Fields 2000; Waxman 1997). Eine höhere Spannbreite könnte eine höhere Diversifikation der Myelindicke bedeuten. Die PTEN-Mausmutanten scheinen diese Diversifikationsfähigkeit verloren zu haben. Ein Einfluss der Behandlung mit Rapamycin ist nicht zu erkennen.

**g-ratio-Messung
bei lichtmikroskopischer Darstellung**

**g-ratio-Messung
bei elektronenmikroskopischer Darstellung**

Abbildung 14: g-ratio Messung bei lichtmikroskopischer und elektronenmikroskopischer Darstellung

Die Dicke der Myelinscheide wurde als g-ratio gemessen. Dazu wurde der Quotient aus dem Umfang des Axons und dem Umfang des Axons mit Myelinscheide von zufällig ausgewählten Axonen gebildet. Die Messung der kleinen myelinisierten Axone (<2,5μm) wurde an elektronenmikroskopischen Aufnahmen vorgenommen.

A:

B:

Abbildung 15: Verteilung aller gemessenen g-ratios

Die Verteilung aller lichtmikroskopisch gemessenen g-ratios ist dargestellt.

A: In beiden Kontrollgruppen (K_N und K_R) ist eine große Spannbreite in der Verteilung der g-ratios zu erkennen.

B: Die g-ratios der PTEN-Mausmutanten (M_N und M_R) liegen in einem engeren Bereich.

Es wurden die kleinen myelinisierten Axone ($<2,5 \mu\text{m}$) hinsichtlich der Myelinscheidendicke genauer betrachtet (Abb. 16). Dazu wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt und das g-ratio bestimmt.

Im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen (K_N, $n=3$) zeigten die unbehandelten Mutanten (M_N, $n=4$) eine signifikant dickere Myelinscheide ($p<0,0003$). Eine Hypermyelinisierung in PTEN-Mutanten war bei diesen kleinkalibrigen Axonen zu sehen. Ein ähnlicher Effekt war auch zwischen den mit Rapamycin behandelten Kontrollen (K_R, $n=3$) und Mutanten (M_R, $n=4$) zu erkennen ($p=0,004$). Ein Anstieg des g-ratios in PTEN-Mutanten nach Behandlung mit Rapamycin (M_R, $n=4$) im Vergleich zu unbehandelten Mutanten (M_N, $n=4$) deutete sich an, konnte jedoch nicht signifikant nachgewiesen werden ($p=0,41$). Dass sich kein Effekt innerhalb der Kontrollgruppen auf die g-ratios von kleinen Axonen zeigte (K_N vs. K_R, $p=0,5238$), bestätigt das geringe Ansprechen eines ungestörten PI3K/AKT-Signalweges auf Rapamycin (Neshat et al. 2001; Hidalgo und Rowinsky 2000).

Abbildung 16: Effekt von Rapamycin auf das g-ratio in kleinen myelinisierten Axonen

Abbildung 16: (fortgesetzt)

Der größte Effekt der Rapamycinbehandlung auf das g-ratio wurde in kleinen Axonen erwartet. Die g-ratios der kleinen ($< 2,5\mu\text{m}$) Axone sind dargestellt.

A: Ohne Rapamycinbehandlung unterscheiden sich die g-ratios in Kontrollen (K_N) und PTEN-Mausmutanten (M_N) signifikant.

B: Auch mit Rapamycinbehandlung stellte sich ein ähnlicher Unterschied in den g-ratios zwischen Kontrollen (K_R) und PTEN-Mausmutanten (M_R) dar.

C und D: Ein signifikanter Effekt von Rapamycin konnte sowohl in den Kontrollgruppen als auch in den Gruppen der PTEN-Mausmutanten nicht nachgewiesen werden.

3.1.3. Effekte von Rapamycin auf nicht myelinisierende Schwannzellen

Nicht myelinisierende Schwannzellen fassen mehrere Axone zu Remakbündeln zusammen. Dabei werden die einzelnen Axone mittels einfacher Umhüllung durch Schwannzellmembranausfaltungen voneinander separiert. So bildet eine nicht myelinisierende Schwannzelle ein geordnetes Bündel von eng aneinander liegenden Axonen, ein Remakbündel (Nave und Salzer 2006; Chen et al. 2003). In den Untersu-

chungen von konditionellen PTEN-Mausmutanten fiel eine lockere Anordnung der Remakbündel auf. Die Axone lagen weiter voneinander entfernt und waren teilweise von mehreren Lamellen unkompakten Myelins umgeben (Goebbels 2008). Letzterer Effekt zeigte sich vor allem in den älteren Mutanten (P120). In dieser Arbeit wurde untersucht, ob eine Behandlung mit Rapamycin einen Effekt zu oben beschriebenen Veränderungen in den Remakbündeln hervorrufen kann.

3.1.3.1. Einfluss auf die Dichte und Ordnung nicht myelinisierter Axone im Remakbündel

Ähnlich zu den Vorergebnissen waren die Remakbündel in den PTEN-Mausmutanten (M_N) deutlich ungeordneter als in den Kontrollen (K_N). Die einzelnen Remakaxone lagen weiter auseinander. Nach Rapamycinbehandlung der PTEN-Mausmutanten (M_R) schienen die Remakbündel bei elektronenmikroskopischer Betrachtung wieder geordneter zu sein und enger aneinander zu liegen (Abb. 17 A-C). Es konnte aber diesbezüglich keine statistische Signifikanz beim Vergleich der Abstände zwischen den einzelnen Remakaxonen der Gruppen M_N und M_R nachgewiesen werden (Abb. 17 D). Die Dichten von nicht myelinisierten und auch, wie oben erwähnt, myelinisierten Axonen sind möglicherweise in PTEN-Mutanten geringer als in den Kontrollen, was für eine Größenzunahme von myelinisierenden und nicht myelinisierenden Schwannzellen spräche. Der mTOR-Signalweg könnte dabei involviert sein, da sich ein Effekt nach spezifischer mTOR-Inhibition andeutet.

A: Remakbündel K_N

B: Remakbündel M_N

C: Remakbündel M_R

Abbildung 17: Anordnung der Remakbündel

D: statistische Darstellung der Remakaxonabstände

Abbildung 17: (fortgesetzt)

Die Ordnung der Remakbündel wurde untersucht. Eine nicht myelinisierende Schwannzelle umfasst mehrere kleine Axone.

A: In den Kontrollen liegen die Remakaxone der nicht myelinisierenden Schwannzelle dicht geordnet an.

B: Bei den PTEN-Mutanten ist diese Ordnung aufgehoben.

C: Die Remakbündel der mit Rapamycin behandelten PTEN-Mutanten zeigen eine Tendenz zur Ordnung ähnlich den Wildtypen.

D: Die Abstände zwischen den Remakaxonen wurden gemessen. Statistisch konnte kein signifikanter Einfluss auf die Abstände nach Rapamycinbehandlung nachgewiesen werden.

3.1.3.2. Einfluss auf die Größe der Remakaxone

Bevor ein Axon von einer myelinisierenden Schwannzelle myelinisiert wird, erfolgt die Aussortierung des Axons aus dem Remakbündel (Jessen und Mirsky 2005). Diese Myelinisierung erfolgt nur bei einer bestimmten Größe des Axons von normalerweise $>1\mu\text{m}$ (Nave und Salzer 2006). Die Größe der Remakaxone wurde in dieser Arbeit auf Unterschiede zwischen Kontrollen und PTEN-Mutanten und auf Effekte der Rapamycinbehandlung untersucht. Die meisten Remakaxone hatten einen Durchmesser bis $0,4\mu\text{m}$. Es konnte kein Unterschied zwischen den Gruppen und kein Effekt der Rapamycinbehandlung hinsichtlich der Größe der Remakaxone festgestellt werden (Abb. 18).

Abbildung 18: Größenverteilung der Remakaxone

Die Größenverteilung der Remakaxone ist dargestellt. Es ließen sich keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zwischen allen Gruppen und kein Effekt der Rapamycinbehandlung nachweisen.

3.1.3.3. Einfluss auf weitere Veränderungen von Remakaxonen

Normalerweise sind mehrere Remakaxone durch die Schicht der Plasmamembran einer nicht myelinisierenden Schwannzelle voneinander separiert (Chen et al. 2003). PTEN-Mutanten zeigten Remakaxone umhüllt von mehreren Lamellen unkompakten Myelins vor allen in älteren Tieren (P120). Ebenso wurden gelegentlich Myelin ähnliche Membranzumwicklungen um Kollagenfibrillen in P120 alten PTEN Mutanten beobachtet (Goebbels 2008).

In im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen mit Mäusen im Alter von P43 konnten nur wenig dieser vermehrten Umhüllungen der Remakaxone und nur sehr selten umhülltes Kollagen gesehen werden. Die Anzahl der zusätzlichen Lamellen war auch geringer. Diese Effekte des PTEN-Verlustes scheinen mit dem Alter der Tiere korreliert und aufgrund dessen im Alter von P43 noch nicht stark ausgeprägt zu sein. Eine Beurteilung über eine Beeinflussbarkeit dieser Veränderungen mit Rapamycin konnte deshalb nicht vorgenommen werden.

3.2. Zusammenfassung der Ergebnisse

Der Einfluss des spezifischen mTOR-Inhibitors Rapamycin auf die durch PTEN-Verlust hervorgerufenen Veränderungen im PNS wurden untersucht. Dazu wurden histologische Analysen des Nervus ischiadicus der Maus bei vier Gruppen durchgeführt: unbehandelte und mit Rapamycin behandelte Kontrollen (K_N und K_R) und unbehandelte und mit Rapamycin behandelte PTEN-Mausmutanten (M_N und M_R). Um die nachfolgende Position von mTOR zu PTEN im PI3K/AKT-Signalweg und dessen spezifische Inhibition durch Rapamycin darzustellen, wurden Western-Blot-Analysen angewendet. Hierin zeigte sich eine deutliche Reduktion der P-S6-Expression in den behandelten PTEN-Mausmutanten ohne Einfluss auf P-AKT, welches bei beiden Mutantengruppen gesteigert war. mTOR agiert nachfolgend zu PTEN und wird spezifisch durch Rapamycin gehemmt.

Ein gesteigerter PI3K/AKT-Signalweg beeinflusst die Anzahl der myelinisierten Axone, denn in PTEN-Mausmutanten konnten deutlich mehr myelinisierte Axone im Vergleich zu den Kontrollen gezählt werden. Rapamycin zeigte keinen Effekt in den Mutanten und in den Kontrollen.

Die Dichte der myelinisierten und nicht myelinisierten Axone ist in den PTEN-Mausmutanten verglichen mit den Kontrollen vermindert. Während die Dichte der myelinisierten Axone durch die Behandlung mit Rapamycin beeinflusst werden konnte, lies sich bei den nicht myelinisierten Axonen keine signifikante Steigerung der Dichte durch Rapamycin nachweisen. Eine Tendenz war jedoch erkennbar.

Einen deutlichen Einfluss zeigte Rapamycin auf die Ausbildung von Myelinmissbildungen wie Tomakula, kommaförmige Ausfaltungen und rückwärtsgerichtete Schleifen. In PTEN-Mausmutanten waren diese Myelinabnormalitäten signifikant erhöht, bei mit Rapamycin behandelten Mutanten deutlich weniger. Der größte Effekt lies sich bei den Tomakula ausmachen, aber auch die rückwärts gerichteten Schleifen und die kommaförmigen Ausfaltungen wurden durch Rapamycin signifikant verhindert.

Als weiteres histologisches Kriterium wurde die Dicke der Myelinscheide untersucht. Die größten Unterschiede waren vor allem in den kleinen myelinisierten Axonen ($<2,5\mu\text{m}$) anzunehmen und wurden deshalb genauer betrachtet. Die g-ratios waren in beiden Mutantengruppen (M_N und M_R) signifikant kleiner als in den Kontrollgruppen (K_N und K_R). Die kleinen Axone sind bei PTEN-Verlust hypermyelinisiert. Ein

Anstieg der g-ratios in behandelten Mutanten (M_R) deutete sich im Vergleich zu unbehandelten Mutanten (M_N) an, konnte jedoch nicht signifikant nachgewiesen werden.

Der mTOR-Signalweg scheint bei der Ausbildung von Myelinabnormalitäten, hervorgerufen durch PTEN-Verlust in Schwannzellen, beteiligt zu sein und auf die Dichte der myelinisierten Axone Einfluss zu haben. Eine Beteiligung deutet sich bei der Ausbildung der Myelinscheidendicke und der Dichte der nicht myelinisierten Axone an, ohne jedoch signifikant nachweisbar zu sein. Bei allen Untersuchungen wurden in beiden Kontrollgruppen (K_N und K_R) keine Effekte von Rapamycin festgestellt. Dies bestätigt die gesteigerte Sensitivität von PTEN-Mutanten auf Rapamycin. Tabelle 2 fasst die Ergebnisse kurz zusammen.

Histologisches Kriterium N. ischiadicus (P43)	Wildtypen ohne Rapamycin-behandlung (n=8)	PTEN-Mutanten (n=6)	mit Rapamycin behandelte PTEN-Mutanten (n=8)	Rapamycin-effekt (M_N vs. M_R)
myelinisierte Axone / Querschnitt	3684± 159,8	4289± 90,99	4240± 116,5	↔
Dichte myelinisierter Axone/μm ²	0,04044± 0,001825	0,02512± 0,0016	0,03465± 0,001112	↑
Tomakula / Querschnitt	3,125± 1,807	209,0± 20,76	51,63± 12,87	↓↓↓
rückwärts gerichtete Schleifen/ Querschnitt	6,250± 1,849	72,17± 7,897	17,88± 3,393	↓↓↓
kommaförmige Ausfaltungen/ Querschnitt	12,17±1,740	117,2± 6,882	60,13± 13,37	↓↓
Einfaltungen/ Querschnitt	8,875± 1,856	20,00± 5,348	11,88± 4,446	↔ – (↓)
Myelinmissbildungen; % von allen myelinisierten Axonen / Querschnitt	0,6913± 0,1263	9,768± 0,5451	3,324± 0,5548	↓↓↓
Myelinscheidendicke, Axone – Ø < 2,5 μm (g-ratio)	0,6842± 0,005371; (n=3)	0,5537± 0,01211; (n=4)	0,5658± 0,006212; (n=4)	↔
Abstand zwischen den Remakaxonen (μm)	0,06336± 0,008560; (n=3)	0,3115± 0,06375; (n=3)	0,2300± 0,04195; (n=3)	↔ – (↓)

Tabelle 2: Zusammenfassung der Ergebnisse

Es sind in einer kurzen Übersicht die Ergebnisse dieser Arbeit zusammengefasst. Dabei wurden die gewonnenen Daten von mit und ohne Rapamycin behandelten PTEN-Mutanten sowie die der nichtbehandelten Wildtypiere je nach histologischem Kriterium dargestellt. Da sich die Wildtypiere mit Rapamycinbehandlung nicht signifikant von denen ohne Rapamycinbehandlung unterscheiden, sind sie in dieser Zusammenfassung nicht aufgeführt.

4. Diskussion

4.1. Phosphoinositide als Schlüsselregulatoren in peripheren Nerven

Periphere Nerven sind ein gutes Beispiel für Zell-Zell-Interaktionen. In HMSN- oder CMT-Erkrankungen ist dieses genau regulierte System zwischen Neuronen (Axonen) und Schwannzellen gestört. Die Defizite können sowohl in Schwannzellen oder Neuronen als auch in beiden bestehen (Berger et al 2006). Folgen sind vor allem progressive, symmetrische Muskelschwäche und Muskelatrophien und Störungen der Sensibilität der distalen Extremitäten (Nave et al. 2007). Erkenntnisse über Veränderungen auf zellulärer Ebene, wie über Funktion und Zusammenspiel von Proteinen, Lipiden und Enzymen, können nicht nur Hinweise auf den Pathomechanismus und auf evtl. mögliche therapeutische Ansatzpunkte, sondern auch Einblicke in die Biologie peripherer Nerven geben.

In der Literatur sind Phosphoinositide als Schlüsselregulatoren in peripheren Nerven hervorgehoben worden (Suter 2007). Sie sind an vielen wichtigen regulatorischen Prozessen, wie an Signalwegen, am Umbau des Zytoskeletts, an der Membranproduktion und an der Gentranskription beteiligt, so dass ihre Dysregulation die normale Funktion myelinisierter Nerven deutlich beeinflussen sollte (Suter 2007). Darauf weisen auch neuere Erkenntnisse hin, die zeigen, dass Mutationen in Enzymen, die Phosphoinositide dephosphorylieren und in Proteinen mit Bindungsstellen für Phosphoinositide ursächlich an bestimmten CMT-Erkrankungen beteiligt sein können (Nave et al. 2007; Suter 2007). Die Phosphatase FIG4 dephosphoryliert $PI(3,5)P_2$ an der D5-Position und ist in CMT4J mutiert (Suter 2007). MTMR 2 dephosphoryliert $PI3P$ und $PI(3,5)P_2$ an der D3-Position. MTMR 13 verstärkt die enzymatische Aktivität von MTMR 2. Mutationen in MTMR 2 und MTMR 13 führen zu CMT4B1 und CMT4B2, welche charakteristischen Membranausfaltungen aufweisen (Berger et al. 2006).

In-vitro-Studien haben gezeigt, dass NRG1-Typ III den PI3K/AKT-Signalweg und die Myelinisierung positiv beeinflussen kann (Taveggia et al. 2005; Ogata et al. 2004). Ein abnormaler NRG1/PI3K-Signalweg könnte zu Myelinopathien und CMT-Pathologien führen (Nave und Salzer 2006). Die PI3K phosphoryliert *in vivo* bevorzugt PIP_2 zu PIP_3 (Marone et al. 2008). Ihr Gegenspieler ist die Lipidphosphatase PTEN, die PIP_3 zu PIP_2 dephosphoryliert (Maehama und Dixon 1998). Histologische Analysen von konditionellen PTEN-Mausmutanten zeigten im PNS vermehrt Myelin-

abnormalitäten (Goebbels 2008). Diese Vorbeobachtungen konnten in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Nach ihren Erscheinungsformen können sie in fokale Hypermyelinisierungen (Tomakula), rückwärtsgerichtete Schleifen, kommaförmige Ausfaltungen und Einfaltungen eingeteilt werden. Eine Erklärung für diese Missbildungen wäre, dass der Verlust von PTEN in Schwannzellen zu einem Anstieg der PIP3-Level führen und daraufhin die Myelinisierung der peripheren Nerven erheblich stören müsste. PIP3 könnte damit als wichtiger Regulator der Myelinisierung im PNS gelten.

4.2. Veränderung des Phosphoinositid-Levels beeinflusst Signalwege

NRG1-Typ III reguliert die Myelinscheidendicke im PNS ohne dabei die Myelinlamellenstruktur zu beeinträchtigen (Michailov et al. 2004). Dabei fällt vor allem die Hypermyelinisierung bei kleinen Axonen auf. Auch in der vorliegenden Arbeit wurde eine Hypermyelinisierung in den kleinen Axonen der PTEN-Mausmutanten beobachtet. Während kleine Axone oft nur „normal“ hypermyelinisiert waren, waren vor allem die größeren Axone meist fokal hypermyelinisiert und damit von abnormalem Myelinwachstum betroffen. Im Folgenden soll ein möglicher Grund dafür diskutiert werden. Kleinere Axone haben eine geringe Oberfläche und senden deshalb ein schwächeres axonales Signal in Form von NRG1-Typ III zur Schwannzelle. Weil dies nur in eine moderate Aktivierung des PI3K-Signalweges in der myelinisierenden Schwannzelle umgesetzt werden würde, wäre die Störung der Myelinisierung bei PTEN-Verlust ebenso nur wenig ausgeprägt und würde lediglich in einer dickeren Myelinscheide resultieren. In größeren Axonen mit mehr NRG1-Typ III entstünden demzufolge hohe Level von PIP3 in PTEN-defizienten Schwannzellen. Dies könnte das fein regulierte System in der Weise stören, dass es zur Ausbildung von Myelinmissbildungen kommen kann. Die Hypermyelinisierung der kleinen Axone war im Rahmen dieser Arbeit mit Rapamycin nicht signifikant zu beeinflussen. Bedenkt man, dass die maximale Myelinscheidenbildung während der ersten 3 Wochen postnatal auftritt und dass in zwei Wochen alten Mäusen die große Mehrheit der Axone bereits kompakt myelinisiert ist (Garbay et al. 2000), so erklärt sich auch möglicherweise der fehlende Einfluss einer Rapamycingabe auf die Myelinscheidendicke durch den späten Beginn der Studie (bei P13).

4.3. mTOR-abhängige und -unabhängige Beeinflussung der Myelinisierung

PIP3 wird von der Serin/Threonin-Proteinkinase AKT gebunden und reguliert deren Aktivität als geschwindigkeitslimitierender Schritt (Hay und Sonnenberg 2004) (Abb.: 19). Untersuchungen mit aktiviertem AKT in Schwannzellen und Oligodendrozyten transgener Mäuse zeigten eine vermehrte Myelinisierung im ZNS, während das PNS unbeeinträchtigt war (Flores et al. 2008). Diese Ergebnisse stehen im Kontrast zu dieser Arbeit, in der der PTEN-Verlust sowohl eine gesteigerte AKT-Aktivität als auch fehlerhaft ausgebildete Myelinscheiden mit fokalen Myelinausfaltungen, vermehrte lamellopodienartige Membranausfaltungen sowie eine veränderte Anordnung der Remakbündel verursachte. Für diese Diskrepanz gibt es verschiedene Erklärungsmöglichkeiten. Zum einen könnte der Verlust von PTEN die Aktivität von AKT stärker anregen, als die Überexpression einer konstitutiv aktiven Form von AKT unter dem PLP-Promotor (Flores et al. 2008). Zum anderen ist der AKT/mTOR-Signalweg zwar ein wichtiger und zentraler Weg, aber nicht die einzige Wirkstrecke, die durch PTEN-Verlust und gesteigerte PIP3-Level beeinflusst werden kann. Ein Beispiel wäre die Veränderung des Zytoskeletts der Schwannzellen. PIP3, als Produkt der PI3K, bindet unter anderem GEF's (guanine nucleotide exchange factors) über deren PH Domäne (Marone et al. 2008; Innocenti et al. 2003). Diese wiederum stimulieren kleine Rho-GTPasen wie Rac1 (Chan 2007; Innocenti et al. 2003), welche für die Regulierung des Actin/Zytoskeletts von großer Bedeutung sind (Abb.:19). In Rac1-defizienten Schwannzellen ist die Länge von radialen Schwannzellausläufern und die Anzahl der Lamellopodien deutlich reduziert (Chan 2007). Betrachtet man den GEF/Rac1-Signalweg als wichtigen regulatorischen Weg für Membranausstülpungen wie z.B. Lamellopodien (Chan 2007), und bedenkt, dass Myelinzuwachs wahrscheinlich in den paranodalen Regionen geschieht (Suter 2007), so könnten erhöhte PIP3-Level über den GEF/Rac1-Signalweg durch Beeinträchtigung der Actin/Zytoskelettorganisation die primäre Ursache der beobachteten Myelinmissbildungen, wie Ausfaltungen sein.

Wie oben beschrieben, weisen die Daten von Flores et al. (2008) darauf hin, dass allein ein aktiver AKT/mTOR-Signalweg in Schwannzellen ohne vermehrtes PIP3 keine pathologischen Veränderungen im PNS bewirken kann. Allerdings zeigen die in dieser Arbeit vorgestellten Daten andererseits deutlich, dass ein aktiver

AKT/mTOR-Signalweg in PTEN-Mutanten an der Bildung fokaler Myelinausfaltungen beteiligt ist. Daraus kann man ableiten, dass die initiale Beeinträchtigung der Schwannzellen durch einen mTOR-unabhängigen Mechanismus erfolgt, z.B. wie oben beschrieben über lokal verstärkte Aktivierung des Actin/Zytoskeletts, im Folgenden jedoch mTOR-abhängige Mechanismen, wie gesteigerte Myelinenexpression und gesteigertes Wachstum, die Pathologie weiter beeinflussen. Verstärkte Myelinmissbildungen wären die Folge. Durch diese zusätzliche Beeinträchtigung von PIP3-abhängigen anderen Signalwegen neben dem AKT/mTOR-Signalweg wären die in dieser Arbeit und in den Voruntersuchungen beobachteten ausgeprägten Myelinmissbildungen im PNS nach PTEN-Verlust erklärbar.

Abbildung 19: Modell zum Einfluss von PIP3 auf die Schwannzellentwicklung; in Anlehnung an Stiles et al. 2004, S. 177 und Dancey 2006, S. 1066

Ein möglicher Einfluss von PIP3 auf Signalwege in Schwannzellen ist dargestellt. Effekte eines gesteigerten PI3K/AKT-Signalweges, die über mTOR vermittelt werden, können mit Rapamycin korrigiert werden, während beispielsweise die Beeinflussung des Actin/Zytoskeletts nicht durch Rapamycin umgekehrt werden kann.

Für die Aussortierung von Axonen aus einem Remakbündel durch eine myelinisierende Schwannzelle wurde ebenso Rac1 als Effektormolekül identifiziert (Chan 2007). Gleichzeitig wird vermutet, dass die PI3K-Aktivität für die regelrechte Axon-aussortierung notwendig ist (Ogata et al. 2004; Maurel und Salzer 2000). Wenn Rac1 über GEF's durch PIP3 stimuliert wird, müsste eine gesteigerte Aussortierung von normalerweise nicht myelinisierten Axonen bei PTEN-Mutanten über diesen Weg erklärt werden können. Tatsächlich war in der vorliegenden Arbeit die Anzahl der myelinisierten Axone in den PTEN-Mutanten im Vergleich zu den Kontrollen signifikant erhöht. Die Rapamycingabe von P13 bis P43 hatte keinen Effekt auf diesen Prozess. Da die Aussortierung von Axonen zur Myelinisierung früh postnatal erfolgt (Jessen und Mirsky 2005), die Rapamycingabe aber erst an P13 begonnen wurde, wäre ein Effekt auf den Aussortierungsprozess auch nicht zu erwarten gewesen.

4.4. Beeinflussung der Myelinmissbildungen durch Rapamycin

Durch PTEN-Verlust in Schwannzellen wurden verschiedene Myelinmissbildungen verursacht, die in vier Formen unterschieden werden konnten (Tomakula, rückwärtsgerichtete Schleifen, kommaförmige Ausfaltungen, Einfaltungen). Der Einfluss auf diese Fehlbildungen durch eine Behandlung mit Rapamycin wurde in dieser Arbeit untersucht.

Alle vier Formen der Myelinmissbildungen zusammen betrachtet waren in den PTEN-Mutanten signifikant nach Rapamycingabe reduziert, wurden aber nicht vollständig verhindert. Für die einzelnen Formen zeigten sich außerdem Unterschiede im Rapamycineffekt. Die kommaförmigen Ausfaltungen waren weniger stark in den PTEN-Mutanten verhinderbar als die Tomakula und die rückwärtsgerichteten Schleifen. Dies ist eventuell dadurch erklärbar, dass kommaförmige Ausfaltungen die initiale, nicht mTOR-abhängige Pathologieform repräsentieren. Diese Hypothese wird unterstützt durch Studien über die Regionen, die besonders von Myelinmissbildungen betroffen sind. Kommaförmige Ausfaltungen sind z.B. in MTMR2-defizienten Schwannzellen und in MTMR2-Null-Mäusen vor allem in den Paranodalregionen beschrieben worden (Bolino et al. 2004). Auch Tomakula und rückwärtsgerichtete Schleifen befanden sich bei verschiedenen Tiermodellen hereditärer Neuropathien vermehrt in diesen Regionen (Bolino et al. 2004; Adlkofer et al. 1997). Untersuchungen der PTEN-Mutanten zeigten ebenfalls, dass Tomakula und Myelinausfaltungen sich be-

vorzuzug in Regionen unkompakten Myelins entwickeln (Goebbels 2008). Rapamycin wirkt sich vermutlich eher auf die Größe der Myelinausfaltungen als auf deren initiale Bildung aus. Dies bietet auch die mögliche Erklärung für die nicht vollständige Verhinderbarkeit der Myelinmissbildungen durch Rapamycin. So könnten sich aus den initial entstandenen Ausfaltungen z.B. Tomakula und rückwärtsgerichteten Schleifen entwickeln und sich unter dem Einfluss des AKT/mTOR-Signalweges durch vermehrte Myelingenexpression und gesteigertes Wachstum ausprägen. Bei einer durch Rapamycin induzierten Wachstumshemmung müsste dann die Wahrscheinlichkeit niedriger sein, im Nervenquerschnitt diese Myelinmissbildungen zu treffen, was deren verringerte Anzahl nach Rapamycinbehandlung erklären würde (Abb.: 20).

Einfaltungen waren die zahlenmäßig am geringsten auftretenden Myelinveränderungen. Sie stiegen zwar signifikant in den PTEN Mutanten im Vergleich zu den Kontrollen an, aber waren durch Rapamycin nicht signifikant zu beeinflussen. Aufgrund ihres so geringen Auftretens beeinflussen sie das Gesamtergebnis der Myelinmissbildungen unter PTEN-Verlust unwesentlich. Dass Einfaltungen durch Rapamycin nicht signifikant veränderbar sind, könnte auch auf einen mTOR-unabhängigen Entstehungsmechanismus hindeuten.

Abbildung 20: Modell zum Einfluss von Rapamycin auf die Größe der Myelinmissbildungen

Die schematische Darstellung zeigt den möglichen Einfluss von Rapamycin auf die Größe der Myelinmissbildungen. Tomakula dienen hier als Beispiel. In mit Rapamycin behandelten PTEN-Mausmutanten (M_R) kommt es zu kleineren Myelinmissbildungen, welche im Querschnitt weniger häufig getroffen werden als in unbehandelten Mutanten (M_N).

4.5. Schwannzell-Größenzunahme bei gesteigertem PI3K/AKT-Signalweg

Bekannt ist, dass es bei PTEN-Mutationen und darauf folgendem hyperaktivem Signalweg über mTOR/S6 zu vermehrtem Zellwachstum kommt (Marone et al. 2008; Stiles et al. 2004; Dahia 2000). *In-vivo*-Untersuchungen von Neuronen des ZNS zeigten größere Neuronensomata nach PTEN-Verlust (Known et al. 2003). Größere Zellen im Kleinhirn konnten in körnerzellspezifischen PTEN-Mutanten nachgewiesen werden (Kishimoto et al. 2003).

In Übereinstimmung damit kann die in dieser Arbeit beobachtete verminderte Dichte der myelinisierten Axone in PTEN-Mutanten mit einem gesteigerten Schwannzellwachstum in Einklang gebracht werden. Es wäre möglich, dass durch den vermehrten Platzanspruch der größeren Schwannzellkörper die myelinisierten Axone in den PTEN-Mutanten nicht so dicht zusammen liegen wie in den Kontrollen mit normalgroßen Schwannzellen. Dies würde auch die gesteigerte Unordnung in den Remakbündeln bei PTEN-Mutanten erklären, bei denen die Abstände zwischen den Remakaxonen erweitert sind. Remakaxone werden von einer nicht myelinisierenden Schwannzelle durch ihre dazwischen gebrachten Ausläufer voneinander separiert und isoliert und bilden zusammen ein sogenanntes Remakbündel (Chen et al. 2003). Eine größere nicht myelinisierende Schwannzelle könnte zu weiteren Abständen zwischen den Remakaxonen führen. Die Remakaxone bei heterozygoten NRG1-Typ-III^{+/-}-Mäusen lagen dichter zusammen und zeigten inkomplett separierte Remakaxone (Taveggia et al. 2005). Das verminderte axonale Signal in Form von NRG1-Typ III könnte nachfolgend einen minder aktivierten PI3K-Signalweg mit geringerer Konzentration an PIP3 in den Schwannzellen begründen mit wiederum weniger starkem Wachstumsreiz. Dass das gesteigerte Zellwachstum bei PTEN-Verlust durch mTOR-Inhibition beeinflussbar ist, wurde z.B. durch Known et al. gezeigt, indem sich durch die Gabe des Rapamycin-Derivats CCI-779 die Neuronensomatagröße reduzieren ließ (Known et al. 2003). In der vorliegenden Arbeit brachte die Behandlung mit Rapamycin nur bei den myelinisierten Axonen eine signifikante Dichtezunahme, was auf eine Reduktion der Größe der myelinisierenden Schwannzellen hindeuten könnte. In den elektronenmikroskopischen Analysen schienen die Remakaxone nach Rapamycingabe wieder geordneter. Eine signifikante quantitative Aussage konnte jedoch nicht erbracht werden. Die Abstände zwischen den Remakaxonen eines angenommenen Remakbündels wurden nach der Methode des nächsten Nachbarn gemes-

sen. Problematisch ist dabei, dass in einem zweidimensionalen Bild nur Vermutungen über die dreidimensionale Struktur eines Remakbündels angestellt werden können. So ist diese Messmethode sehr individuell und störanfällig. Weiterhin sind die Axondichten nur indirekte Hinweise auf die Größe der myelinisierenden und nicht myelinisierenden Schwannzellen.

4.6. Humane tomakulöse Neuropathien

Verschiedene humane periphere Neuropathien mit Myelinmissbildungen, ähnlich zu denen, die im Rahmen dieser Arbeit gesehen wurden, sind bekannt. So treten bei der CMT4B1 und der CMT4B2 charakteristischerweise Myelinausfaltungen auf. Mutationen in MTMR 2 und MTMR 13 sind die Ursache für diese Erkrankungen (Niemann et al. 2006). In einem spezifischen Mausmodell mit MTMR 2 Mutation in Schwannzellen konnten diese Ausfaltungen und rückwärtsgerichtete Schleifen gesehen werden (Bolino et al. 2004). Bei der CMT1B, hervorgerufen durch eine P0-Mutation, treten Myelinausfaltungen und Tomakula auf (Thomas et al. 1994). Eine Mutation in FGD4, einem GEF, führt zur CMT4H, bei der ebenfalls Myelinausfaltungen vorkommen (Suter 2007). Die größte Ähnlichkeit zu den Pathologien dieser Arbeit weist jedoch die HNPP-Erkrankung auf. Sie wird hervorgerufen durch eine Deletion im PMP22-Gen. Klinisch präsentiert sich die HNPP als eine episodisch wiederkehrende, schmerzlose, fokale, motorisch-sensible Neuropathie, welche durch Minimaltraumata oder Nervenkompression hervorgerufen wird (Grossman et al. 2007). Die NLG ist nicht nur im geschädigten Nerven, sondern generell gemindert und in den betroffenen Segmenten symptomatischer Nerven treten auch Leitungsblockaden auf (Chance 2006). Das histologische Hauptmerkmal bei der HNPP sind Tomakula, was ihr die Bezeichnung tomakulöse Neuropathie einbrachte. Ein spezifisches HNPP-Mausmodell zeigt zu der humanen Form ähnliche morphologische (Tomakula und Myelinausfaltungen) und elektrophysiologische Eigenschaften (Adlkofer et al. 1997).

Betrachtet man die Pathologien der eben genannten humanen Neuropathien, vor allem aber die der HNPP, und vergleicht sie mit denen, die im Rahmen dieser Arbeit gesehen wurden, lässt sich eine gewisse Ähnlichkeit feststellen. So kommt die Frage auf, ob nicht, trotz primär anderer Ursache (HNPP – Deletion im PMP22-Gen), ein ähnlicher Pathomechanismus für die Ausbildung der Myelinmissbildungen zugrunde

liegen könnte. So wäre es interessant zu erfahren, ob bei der HNPP-Erkrankung ebenfalls sekundär ein gesteigerter PI3K/AKT/mTOR-Signalweg vorliegt. Dafür bieten sich Untersuchungen am HNPP-Mausmodell an. Kann eine Steigerung im Signalweg nachgewiesen werden, könnten durch eine experimentelle Rapamycinbehandlung die Effekte einer mTOR-Inhibition auf die Myelinmissbildungen im HNPP-Mausmodell untersucht werden.

Die experimentelle Behandlung von Tiermodellen kann Prinzipien für mögliche therapeutische Zugänge prüfen. Dies ist in nicht letalen Erkrankungen wie den hereditären Neuropathien wichtig. Hier müssen Nutzen und Risiken der therapeutischen Interventionen sensibel abgewogen werden. Derzeit gibt es noch keine spezifische Therapie der HNPP. Sie ist häufig selbstlimitierend mit Besserung nach Tagen bis Wochen, aber auch einige schwere Fälle mit bleibenden Schäden wurden beobachtet (Chance 2006). Konservative Therapien und Symptom erleichternde Maßnahmen werden angewandt (Grossman et al. 2007; Chance 2006). Eine Behandlung mit Rapamycin könnte theoretisch durch Minderung der Tomakula eine Besserung z.B. in Form von positiv beeinflusster NLG oder selteneren Episoden von Druckpareisen erzielen, wenn die Tomakula ursächlich für diese Symptome sind und tatsächlich über einen mTOR-abhängigen Mechanismus ausgebildet werden.

Rapamycin wird bei Patienten nach Nierentransplantation zur Prävention von akuten und chronischen Abstoßungsreaktionen eingesetzt (Neuhaus et al. 2001). In Studien ist ein wachstumshemmender Effekt, auch in PTEN-Mausmutanten, nachgewiesen worden (Podsypanina et al. 2001). In klinischen Studien wurde Rapamycin und dessen Derivate bei Patienten mit gesteigertem PI3K-Signalweg mit vielversprechenden Resultaten in Lymphomen, beim Endometrium-Karzinom und beim Nierenzell-Karzinom angewendet (Marone et al. 2008). Aber die Nebenwirkungen und Interaktionen von Rapamycin sind vielfältig. Als Immunsuppressivum birgt sein Einsatz auch immer das Risiko von Infektionen und von der Ausbildung maligner Tumoren, obwohl bei intermittierender Gabe keine relevante Immunsuppression auftreten soll (Dancey 2006) und ein antitumoröser Effekt von Rapamycin beschrieben wurde (Weischer et al. 2007; Dancey 2006). Das in seinen chemischen Eigenschaften bessere Rapamycin-Analogon CCI-779 hat bereits verschiedene Phase-1-Studien durchlaufen und zeigte sich sogar als gut verträglich (Hidalgo und Rowinsky 2000). Für eine genaue Definition von optimalen Dosierungen, Patientenauswahl und Kombinationsstrategien bezüglich einer antitumorösen Rapamycinbehandlung sind noch weitere Forschun-

gen nötig (Dancey 2006). Für eine Anwendung als Therapeutikum in den oft sehr symptomarmen HNPP-Patienten ist Rapamycin aufgrund der hohen Nebenwirkungen im Verhältnis zum zu erwartenden Nutzen eher ungeeignet. Doch durch die Aufschlüsselung von eventuell beteiligten Signalwegen bietet sich die Möglichkeit, neue therapeutische Ansatzpunkte zu identifizieren.

4.7. Schlussfolgerungen

Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit ergaben sich verschiedene Erkenntnisse über die Funktion und das Zusammenspiel von Proteinen, Lipiden und Enzymen im peripheren Nerven sowie über Veränderungen bei Störungen in diesem System.

Der PI3K/AKT-Signalweg reguliert die Myelinisierung im PNS. PIP3 befindet sich dabei an einer wichtigen Schlüsselposition und beeinflusst neben dem AKT/mTOR-Weg auch andere Signalwege. Der Verlust von PTEN und gesteigerte Level von PIP3 in Schwannzellen führen zu Größenzunahme der Schwannzellen und zu vermehrten Myelinabnormalitäten.

In dieser Arbeit wurde die Bedeutung von PIP3 bei der Ausbildung abnormaler Myelinstrukturen (Tomakula, rückwärts gerichtete Schleifen und kommaförmige Ausfaltungen) bestätigt. Weiterhin konnte eine Abhängigkeit der Ausbildung von Myelinabnormalitäten vom mTOR-Signalweg gezeigt werden, da eine Behandlung mit dem spezifischen mTOR-Inhibitor Rapamycin zu einer deutlichen Reduktion des abnormen Myelins führte.

Tomakula sind das histologische Hauptmerkmal der HNPP-Erkrankung. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten an, dass eine Behandlung mit Rapamycin die HNPP günstig beeinflussen könnte, falls die Ausbildung der Tomakula im PNS generell einem ähnlichen Pathomechanismus folgt. Da nicht bekannt ist, ob bei der HNPP ebenfalls ein gesteigerter PI3K/AKT-Signalweg vorliegt, müssten weiterführende Untersuchungen am spezifischen Tiermodell durchgeführt werden. Eine Behandlung der oft symptomarmen HNPP-Patienten mit dem nebenwirkungsreichen mTOR-Inhibitor Rapamycin muss sehr kritisch diskutiert werden. Der prinzipielle Nachweis der Wirkung von Rapamycin im Mausmodell kann aber wichtige Hinweise auf weitere mögliche therapeutische Ansatzpunkte geben.

5. Zusammenfassung

Schwannzellen und Axone beeinflussen sich gegenseitig über vielfältige Interaktionen und stellen somit die regelrechte Organisation und Funktion im peripheren Nerven sicher. Die beteiligten Signalwege sind noch weitgehend unbekannt, aber eine Signaltransduktion über PI3K und AKT ist wahrscheinlich.

In Experimenten mit konditionellen Mausmutanten, in denen PTEN, eine PI3K-antagonisierende Lipidphosphatase, in Schwannzellen ausgeschaltet wurde, zeigten sich verschiedene Veränderungen im PNS, so z.B. eine vermehrte Anzahl myelinisierter Axone, eine Hypermyelinisierung kleiner Axone, vergrößerte Schwannzellen und lockere Membranumwicklungen um normalerweise nicht myelinisierte Axone. Am auffälligsten waren jedoch Myelinmissbildungen in Form von Tomakula und kommaförmigen Ausfaltungen. Gleichzeitig wurde eine verstärkte Aktivierung des AKT/mTOR-Signalweges auf Proteinebene nachgewiesen.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob eine selektive mTOR-Inhibition durch Rapamycin diese beobachteten Pathologien des abnormalen Myelins positiv beeinflussen könnte. Dazu wurden intraperitoneale Injektionen einer Rapamycinlösung (bzw. einer Plazebolösung) bei PTEN-Mausmutanten und Wildtyptieren zwischen den Postnataltagen 13 bis 43 vorgenommen und auf histologische Veränderungen im Nervus ischiadicus licht- und elektronenmikroskopisch untersucht. Ebenso wurden die Einflüsse von Rapamycin auf den AKT/mTOR-Signalweg auf Proteinebene mittels Western Blot betrachtet.

Die Ergebnisse zeigten eine deutliche Verbesserung der Pathologie. Anscheinend sind die Schwannzellsomata kleiner und die Remakaxone liegen dichter zusammen. Im Besonderen bildeten sich jedoch deutlich weniger Myelinabnormalitäten aus. Am größten war der Effekt bei den Tomakula und rückwärtsgerichteten Schleifen. Prinzipiell sind die Myelinmissbildungen durch Rapamycin aber nicht vollständig verhinderbar. Eine Interpretationsmöglichkeit dafür wäre, dass die initiale Schädigung der Myelinisierung mTOR-unabhängig passiert, während mTOR-abhängige Wachstums-signale die Größenausdehnung der Myelinmissbildungen steuern und damit durch Rapamycin beeinflussbar sind.

Diese Ergebnisse sind interessant im Hinblick auf humane Neuropathien wie der HNPP-Erkrankung, welche eine sehr ähnliche Pathologie aufweist. Es stellt sich nun die Frage, ob bei der HNPP, trotz primär anderer Ursache (Deletion des PMP22-Gens), ein ähnlicher Pathomechanismus zugrunde liegt. Künftige Untersuchungen an einem HNPP-Mausmodell könnten feststellen, ob dort ebenfalls der AKT/mTOR-Signalweg überaktiviert ist und, im positiven Fall, ob Rapamycin die charakteristischen Myelinmissbildungen verhindern kann.

6. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schema peripherer Nerv	6
Abbildung 2: Schema der Schwannzell-Differenzierung	8
Abbildung 3: "g-ratio" als Maß für die Myelinscheidendicke	8
Abbildung 4: PI3K/AKT-Signalweg	17
Abbildung 5: Zeitschema der Rapamycinbehandlung	34
Abbildung 6: Western Blots von P-S6, S6, P-AKT und AKT	42
Abbildung 7: Expression von P-AKT, S6 und P-S6	42
Abbildung 8: Anzahl myelinisierter Axone	43
Abbildung 9: Dichte myelinisierter Axone	44
Abbildung 10: Querschnitt des Nervus ischiadicus in lichtmikroskopischer Übersicht	45
Abbildung 11: Einzelne Formen abnormer Myelinausbildungen	46
Abbildung 12: Einfluss von Rapamycin auf abnorme Myelinausbildungen	47
Abbildung 13: Einfluss von Rapamycin auf Myelinmissbildungen	48
Abbildung 14: g-ratio Messung	50
Abbildung 15: Verteilung aller gemessenen g-ratios	50
Abbildung 16: Effekt von Rapamycin auf das g-ratio in kleinen myelinisierten Axonen	52
Abbildung 17: Anordnung der Remakbündel	53
Abbildung 18: Größenverteilung der Remakaxone	55
Abbildung 19: Modell zum Einfluss von PIP3 auf die Schwannzellentwicklung	62
Abbildung 20: Modell zum Einfluss von Rapamycin auf die Größe der Myelinmissbildungen	64

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: ausgewählte Beispiele von CMT-Erkrankungen	12
Tabelle 2: Zusammenfassung der Ergebnisse	58

7. Abkürzungsverzeichnis

verwendete SI-Einheiten (Système International d'Unités) Präfixe

Symbol	Faktor	Präfix
k	10^3	kilo
m	10^{-3}	milli
μ	10^{-6}	mikro

verwendete Abkürzungen

Abb.	Abbildung
bzw.	beziehungsweise
BZS	Bannayan-Zonana-Syndrom
CCI-779	Temsirolimus
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CIDP	chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy
CMT	Charcot-Marie-Tooth-Erkrankung
CRD	cysteinreiche Domäne
CS	Cowdens Syndrom
Cx32	Connexin 32
CYP 3A4	Cytochrom P450 Typ 3A4
ddH ₂ O	zweifach destilliertes Wasser
DSS	Dejerine-Sottas-Syndrom
EGF	epidermal growth factor
evtl.	eventuell
FKBP-12	Peptidyl-Prolyl-cis-trans-Isomerase-FK506-Bindungsprotein mit 12 kDa
GDP	Guanin-Nukleotid-Diphosphat
GEF	guanine nucleotide exchange factors
GIT	Gastrointestinaltrakt
GTP	Guanin-Nukleotid-Triphosphat
HMSN	hereditäre motorisch-sensible Neuropathie
HNPP	hereditary neuropathy with liability to pressure palsies
IgM	Immunglobulin M
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
K_N	Kontrolltiere ohne Rapamycinbehandlung
K_R	Kontrolltiere mit Rapamycinbehandlung
LDD	Lhermitte-Duclos-Disease
μ m	Mikrometer
M_N	Mutanten ohne Rapamycinbehandlung
M_R	Mutanten mit Rapamycinbehandlung

ml	Milliliter
MPI	Max-Planck-Institut
MPZ (P0)	Myelin-Protein-Zero
mRNA	messenger (Boten) Ribonukleinsäure
MTMR	myotubularin-related protein
mTOR	mammalian target of rapamycin
n	Anzahl
NLG	Nervenleitgeschwindigkeit
NRG	Neuregulin
NRG1-Typ I; (II; III)	Neuregulin1 Typ I; (II; III)
P0 (MPZ)	Myelin-Protein-Null
P-AKT	phospho-AKT
PCR	Polymerasekettenreaktion
PH	pleckstrin homology
PI3P	Phosphatidylinositol-3-Phosphat
PI(3,5)P ₂	Phosphatidylinositol(3,5)Bisphosphat
PI(3,4,5)P ₃	Phosphatidylinositol(3,4,5)Trisphosphat
PI(4,5)P ₂	Phosphatidylinositol(4,5)Bisphosphat
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIKK	Phosphoinositid-3-Kinase-verwandte-Kinase
PIP2	Phosphatidylinositol(4,5)Bisphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol(3,4,5)Trisphosphat
PKB (AKT)	Proteinkinase B
PMP22	peripheres Myelin-Protein mit 22kDa
PNS	peripheres Nervensystem
P-S6	phospho-S6
PTEN	phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10
RAD001	Everolimus
RPM	Umdrehungen pro Minute (Rounds per minute)
S6K	S6-Kinase
vs.	versus
z.B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem
***	p < 0,001; hoch signifikant
**	p = 0,001 - 0,01; sehr signifikant
*	p = 0,01 – 0,05; signifikant
n.s.	p > 0,05; nicht signifikant

8. Literaturverzeichnis

Adlkofer K, Frei R, Neuberg DH-H, 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(12): 4662-4671

Aguayo AJ, Charron L, Bray GM (1976): Potential of Schwann cells from unmyelinated nerves to produce myelin: a quantitative ultrastructural and autoradiographic study. *J Neurocytol* 5: 565-573

Balice-Gordon RJ, Bone LJ and Scherer SS (1998): Functional Gap Junctions in the Schwann Cell Myelin Sheath. *J Cell Biol* 142(4): 1095-1104

Behse F, Buchthal F, Carlsen F, Knappeis GG (1972): Hereditary neuropathy with liability to pressure palsies. Electrophysiological and histopathological aspects. *Brain* 95: 777-794

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

Bolino A, Bolis A, Previtali SC, Dina G, Bussini S, Dati G, Amadio S, DelCarro U, Mruk DD, Feltri ML et al (2004): Disruption of Mtmr2 produces CMT4B1-like neuropathy with myelin outfoldings and impaired spermatogenesis. *J Cell Biol* 167(4): 711-721

Bray GM, Rasminsky M, Aguayo AJ (1981): Interactions between axons and their sheath cells. *Annu Rev Neurosci* 4: 127-162

Chan JR (2007): Myelination: all about Rac 'n' roll. *J Cell Biol* 177(6): 953-955

Chan JR, Jolicoeur C, Yamauchi J, Elliott J, Fawcett JP, Ng BK, Cayouette M (2006): The Polarity Protein Par-3 Directly Interacts with p75^{NTR} to Regulate Myelination. *Science* 314: 832-836

Chance PF (2006): Inherited Focal, Episodic Neuropathies. *Neuromolecular Med* 8: 159-173

Chen S, Rio C, Ji RR, Dikkes P, Coggeshall RE, Woolf CL and Corfas G (2003): Disruption of ErbB receptor signaling in adult non-myelinating Schwann cells causes progressive sensory loss. *Nat Neurosci* 6(11): 1186-1193

Chuenkova MV, Furnari FB, Cavenee WK, Pereira MA (2001): Trypanosoma cruzi trans-sialidase: A potent and specific survival factor for human Schwann cells by means of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 98(17): 9936-9941

Dahia PLM (2000): PTEN, a unique tumor suppressor gene. *Endocr Relat Cancer* 7: 115-129

Dancey JE (2006): Therapeutic targets, mTOR and related pathways. *Cancer Biol Ther* 5(9): 1065-1073

Esper RM, Pankonin MS, Loeb JA (2006): Neuregulins: Versatile growth and differentiation factors in nervous system development and human disease. *Brain Res Brain Res Rev* 51: 161-175

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(28): 7174-7183

Garbay B, Heape AM, Sargueil F and Cassagne C (2000): Myelin synthesis in the peripheral nervous system. *Prog Neurobiol* 61: 267-304

Goebbels S, Max-Planck-Institut Göttingen: persönliche, mündliche Mitteilung 2008

Grossman MJ, Feinberg J, DiCarlo EF, Birchansky SB, Wolfe SW (2007): Hereditary Neuropathy with Liability to Pressure Palsies: Case Report and Discussion. *Hosp Spec Surg* 3: 208-212

Hanada M, Feng J, Hemmings BA (2004): Structure, regulation and function of PKB/AKT – a major therapeutic target. *Biochim Biophys Acta* 1697: 3-16

Hay N, Sonnenberg N (2004): Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev* 18: 1926-1945

Hidalgo M, Rowinsky EK (2000): The rapamycin-sensitive signal transduction pathway as a target for cancer therapy. *Oncogene* 19: 6680-6686

Innocenti M, Frittoli E, Ponzanelli I, Falck JR, Brachmann SM, Di Fiore PP, Scita G (2003): Phosphoinositide 3-kinase activates Rac by entering in a complex with Eps8, Abi1, and Sos-1. *J Cell Biol* 160(1): 17-23

James SR, Downes CP, Gigg R, Grove SJA, Holmes AB, Alessi DR (1996): Specific binding of the Akt-1 protein kinase to phosphatidylinositol 3,4,5- trisphosphate without subsequent activation. *Biochem J* 315: 709-713

Jessen KR, Mirsky R (2005): The Origin and Development of Glial Cells in Peripheral Nerves. *Nat Rev Neurosci* 6: 671-682

Kaefer V, Resch K: Antiphlogistika und Immuntherapeutika – Pharmakotherapie der Entzündung und des Immunsystems; in: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie; hrsg. v. Aktories K, Förstermann U, Hofmann F, Starke K; 9. Auflage; Urban und Fischer Verlag, München-Jena 2005, 363-399

Kishimoto H, Hamada K, Saunders M, Backman S, Sasaki T, Nakano T, Mak TW, Suzuki A (2003): physiological Functions of Pten in Mouse Tissues. *Cell Struct Funct* 28: 11-21

Known C-H, Zhu X, Zhang J, Baker SJ (2003): mTOR is required for hypertrophy of PTEN-deficient neuronal soma in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 100(22): 12923-12928

Lappe-Siefke C, Goebbels S, Gravel M, Nicksch E, Lee J, Braun PE, Griffiths IR, Nave K-A (2003): Disruption of *Cnp1* uncouples oligodendroglial functions in axonal support and myelination. *Nat Genet* 33(3): 366-374

LeBlanc AC, Poduslo JF (1990): Axonal modulation of myelin gene expression in the peripheral nerve. *J Neurosci Res* 26: 317-326

Lesche R, Groszer M, Gao J, Wang Y, Sun H, Liu X, Wu H (2002): Cre/loxP-mediated inactivation of the murine *Pten* tumor suppressor gene. *Genesis* 32: 148-149

Madrid R, Bradley WG (1975): The pathology of neuropathies with focal thickening of the myelin sheath (tomaculous neuropathy). Studies on the formation of the abnormal myelin sheath. *J Neurol Sci* 25: 415-448

Maehama T, Dixon JE (1998): The Tumor Suppressor, PTEN/MMAC1, Dephosphorylates the Lipid Second Messenger, Phosphatidylinositol 3,4,5-Trisphosphate. *J Biol Chem* 273(22): 13375-13378

Marone R, Cmiljanovic V, Giese B, Wymann MP (2008): Targeting phosphoinositide 3-kinase – Moving towards therapy. *Biochim Biophys Acta* 1784: 159-185

Maurel P, Salzer JL (2000): Axonal Regulation of Schwann Cell Proliferation and Survival and the Initial Events of Myelination Requires PI 3-Kinase Activity. *J Neurosci* 20(12): 4635-6732

Meyer zu Hörste G: Therapeutische Anwendung des Progesteronantagonisten "Onapriston" im transgenen Rattenmodell der Charcot-Marie-Tooth-Erkrankung Typ 1A (CMT1A). Med.Diss.Göttingen 2005

Michailov GV, Sereda MW, Brinkmann BG, Fischer TM, Haug B, Birchmeier C, Role L, Lai C, Schwab MH and Nave KA (2004): Axonal Neuregulin-1 Regulates Myelin Sheath Thickness. *Science* 304: 700-703

Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK, Ruth P, Schäfer-Korting M: Arzneimittelwirkungen kompakt, Basiswissen Pharmakologie/Toxicologie. 2. Auflage; Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart 2006

Myers MP, Pass I, Batty IH, van der Kaay J, Stolarov JP, Hemmings BA, Wigler MH, Downes CP, Tonks NK (1998): The lipid phosphatase activity of PTEN is critical for its tumor suppressor function. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 13513-13518

Nave K-A, Salzer JL (2006): Axonal regulation of myelination by neuregulin 1. *Curr Opin Neurobiol* 16: 492-500

Nave K-A, Sereda MW, Ehrenreich H (2007): Mechanisms of Disease: inherited demyelinating neuropathies – from basic to clinical research. *Nat Clin Pract Neurol* 3(8): 453-464

Neshat MS, Mellinghoff IK, Tran C, Stiles B, Thomas G, Petersen R, Frost P, Gibbons JJ, Wu H, Sawyers CL (2001): Enhanced sensitivity of PTEN-deficient tumors to inhibition of FRAP/mTOR. *Proc Natl Acad Sci USA* 98(18): 10314-10319

Neuhaus P; Klupp J and Langrehr JM (2001): mTOR Inhibitors: An Overview. *Liver Transpl* 7(6): 473-484

Niemann A, Berger P und Suter U (2006): Pathomechanisms of Mutant Proteins in Charcot-Marie-Tooth Disease. *Neuromolecular Med* 8: 217-241

Nowak DA, Trost HA (2002): Lhermitte-Duclos disease (dysplastic cerebellar gangliocytoma): a malformation, hamartoma or neoplasm? *Acta Neurol Scand* 105: 137-145

Ogata T, Iijima S, Hoshikawa S, Miura T, Yamamoto S, Oda H, Nakamura K and Tanaka S (2004): Opposing Extracellular Signal-Regulated Kinase and Akt Pathways Control Schwann Cell Migration. *J Neurosci* 24(30): 6724-6732

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

Pilarski R (2009): Cowden Syndrome: A Critical Review of the Clinical Literature. *J Genet Counsel* 18: 13-27

Podsypanina K, Lee RT, Politis C, Hennessy I, Crane A, Puc J, Neshat M, Wang H, Yang L, Gibbons J et al. (2001): An inhibitor of mTOR reduces neoplasia and normalizes p70/S6 kinase activity in *Pten*^{+/-} mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 98(18): 10320-10325

Raine CS: Morphology of Myelin and Myelination; in: *Myelin*; hrsg. v. Morell P; 2. Auflage; Plenum Press, New York 1984, 1-50

Ritchie JM: Physiological Basis of Conduction in Myelinated Nerve Fibres; in: *Myelin*; hrsg. v. Morell P; Plenum Press, New York 1984, 117-145

Sander S, Ouvrier RA, McLeod JG, Nicholson GA, Pollard JD (2000): Clinical Syndromes associated with Tomacula or Myelin Swellings in Sural Nerv Biopsies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 68: 483-488

Sansal I, Sellers WR (2004): The Biology and Clinical Relevance of the PTEN Tumor Suppressor Pathway. *J Clin Oncol* 22(14): 2954-2963

Sereda MW, Griffiths I, Püllhofer A, Stewart H, Rossner MJ, Zimmermann F, Magyar JP, Schneider A, Hund E, Meinck H-M et al. (1996): A Transgenic Rat Model of Charcot-Marie-Tooth Disease. *Neuron* 16: 1049-1060

Sereda MW, Meyer zu Hörste G, Suter U, Uzma N, Nave K-A (2003): Therapeutic administration of progesterone antagonist in a model of Charcot-Marie-Tooth disease (CMT-1A). *Nat Med* 9: 1533-1537

Skre H (1974): Genetic and clinical aspects of Charcot-Marie-Tooth's disease. *Clin Genet* 6(2): 98-118

Stambolic V, Suzuki A, delaPompa JL, Brothers GM, Mirtsos C, Sasaki T, Ruland J, Penninger JM, Siderovski DP, Mak TW (1998): Negative Regulation of PKB/AKT-Dependent Cell Survival by the Tumor Suppressor PTEN. *Cell* 95: 29-39

Stiles B, Groszer M, Wang S, Jiao J, Wu H (2004): PTENless means more. *Dev Biol* 273: 175-184

Suter U (2007): Phosphoinositides and Charcot-Marie-Tooth disease: New keys to old questions. *Cell Mol Life Sci* 64: 3261-3265

Suter U, Scherer SS (2003): Disease Mechanisms in Inherited Neuropathies. *Nat Rev Neurosci* 4: 714-726

Taveggia C, Zanazzi G, Petrylak A, Yano H, Rosenbluth J, Einheber S, Xu X, Esper RM, Loeb JA, Shrager P et al (2005): Neuregulin-1 Type III Determines the Ensheathment Fate of Axons. *Neuron* 47: 681-694

Thomas FP, Lebo RV, Rosoklija G, Ding XS, Lovelace RE, Latov N, Hays AP (1994): Tomaculous neuropathy in Chromosome 1 Charcot-Marie-Tooth syndrome. *Acta Neuropathol* 87 (1): 91-97

Voyvodic JT (1989): Target size regulates caliber and myelination of sympathetic axons. *Nature* 342: 430-433

Waxman SG (1997): Axon-glia interactions: Building a smart nerve fibre. *Curr Biol* 7(7): 406-410

Weischer M, Röcken M and Berneburg M (2007): Calcineurin inhibitors and rapamycin: cancer protection or promotion? *Exp Dermatol* 16: 385-393

Zalc D, Fields RD (2000): Do Action Potentials Regulate Myelination? *Neuroscientist* 6(1): 5-13

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. rer. nat. K.-A. Nave für sein mir entgegengebrachtes Vertrauen, für die wissenschaftliche Konzeption der Arbeit und seine Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. med. T. Moser danke ich für die Organisation und Vertretung der Arbeit.

Für die Betreuung und die, wenn nötig, motivierende und umfassende Hilfe bei der Umsetzung der Arbeit danke ich Frau Dr. S. Goebbels.

Ich danke den Kollegen der Abteilung Neurogenetik des Max-Planck-Instituts, Göttingen für die fachlichen Gespräche, Diskussionen und Anregungen. Mein besonderer Dank geht dabei an Jan H. Oltrogge, Robert Kemper, Alexander Pieper, Bettina Weege, und Ingo Bormuth.

Für ihr immer offenes Ohr für Fragen zur Laborarbeit in jeder Hinsicht und für Ihre vielfältige Unterstützung, vor allem für die Genotypisierung der verwendeten Versuchstiere, danke ich Ulrike Bode.

Torben Ruhwedel und Frau Dr. W. Möbius danke ich für ihre Unterstützung bei der Arbeit am Elektronenmikroskop.

An Daniel Rhode geht mein Dank für die Hilfe bei der Durchführung der Rapamycininjektionen und der Pflege der Versuchstiere.

Lebenslauf

Ich wurde am 20. Februar 1975 in Merseburg geboren. Am 28. Juni 1991 erlangte ich die mittlere Reife an der allgemeinbildenden Oberschule „Bertolt Brecht“ in Zöschen. Im Anschluss begann ich eine Ausbildung zur Floristin, welche ich am 14. Juni 1994 vor der Industrie- und Handelskammer Halle-Dessau mit dem ‚Facharbeiter‘ abschloss. Während meiner Arbeit als Floristin absolvierte ich eine Meisterausbildung am Deutschen Institut für Floristik in Dresden. Von der Industrie- und Handelskammer Dresden erhielt ich am 19. Juni 1998 den Meisterbrief. Im September 2000 begann ich eine erweiterte schulische Ausbildung an der Schule des zweiten Bildungsweges (Abendgymnasium – Kolleg) in Halle/Saale zur Erlangung der allgemeinen Hochschulreife, welche ich am 05. Juli 2003 erworben habe.

Zum Wintersemester 2003/04 begann ich mein Humanmedizinstudium an der Georg-August-Universität in Göttingen. Den ersten Abschnitt der ärztlichen Prüfung habe ich am 05. September 2005 und den zweiten Abschnitt der ärztlichen Prüfung am 06. November 2009 erfolgreich abgeschlossen. An der Verwaltungs- und Wirtschafts-Akademie Göttingen absolvierte ich seit dem Wintersemester 2005/06 simultan zum Humanmedizinstudium einen insgesamt 6-semesterigen Studiengang zur Gesundheits-Betriebswirtin (VWA). Am 26. September 2008 erhielt ich nach erfolgreichem Abschluss das Wirtschafts-Diplom betriebswirtschaftlicher Fachrichtung mit dem Schwerpunkt Gesundheitsmanagement. Das Thema meiner Abschlussarbeit im Rahmen meines gesundheitsbetriebswirtschaftlichen Studiums lautet: „Die besondere Bedeutung des Change Managements beim Wandel des Krankenhauses von der bürokratischen Organisation zur wettbewerbs- und zukunftsorientierten Organisation“. Seit dem Wintersemester 2009/10 studiere ich an der Georg-August-Universität in Göttingen Zahnmedizin.

Meine wissenschaftliche Arbeit begann ich im Juni 2006 in der Abteilung für Neurogenetik unter der Leitung von Prof. Dr. rer. nat. K.-A. Nave am Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin in Göttingen, wo ich die Untersuchungen im Rahmen meiner Promotion zu dem Thema „Einfluss von Rapamycin auf Myelinmissbildungen in einem Mausmodell einer tomakulösen Neuropathie“ durchführte. Die dabei erhobenen Daten und gewonnenen Erkenntnisse werden in folgende Veröffentlichungen einfließen:

Goebbels S*, Oltrogge JH*, Kemper R*, Heilmann I, Wichert S, Bormuth I, **Wolfer S**, Möbius W, Lappe-Siefke C, Rossner MJ, Groszer M, Suter U, Fram J, Boretius S, and Nave K-A: Elevated phosphatidylinositol 3,4,5 trisphosphate in glia triggers cell autonomous membrane wrapping and myelination. Eingereicht beim Journal of Neuroscience am 13.01.2010, Manuskript-Nummer: JN-RM-0219-10

Goebbels S*, Oltrogge JH*, **Wolfer S**, Pieper A, Ruhwedel T, Nientiedt T, Groszer M, Liu X, Suter U, Sereda MW, and Nave K-A: Elevated levels of phosphatidylinositol-(3,4,5)-trisphosphate cause myelin outfoldings and tomacula in a novel model of peripheral neuropathy. Veröffentlichung in Vorbereitung

*, gleichberechtigte Erstautorenschaft

Göttingen, den 25.01.2010