

Aus der Abteilung für Neurogenetik  
(Direktor: Prof. K.-A. Nave, PhD)  
des Max-Planck-Instituts für experimentelle Medizin  
in Göttingen

---

**Der Einfluss von Neuregulin-1 auf die Remyelinisierung  
im peripheren Nervensystem**

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

vorgelegt von

Ruth Martha Stassart

aus

Aachen

Göttingen 2013

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

I. Berichterstatter: Prof. Dr. med. M.W. Sereda

II. Berichterstatter/in: Prof. Dr. med. M. Simons

III. Berichterstatter/in: Prof. Dr. med. M. Oppermann

Tag der mündlichen Prüfung: 10.09.2013

## INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung.....	9
1.1. Das zentrale und periphere Nervensystem.....	9
1.2. Die Struktur von Myelin und die Myelinisierung im PNS und ZNS .....	10
1.3. Neuregulin-1 und ErbB-Rezeptoren.....	13
1.4. De- und Remyelinisierung im peripheren Nervensystem.....	16
1.5. Zielsetzung und Hypothese der Promotionsarbeit .....	18
2. Material und Methoden .....	19
2.1. Material.....	19
2.1.1. Chemikalien und Reagenzien .....	19
2.1.2. Verbrauchsmaterialien .....	21
2.1.3. Enzyme, Nukleinsäuren und Reaktionskomplettsysteme .....	21
2.1.4. Geräte .....	22
2.1.5. Antikörper .....	23
2.1.6. Oligonukleotide.....	24
2.1.7. Puffer und Lösungen .....	25
2.1.8. Versuchstiere .....	29
2.1.9. Computersoftware .....	30
2.2. Methoden .....	30
2.2.1. Handhabung und Analyse von Versuchstieren .....	30
2.2.2. Histologische Methoden .....	32
2.2.3. Molekularbiologische Methoden.....	36
2.2.4. Proteinbiochemie.....	40
2.2.5. Isolierung und Kultivierung von primären Schwannzellen .....	41
2.2.6. Statistik.....	41
3. Ergebnisse .....	42
3.1. Neuronales Neuregulin-1 verbessert die Remyelinisierung im PNS .....	42
3.2. Schwannzellen exprimieren NRG1 Typ I nach einer Nervenschädigung .....	46
3.3. Die Expression von Schwannzell-NRG1 wird durch neuronales NRG1 reguliert.....	48
3.4. Die Rolle von Schwannzell-NRG1 für die Remyelinisierung im PNS .....	49
3.5. Axonales NRG1 Typ I kann den Verlust von Schwannzell-NRG1 nicht kompensieren ..	54

4. Diskussion .....	56
4.1. Schwannzellen reagieren auch nach einer Nervenschädigung auf axonal exprimiertes Neuregulin-1 .....	56
4.2. Schwannzellen exprimieren Neuregulin-1 Typ I nach einer Nervenverletzung .....	56
4.3. Schwannzell-NRG1 beeinflusst die Schwannzell-Redifferenzierung.....	58
4.5. Die Funktion von glialem und neuronalem NRG1 Typ I während der Remyelinisierung.	59
5. Zusammenfassung.....	61
6. Abbildungsverzeichnis .....	63
7. Literaturverzeichnis .....	64

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

A	Ampere
Abb.	Abbildung
ADAM17/ TACE	a disintegrin and metalloprotease 17
AKT	v-Akt-murine thymoma viral oncogene homolog 1
AP-1	activator protein 1
APS	Ammoniumperoxidsulfat
AraC	Cytosine-beta-d Arabinofuranosid
AU	Arbitrary units
BACE	$\beta$ -site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1
bp	Basenpaare
BPE	Bovine pituitary extract
BRN2	POU domain, class 3, transcription factor 2
BSA	Bovines Serumalbumin
ca.	circa
cDNA	komplementäre DNA
$C_6H_5Na_3O_7$	Natriumcitrat
CIP	Alkalische Phosphatase
CRD	Cystein-reiche-Domäne
CREB	cAMP response element binding
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
Ct	Threshold cycle
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAPI	4,6-Diamino-2-phenylindol
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
DDSA	2-Duodecenyyl-succinicacidanhydrid
DDT	Dichlordiphenyltrichlorethan
Dhh	desert hedgehog
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMP30	2,4,6-tris-dimethylaminomethyl-Phenol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosid-Triphosphate
DTT	1,4-Dithiotreitol
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	epidermal growth factor
EGR2	early growth response 2
EM	Elektronenmikroskop
ErbB	erythroblastic leukemia viral oncogene homolog

---

ERK	extracellular signal regulated kinase
f.c.	final concentration
FCS	Fötale Kälberserum
Fwd	Forward, Forwärtsprimer
g	Gravitationskonstante
g	gramm
GPR126	G-coupled-protein 126
h	Stunde
H <sub>2</sub> O	Wasser
HBSS	Hanks Balanced Salts Solution
HCl	Salzsäure
Hmgcr	3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme-A-reductase
HRP	Horseradish peroxidase
Ig	Immunglobulin
IGF1	insuline-like growth factor 1
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
kDa	kilo Dalton
kg	Kilogramm
KHCO <sub>3</sub>	Kaliumhydrogencarbonat
KI67	antigen identified by monoclonal antibody Ki 67
l	Liter
M	molar
μ	Mikro
μl	Mikroliter
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MBP	myelin basic protein
mg	Milligramm
μg	Mikrogramm
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
μm	Mikrometer
μM	Mikromolar
MNA	Methylnorbornen-2,3-dicarboxyl-anhydrid
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
mRNA	messenger RNA, Boten-Ribonukleinsäure
N.	Nervus
n	Anzahl

---

n	Nano
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumhydrogencarbonat
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *2 H <sub>2</sub> O	Dinatriumhydrogenphosphat-2-hydrat
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> *2 H <sub>2</sub> O	Natriumdihydrogenphosphat-hydrat
NaOH	Natriumhydroxid
NaI	Natriumiodid
NFAT	nuclear factor of activated T-cells
NFKB	nuclear factor kappa B
ng	Nanogramm
NRG1	Neuregulin-1
n.s.	nicht signifikant
OsO <sub>4</sub>	Osmiumtetroxid
p	Wahrscheinlichkeit
PAX3	paired box gene 3
PBS	Phosphatpuffer
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PI <sub>3</sub> K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PLL	Poly-L-Lysin
P0/MPZ	myelin protein zero
PNS	Peripheres Nervensystem
POU3F1	POU domain, class 3, transcription factor 1
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Ras	rat sarcoma superfamily
Rev	Reverse, Rückwertsprimer
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkriptase
s	Sekunde
S100	S100 calcium binding protein A1
SC	Schwanzzelle
Scap	Sterol regulatory element-binding protein cleavage activating protein
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfat
SOX2	SRY-box containing gene 2
SOX10	SRY-box containing gene 10
TAE	Tris/Acetat Puffer
Tg	Transgen

Thy1	thymus cell antigen 1
tRNA	transfer RNA
U	Units, Enzymeinheit
UV	ultraviolett
V	Volt
Wt	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem
z.B.	zum Beispiel

## 1. EINLEITUNG

### 1.1. DAS ZENTRALE UND PERIPHERE NERVENSYSTEM

Der Begriff Nervensystem bezeichnet zwei spezialisierte Zelltypen, Neurone sowie Gliazellen, die in einem komplexen Zusammenspiel der Informationsaufnahme, -verarbeitung und -übertragung dienen. Bis auf einige Ausnahmen (z.B. Schwämme) weisen die meisten vielzelligen Organismen Nervensysteme auf. Die primitivste Form eines Nervensystems besitzen Hohltiere, darunter die Nesseltiere (Cnidaria). Hier ist das Nervensystem durch ein einfaches, diffuses Nervennetz charakterisiert, welches keine Zentralisierung in Form einer Gehirnausbildung (Cephalisierung) aufweist, obwohl einfache Sinnesorgane vorliegen können (Campbell und Reece 2003).

Die Nervensysteme von Wirbeltieren sind dagegen durch eine ausgeprägte Cephalisierung gekennzeichnet, und lassen sich in ein zentrales sowie ein peripheres Nervensystem unterteilen. Das zentrale Nervensystem (ZNS) bezeichnet Gehirn und Rückenmark, während das periphere Nervensystem (PNS) alle neuronalen Strukturen außerhalb des ZNS umfasst (Campbell und Reece 2003). Weiterhin differenziert man sowohl im ZNS als auch im PNS ein somatisches von einem vegetativen Nervensystem (Trepel 1999). Das somatische Nervensystem dient der willkürlichen Kommunikation zwischen Organismus und Umwelt, wie z.B. der Innervation der Skelettmuskulatur. Dagegen arbeitet das vegetative Nervensystem überwiegend unbewusst, und reguliert die Funktionen der inneren Organe (Trepel 1999).

Die Hauptaufgaben des Nervensystems sind die Informationsaufnahme durch sensorische Endorgane, die Verarbeitung der Informationen im zentralen Nervensystem sowie die Ausbildung einer Antwort (wie zum Beispiel einer motorischen Reaktion) auf die empfangenen und verarbeiteten Reize (Campbell und Reece 2003). Das Nervensystem ermöglicht alle Aspekte unseres Bewusstseins sowie der Wahrnehmung, und steuert unser Verhalten (Campbell und Reece 2003).

Die kleinste strukturelle und funktionelle Einheit des Nervensystems stellt die Nervenzelle, das Neuron, dar. Dieses besteht aus einem Zellkörper (Perikaryon) und einerseits aus impulsempfangenden (afferenten) Fortsätzen, den Dendriten, sowie einem impulsweiterleitenden (efferenten) Fortsatz, dem Axon (Welsch 2003). Am distalen Axonende finden sich terminale Aufzweigungen, die synaptischen Endknöpfchen (Trepel 1999). Zusammen mit der nachfolgenden Zelle bilden diese eine sogenannte Synapse, an welcher die Erregungsüberleitung von einer Nervenzelle zur nächsten mit Hilfe chemischer Substanzen (Transmitter) stattfindet (Trepel 1999).

Die zweite Zellpopulation des Nervensystems sind Gliazellen, die auch bereits bei einfachen Organismen wie Anneliden oder Arthropoden in engem Kontakt zu Neuronen und ihren Fortsätzen stehen (Eckert et al. 2002). Im Rahmen der Evolution ist die Anzahl der Gliazellen



im Nervensystem deutlich angestiegen, so dass beim Menschen ungefähr zehnmal mehr gliale als neuronale Zellen zu finden sind (Welsch 2003).

Gliazellen entstehen, ebenso wie Neurone, aus der ektodermalen Anlage des Nervensystems. Eine Ausnahme stellen die Mikrogliazellen dar, die sich aus dem Mesoderm entwickeln (Welsch 2003). Die Gliazellen des zentralen Nervensystems bilden sich im Neuralrohr, wogegen die periphere Glia aus der Neuralleiste entsteht (Welsch 2003). Zu den Gliazellen des zentralen Nervensystems werden Astrozyten, Mikroglia und Oligodendrozyten gezählt. Die peripheren Gliazellen sind die Schwannzellen (Welsch 2003).

Astrozyten sind reichverzweigte, oft sternförmig erscheinende Zellen, die je nach Gehirnregion unterschiedliche Morphologien und Funktionen ausbilden können (Protoplasmatische und Fibrilläre Astrozyten) (Oberheim et al. 2012). Während der Entwicklung spielen Astrozyten eine wichtige Rolle für die korrekte Migration von Neuronen (Haberland 2007). Zudem sind Astrozyten wichtig für den Schutz von Neuronen vor z.B. exzitotoxischen Neurotransmittern, für den Austausch von verschiedenen Energiemetaboliten mit Neuronen und ihrer Umgebung, wie auch für die Homöostase im Extrazellularraum (Oberheim et al. 2012). Astrozyten sind außerdem an der Ausbildung der Blut-Hirnschranke mitbeteiligt (Haberland 2007).

Mikroglia stellen die residenten Immunzellen des zentralen Nervensystems dar, und werden oft als die Makrophagen des ZNS bezeichnet (Hanisch und Kettenmann 2007). Mikroglia sind stark verzweigte Zellen und ihre Fortsätze zeichnen sich durch eine hohe Beweglichkeit aus. Sie überprüfen ihre Umgebung hinsichtlich potentieller Pathogene, und ein Kontakt mit einem Pathogen führt zu einer Aktivierung der Mikrogliazelle. Mikroglia können phagozytieren und verschiedenste proinflammatorische Moleküle bilden (Hanisch und Kettenmann 2007, Rivest 2009). Neuere Studien zeigen jedoch, dass Mikroglia in ihren Antworten auf pathologische Stimuli sehr viel vielfältiger reagieren als früher angenommen, und sowohl neuroprotektiv wie auch neurotoxisch wirken können (Hanisch und Kettenmann 2007).

Oligodendrozyten im ZNS und Schwannzellen im PNS umgeben die Axone entlang ihres Verlaufes vom neuronalen Zellkörper bis hin zur Synapse. Zudem können beide Gliazellen als sogenannte Satellitenzellen das Neuron selbst umringen. Oligodendrozyten und Schwannzellen bilden um Axone überhalb eines bestimmten Durchmessers eine Isolierschicht, das Myelin. Kleine Axone werden dagegen nur von glialem Zytoplasma sowie der glialen Zellmembran umgeben (Griffin und Thompson 2008). Unabhängig von ihrer Rolle als Myelin bildende Zellen kommen Oligodendrozyten und Schwannzellen auch wichtige „Unterstützungsfunktionen“ für die Integrität und den Erhalt von Axonen zu (Nave 2010).

## **1.2. DIE STRUKTUR VON MYELIN UND DIE MYELINISIERUNG IM PNS UND ZNS**

Eine von Gliazellen gebildete Myelinschicht um das Axon kennzeichnet Vertebraten, wenn auch einzelne Invertebraten Myelin-ähnliche Strukturen aufweisen (Nave 2010). Die Evolution von Myelin war die Voraussetzung für die Entwicklung höherer kortikaler Funktionen, da sie eine deutlich schnellere Impulsweiterleitung auf kleinerem Raum ermöglichte. Als erstes hat die

Ausbildung von Myelin höchstwahrscheinlich in einem Fisch, dem Plakoderm, stattgefunden (Nave 2010).

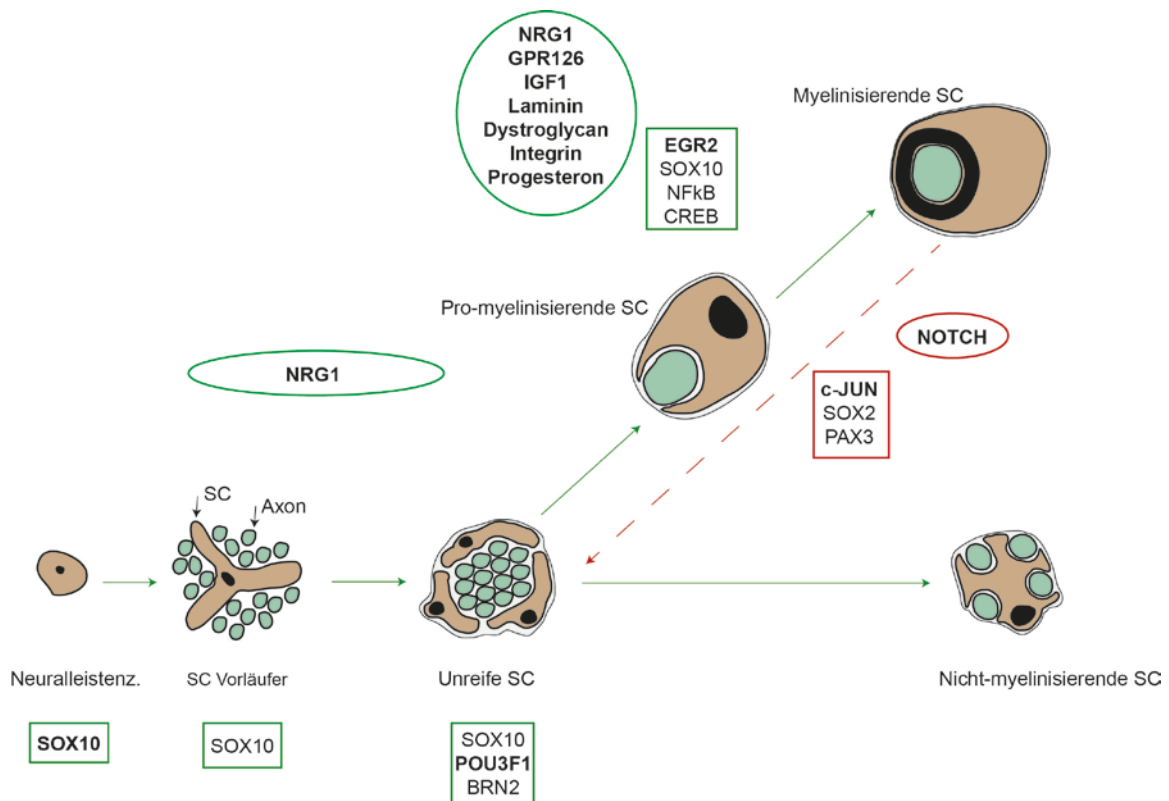
Die schnelle Impulsweiterleitung myelinisierter Axone ist die Folge der saltatorischen Erregungsleitung (Bähr et al. 2003). Jede Gliazelle ummantelt nur einen bestimmten Abschnitt (Internodium) eines Axons. Zwischen zwei myelinisierten Abschnitten entsteht ein nicht isolierter Zwischenraum, der Ranvier-Schnürring. Hier findet sich eine hohe Dichte spannungsabhängiger Ionenkanäle (Campbell und Reece 2003). Da die Myelinschicht den elektrischen Widerstand des Axons stark erhöht, kommt es nur im Bereich der Ranvier-Schnürringe zu der Ausbildung einer Depolarisation (Bähr et al. 2003). Die Aktionspotentiale „springen“ somit von Schnürring zu Schnürring und müssen nicht kontinuierlich entlang des Axons (wie bei kleinen unmyelinisierten Axonen) fortgeleitet werden. Während die Oligodendrozyte im zentralen Nervensystem bis zu fünfzig Internodien verschiedener Axone myelinisieren kann, ummantelt die Schwannzelle jeweils nur einen Abschnitt eines einzigen Axons (sog. 1:1 Verhältnis von Schwannzelle und Axon), (Peters et al. 1991).

Die Dicke der Myelinschicht ist proportional zum Axondurchmesser. Somit sind Axone mit einem kleinen Durchmesser von einer dünnen Myelinschicht umgeben, während große Axone eine verhältnismäßig dickere Myelinschicht aufweisen. Dieses Verhältnis wird durch das *g-ratio* (Axondurchmesser / Gesamtdurchmesser der Faser (Axon + Myelin)) ausgedrückt (Friede und Bischhausen 1982).

Das Myelin besteht zum größten Anteil (ca. 70%) aus Lipiden (hiervon die Hälfte Cholesterin) und zu ungefähr dreißig Prozent aus Proteinen (Simons und Trotter, 2007, Quarles et al. 2006). Das von Oligodendrozyten und Schwannzellen gebildete Myelin ist grundsätzlich gleich aufgebaut, wenn auch die biochemische Zusammensetzung leicht verschieden ist (Quarles et al. 2006). Im zentralen Nervensystem ist das häufigste Myelinprotein das Proteolipidprotein (PLP), gefolgt vom Myelin-Basischen-Protein (MBP). Im peripheren Nervensystem stellt das Myelinprotein Zero (P0) den grössten Proteinanteil dar (Quarles et al. 2006). Der Aufbau der Myelinscheide erfordert eine sehr ausgeprägte Lipid- (und Protein)biosynthese in Gliazellen, gefolgt von dem Transport der einzelnen Bausteine an die Zelloberfläche und dem konzertierten Einbau in die Myelinschicht (Simons und Trotter 2007). In Säugetieren erfolgt die Myelinisierung überwiegend postnatal, und schreitet bis in das frühe Erwachsenenalter fort (Nave 2010).

Myelinisierende und nicht-myelinisierende Schwannzellen aller spinalen Nerven entstehen aus der Neuralleiste (Mirsky et al. 2008). Die Reifung von Schwannzellen erfordert drei Hauptentwicklungsschritte (**Abb. 1**; Mirsky et al. 2008). Zunächst entstehen aus migrierenden Neuralleistenzellen Schwanzzellvorläuferzellen (Mirsky et al. 2008). Diese entwickeln sich zwischen Embryonaltag 15-17 in unreife Schwannzellen, die zunächst weiter stark proliferieren (Jessen und Mirsky 2005). Der Austritt aus dem Zellzyklus ist die Voraussetzung für die nachfolgende Differenzierung in reife Schwannzellen. Vor Beginn der Myelinisierung müssen Schwannzellen die in Bündeln liegenden Axone separieren, und ein 1:1-Verhältnis mit einem Axon herstellen (Jessen und Mirsky 2005). Nicht myelinisierende Schwannzellen umgeben mehrere kleine Axone in sogenannten Remak-Bündeln.

Während ihrer Entwicklung sind Schwannzellen immer eng mit axonalen Strukturen assoziiert, und axonal exprimierte Faktoren (s.u.) tragen entscheidend zu der Regulation der Schwannzellentwicklung in allen drei Differenzierungsstadien bei (**Abb. 1**; Jessen und Mirsky 2005). Schwannzellen exprimieren während ihrer Entwicklung verschiedene molekulare Marker (wie z.B. Transkriptionsfaktoren), mit deren Hilfe man die einzelnen Reifungsstadien charakterisieren kann (**Abb. 1**; Jessen und Mirsky 2005).



**Abb. 1: Die Entwicklung von Schwannzellen im peripheren Nerv.** Schwannzellen (SC) entwickeln sich aus Neuralleistenzellen in 3 Hauptentwicklungsschritten in reife, myelinbildende Zellen. In der Abb. dargestellt ist eine Auswahl der an der SC-Entwicklung beteiligten Transkriptions- (eckige Kästen) und extrinsischen Faktoren (ovale Kästen). Die Entstehung von SC-Vorläuferzellen erfordert den Transkriptionsfaktor SOX10, der auch für die weitere SC-Reifung wichtig bleibt (Mirsky et al. 2008). Für das Überleben der Vorläuferzellen sowie die Bildung von unreifen Schwannzellen ist axonal exprimiertes Neuregulin-1 (NRG1) essentiell. Unreife SC exprimieren neben SOX10 die Transkriptionsfaktoren POU3F1 und BRN2, die in die weitere SC-Reifung und die zeitliche Kontrolle des Myelinisierungsvorgangs involviert sind (Mirsky et al. 2008). Für die Reifung in myelinisierende SC ist der Transkriptionsfaktor EGR2 essentiell, weitere wichtige Transkriptionsfaktoren sind zudem NFkB und CREB (Mirsky et al. 2008). Neben NRG1, welches sowohl das Myelinisierungsschicksal von SC als auch die Regulation der Myelindicke kontrolliert, sind zahlreiche weitere extrinsische Faktoren identifiziert worden, die für die Entwicklung der unreifen in reife SC wesentlich sind (Taveggia et al. 2010). Unter anderem sind dies der Rezeptor GPR126 (*G-coupled-protein 126*), der extrazelluläre Faktor IGF1 (*Insuline-like growth factor 1*), Komponenten der extrazellulären Matrix wie Laminin, Dystroglycan und Integrin sowie das Hormon Progesteron (Taveggia et al. 2010, Stassart et al. 2012). Nach einer Nervenverletzung dedifferenzieren Schwannzellen und entwickeln sich zurück in unreife, proliferierende Zellen. Die Dedifferenzierung von Schwannzellen wird von dem Transkriptionsfaktor c-Jun reguliert, weiterhin beteiligt sind die Transkriptionsfaktoren SOX2 und PAX3. Der Rezeptor NOTCH inhibiert die Myelinisierung von SC und wird in dedifferenzierten SC induziert (Mirsky et al. 2008). Abbildung adaptiert von Jessen und Mirsky (2005), S. 673.

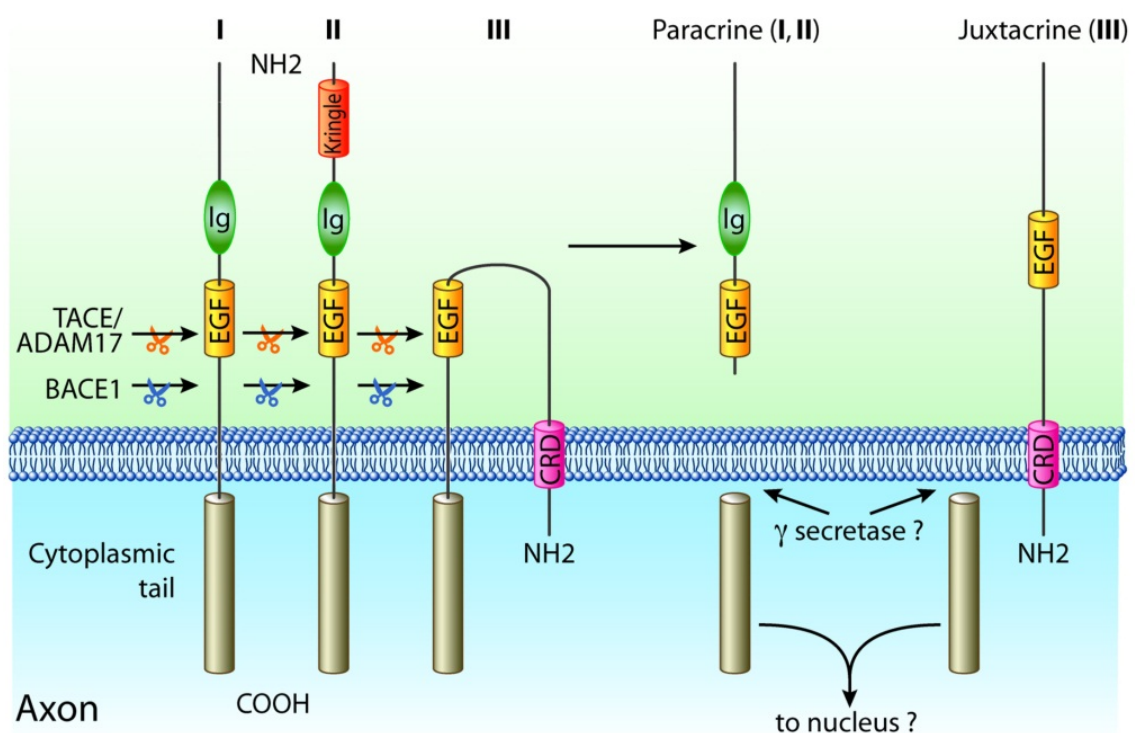
Oligodendrozyten entstehen aus der Subventrikularzone im Telencephalon und entwickeln sich zunächst zu Oligodendrozytenvorläuferzellen, die proliferieren und in alle Regionen des ZNS migrieren (Emery 2010b). Anschließend differenzieren die Vorläuferzellen in postmitotische Zellen, sogenannte promyelinisierende Oligodendrozyten. Diese bilden einen engen Kontakt zu benachbarten Nervenfasern aus, um nach einer terminaler Reifung die Axone zu myelinisieren (Emery 2010a). Im Gegensatz zur Schwannzellentwicklung wird die Oligodendrozyten-differenzierung hauptsächlich von einem intrinsischen Netzwerk zahlreicher Transkriptionsfaktoren reguliert, und ist weniger abhängig von axonalen und extrazellulären Faktoren (Emery 2010b). Obwohl in den letzten Jahren einige extrinsische Faktoren (z.B. die axonale elektrische Aktivität) identifiziert worden sind, welche die Oligodendrozyten-differenzierung mitregulieren, sind bisher keine spezifischen axonalen Faktoren bekannt, die die Myelinisierung sowie die Myelindicke im ZNS kontrollieren (Emery 2010a; Taveggia 2010).

### 1.3. NEUREGULIN-1 UND ERBB–REZEPTOREN

Neuregulin-1 gehört zu einer Gruppe von Wachstumsfaktoren, die wichtige Zell-Zell-Interaktionen für die Entwicklung sowie die Funktion verschiedener Organe wie Lunge, Herz und Nervensystem medieren (Falls 2003). Neuregulin-1 wird von einem der größten menschlichen Gene kodiert (ca 1.4 Megabasen), welches auf dem kurzen Arm von Chromosom acht lokalisiert ist (Falls 2003). Durch alternatives Spleißen und die Aktivierung verschiedener Promotoren können mehr als sechzehn verschiedene Neuregulin-1-Isoformen entstehen (Falls 2003). Allen Neuregulin-1-Isoformen gemeinsam ist eine EGF (epidermal growth factor)-ähnliche Domäne (Falls 2003). Diese ist essentiell und alleine ausreichend für die Aktivierung der entsprechenden Rezeptoren aus der Gruppe der ErbB-Rezeptor-Tyrosinkinasen (Falls 2003). Anhand der N-terminalen Struktur werden die Neuregulin-1-Isoformen aktuell in sechs verschiedene Klassen eingeordnet (Nave und Salzer 2006). In den letzten fünfzehn Jahren wurden im Nervensystem insbesondere die Isoformen I – III in einer Vielzahl von Studien *in vitro* und *in vivo* untersucht (Falls 2003, Nave und Salzer 2006, Taveggia et al. 2010). Alle Isoformen werden zunächst als Transmembranproteine synthetisiert, welche dann durch Proteasen prozessiert und von der Zellmembran abgetrennt werden können (Falls 2003, Newbern und Birchmeier 2010, Stassart et al. 2012). Neuregulin-1 Typ I und II weisen eine Transmembrandomäne auf und sind zudem durch eine Immunglobulin ähnliche Domäne gekennzeichnet (Falls 2003; **Abb.2**). Die Typ-III-Isoform ist dagegen zweifach in der Zellmembran verankert, und muss daher mehrmals prozessiert werden, um von der Membran abgetrennt zu werden (Falls 2003, Stassart et al. 2012, **Abb. 2**).

Neuregulin-1 Typ III wird im Nervensystem hauptsächlich von Neuronen exprimiert, obgleich auch gliale Zellen Neuregulin-1 Typ III synthetisieren können (Nave und Salzer 2006). Mausmutanten mit einer fehlenden Expression von Neuregulin-1 Typ III sterben kurz nach der Geburt, da Entwicklungsdefekte der neuromuskulären Endplatte eine korrekte Innervation der Atemmuskulatur verhindern (Wolpowitz et al. 2000, Falls 2003). Zudem weisen diese Tiere eine deutlich reduzierte Anzahl spinaler Motoneurone und sensorischer Nervenzellen sowie eine

Degeneration der Hirn- und Spinalnerven auf (Wolpowitz et al. 2000, Falls 2003). Weiterhin zeigen Neuregulin-1-Typ-III-defiziente Mäuse einen fast vollständigen Verlust von Schwanzzell-Vorläuferzellen (Wolpowitz et al. 2000, Falls 2003). Diese und zahlreiche weitere Studien belegen, dass Neuregulin-1 alle drei Stadien der Schwanzzellentwicklung entscheidend reguliert (**Abb. 1**; Falls 2003, Birchmeier und Nave 2008, Newbern und Birchmeier 2010). Während der Embryonalentwicklung kontrolliert Neuregulin-1 Typ III zunächst die Proliferation und Migration von Schwanzzell-Vorläuferzellen, um anschließend als Differenzierungsfaktor die weitere Reifung der Schwanzzelle zu determinieren (Birchmeier und Nave 2008).



**Abb.2: Die Struktur der Neuregulin-1-Isoformen Typ I – III.** Die Neuregulin-1-Isoformen Typ I-III werden als Transmembranproteine synthetisiert und auf der axonalen Oberfläche exprimiert. Die einzelnen Isoformen unterscheiden sich im Bereich ihrer N-Termini, weisen jedoch alle eine EGF-ähnliche Domäne auf, die essentiell für die Aktivierung der ErbB-Rezeptoren auf der glialen Oberfläche ist (Falls 2003). Während Typ I und II eine Immunglobulin (Ig)-ähnliche Domäne aufweisen und nur einfach in der Membran verankert sind, zeichnet sich die Typ-III-Isoform durch eine Cystein-reiche-Domäne (CRD) aus, die eine zweite Transmembrandomäne darstellt (Falls 2003). Die proteolytische Spaltung durch die Sekretase BACE aktiviert alle 3 Isoformen, führt aber nur bei Typ I und II zu einer Ablösung des N-terminalen Bereiches von der Zellmembran, und somit zu einem parakrinen Signal (Taveggia et al. 2010). Die Prozessierung durch die TACE/ADAM17 dagegen inhibiert das Neuregulin-1-Signal (Taveggia et al. 2010). Die intrazelluläre Domäne kann durch  $\gamma$ -Sekretasen abgetrennt werden und als retrogrades Signal für das Neuron wirken (Stassart et al. 2012). Abbildung entnommen aus Stassart et al. (2012), S.604 (adaptierte Grafik von Nave und Salzer (2006), S.493).

Die Höhe der axonalen Neuregulin-1-Typ-III-Expression dient als Surrogatmarker für den axonalen Durchmesser und signalisiert der Schwannzelle, welche Fasern myelinisiert werden müssen (Taveggia et al. 2005, Birchmeier und Nave 2008). Eine Mindestexpressionshöhe von Neuregulin-1 Typ III auf der axonalen Oberfläche (physiologisch erreicht bei einem axonalen Durchmesser von 1µm) ist erforderlich, um die Myelinisierung durch Schwannzellen zu initiieren (Taveggia et al. 2005, Birchmeier und Nave 2008). Kleine Axone exprimieren nur geringe Mengen an Neuregulin-1 Typ III und assoziierte Schwannzellen differenzieren somit in nicht myelinisierende Remak-Schwannzellen (Taveggia et al. 2005, Birchmeier und Nave 2008).

Neuregulin-1 Typ III stellt jedoch nicht nur das Schlüsselsignal für die Initiierung der Myelinisierung dar, sondern reguliert auch die Myelindicke (Nave und Salzer 2006, Birchmeier und Nave 2008). Dies konnte mit Hilfe von verschiedenen Mausmutanten bewiesen werden, die unterschiedliche Expressionshöhen von Neuregulin-1 Typ III in Neuronen aufweisen (Michailov et al. 2004). Transgene Tiere mit einer neuronalen Überexpression von Neuregulin-1 Typ III (unter dem Thy1-Promotor) zeigen proportional zum Axondurchmesser eine deutlich dickere Myelinscheide (Michailov et al. 2004). Die Axone von Mäusen mit einer Hemizygotie für Neuregulin-1 Typ III sind dagegen hypomyelinisiert (Michailov et al. 2004).

Die herausragende Rolle von Neuregulin-1 für die Schwannzellentwicklung und die Regulation der Myelinisierung im PNS ist spezifisch für die Typ-III-Isoform (Nave und Salzer 2006, Birchmeier und Nave 2008). Mäuse mit einer neuronalen Überexpression von Neuregulin-1 Typ I zeigen eine unveränderte Myelindicke im PNS (Michailov et al. 2004). Auch ist die Anzahl an Schwannzell-Vorläuferzellen sowie die weitere Schwannzellentwicklung in Mäusen mit einer reduzierten Neuregulin-1-Typ-I-Expression unverändert (Sandrock et al. 1997, Falls 2003). Dagegen zeigen diese Mausmutanten eine reduzierte Entwicklung von Acetylcholinrezeptoren an der neuromuskulären Endplatte (Sandrock et al. 1997, Falls 2003).

Die Rolle von Neuregulin-1 im zentralen Nervensystem ist wesentlich komplexer und weniger gut verstanden (Taveggia et al. 2010). Eine Deletion von Neuregulin-1 in kortikalen Neuronen oder von ErbB-Rezeptoren in Oligodendrozyten beeinflusst nicht die Myelinisierung im ZNS (Brinkmann et al. 2008). Dagegen kann durch eine neuronale Überexpression von Neuregulin-1 Typ III und – im Gegensatz zum PNS – auch von Typ I eine Zunahme der Myelindicke erreicht werden (Brinkmann et al. 2008). Zusammenfassend kann Neuregulin-1 die Myelinisierung im ZNS stimulieren, ist jedoch weder essentiell für die Oligodendrozytendifferenzierung noch für die korrekte Ausbildung der Myelinscheide im ZNS (Stassart et al. 2012, Taveggia et al. 2010).

An der weiteren posttranslationalen Modifikation der membranständigen Neuregulin-1-Isoformen sind Sekretasen beteiligt, die den Aktivierungsstatus von Neuregulin-1 verändern, sowie Neuregulin-1 von der axonalen Membran abspalten können (Stassart et al. 2012, Taveggia et al. 2010). So können aus initial membranständigen Neuregulin-1-Isoformen sekretierte Faktoren entstehen, die im Folgenden parakrin oder autokrin wirken (**Abb.2**; Newbern und Birchmeier 2010, Falls, 2003). In den letzten Jahren sind verschiedene Sekretasen identifiziert worden, die Neuregulin-1 prozessieren (Taveggia et al. 2010, Newbern

und Birchmeier 2010). Die Sekretase BACE-1 (*β-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1*) aktiviert Neuregulin-1 Typ III und fördert die Myelinisierung und Remyelinisierung im PNS (**Abb.2**; Stassart et al. 2012, Taveggia et al. 2010, Newbern und Birchmeier 2010). Die alpha Sekretase ADAM-17 (*a disintegrin and metalloprotease 17*) dagegen inhibitiert die Funktion von Neuregulin-1 Typ III (**Abb.2**; Stassart et al., 2012, Taveggia et al. 2010, Newbern und Birchmeier 2010). Des Weiteren ist die Metalloendopeptidase Nardilysin (N-arginine dibasic convertase) an der Prozessierung von Neuregulin-1 beteiligt (Ohno et al. 2009, Stassart et al. 2012, Taveggia et al. 2010, Newbern und Birchmeier 2010).

Die Aktivierung von auf der Gliazelle sitzenden ErbB-Rezeptoren durch Neuregulin-1 induziert eine Rezeptor-Homo- oder Heterodimerisierung (Nave und Salzer 2006, Falls 2003). Im PNS wird ein Heterodimer aus ErbB2 und 3 gebildet, wobei nur ErbB2 eine Kinasedomäne aufweist, während ausschließlich ErbB3 eine Rezeptorfunktion besitzt (Stassart et al. 2012, Falls 2003). Die wichtigsten nachgeschalteten Signaltransduktionskaskaden sind der PI3K/AKT (*phosphatidylinositole-3-kinase/v-Akt murine thymoma viral oncogene homolog 1*)-Signalweg sowie die Ras/MAPK/ERK (*Ras/mitogen-activated protein kinase/extracellular signal regulated kinase*)-Kaskade und der NFAT (*nuclear factor of activated T cells*)-Calcineurin-Signalweg (Stassart et al. 2012; Taveggia 2010, Newbern und Birchmeier 2010). Die Aktivierung eines oder mehrerer dieser Signalwege führt zu einer Vielzahl zellulärer Antworten in der Gliazelle, die unter anderem Proliferation, Migration und Differenzierung vermitteln (Newbern und Birchmeier 2010). So ist der PI3K/AKT-Signalweg essentiell für die Myelinisierung im gesamten Nervensystem (Taveggia et al. 2010). Eine Aktivierung von ERK1/2 in Mausmutanten fördert die Schwanzzellentwicklung sowie die Myelinisierung im peripheren Nervensystem (Newbern et al. 2011, Newbern und Birchmeier 2010). Der NFAT/Calcineurin-Signalweg ist ebenfalls essentiell für die Schwanzzelldifferenzierung und die Aktivierung der Myelinenexpression im PNS (Kao et al. 2009).

#### **1.4. DE- UND REMYELINISIERUNG IM PERIPHEREN NERVENSYSTEM**

De- und remyelinisierende Prozesse des PNS entstehen als Folge von akuten Nervenverletzungen, z.B. in Folge von Traumen, durch endogene oder exogene toxische Substanzen sowie auch im Rahmen zahlreicher chronischer Erkrankungen, die direkt oder indirekt das Nervensystem betreffen (Jessen und Mirsky 2008, Chen et al. 2007). Das periphere Nervensystem zeichnet sich durch eine erstaunliche Regenerationsfähigkeit aus, die es von den meisten anderen ausgereiften Geweben unterscheidet (Bosse 2012, Chen et al. 2007, Jessen und Mirsky 2008). Jedoch wird eine volle Wiederherstellung der Nervenfunktion selbst nach einer akuten Nervenverletzung selten erreicht (Frostick et al. 1998).

Eine akute Nervenschädigung führt zunächst zu einem als Waller-Degeneration bezeichneten Vorgang (Stoll und Müller 1999). Hierbei degenerieren die Axone distal der Schädigung, während der proximale Nervenanteil intakt bleibt (Chen et al. 2007). Innerhalb von wenigen Stunden kommt es zu einer Fragmentierung der distalen Axone, gefolgt von einem Kollaps der

Myelinscheiden (Bosse 2012). Diese werden zum Teil von Schwannzellen selbst, zum Teil von eingewanderten Makrophagen phagozytiert (Bosse 2012, Stoll und Müller 1999). Parallel beginnen Axone ab dem Schädigungsort wieder neu auszuwachsen, und werden anschließend von Schwannzellen remyelinisiert (Bosse 2012, Chen et al. 2007). Die axonale Regeneration findet mit ca. 3 mm/Tag statt, so dass eine Reinnervation der Zielorgane je nach Distanz innerhalb von einigen Wochen stattfinden kann (Stoll und Müller 1999).

Schwannzellen zeigen während dieses Prozesses der De- und Regeneration eine herausragende Plastizität, und bilden die Basis für eine erfolgreiche Nervenregeneration im PNS (Bosse 2012, Jessen und Mirsky 2008). Schwannzellen reagieren auf eine akute Nervenverletzung und den resultierenden Verlust des axonalen Kontaktes zunächst mit einer Dedifferenzierung, d.h. sie entwickeln sich von einer reifen, ausdifferenzierten Zelle zurück zu einer proliferierenden Vorläuferzelle (Jessen und Mirsky 2008). Gleichzeitig werden Gene induziert, die das axonale Auswachsen und das neuronale Überleben unterstützen, sowie die Makrophageninfiltration in das verletzte Gewebe fördern (Arthur-Farraj et al. 2012, Jessen und Mirsky 2008). Die dedifferenzierten Schwannzellvorläuferzellen lagern sich im Folgenden parallel in sogenannten Büngner-Bändern an, die als eine Art Leitkanäle die Voraussetzung für das korrekte Auswachsen der Axone bilden (Chen et al. 2007).

Die Entwicklung von reifen Schwannzellen zurück zu Vorläuferzellen erfordert die Aktivierung intrazellulärer Faktoren, die als negative Regulationsfaktoren den Prozess der Dedifferenzierung steuern (**Abb. 1**; Jessen und Mirsky 2008). Diese Faktoren sind in der reifen Schwannzelle herunterreguliert, und höchstwahrscheinlich bilden positive und negative Regulationsfaktoren in der Schwannzelle ein Gleichgewicht, welches die Voraussetzung für eine erfolgreiche Myelinisierung darstellt (Jessen und Mirsky 2008). In den letzten Jahren konnten der Transkriptionsfaktor c-Jun sowie der Raf/MEK/ERK-Signalweg als wichtige Regulatoren der Dedifferenzierung von Schwannzellen identifiziert werden (Jessen und Mirsky 2008, Arthur-Farraj et al. 2012, Napoli et al. 2012). Der Transkriptionsfaktor c-Jun ist Teil des AP-1-Transkriptionsfaktorkomplexes und kontrolliert maßgeblich den Dedifferenzierungsprozess nach einem akuten Nervenschaden (Jessen und Mirsky 2008). Mausmutanten mit einer Schwannzell-spezifischen Deletion von c-Jun weisen eine Dysregulation der Waller-Degeneration sowie der Nervenregeneration auf. Die gestörte Schwannzell-Dedifferenzierung in den Mutanten führt unter anderem zu einer fehlerhaften Ausbildung der Büngner-Bänder, verhindert einen korrekten Myelinabbau durch Schwannzellen und Makrophagen und hemmt eine erfolgreiche axonale Regeneration (Arthur-Farraj et al. 2012).

Mit Hilfe von transgenen Mäusen, in welchen der Raf/MEK/ERK-Signalweg spezifisch in reifen Schwannzellen aktiviert wurde, konnte eine wichtige Funktion des ERK-Signalweges in der Dedifferenzierung nachgewiesen werden (Napoli et al. 2012). Eine Aktivierung des Signalweges in transgenen Mäusen ist ausreichend, um einen Dedifferenzierungsphänotyp in Schwannzellen zu induzieren. In den transgenen Tieren kommt es zunächst zu einer Demyelinisierung von Schwannzellen, ohne dass ein axonaler Schaden induziert wurde. Anschließend proliferieren die Schwannzellen und sekretieren proinflammatorische Signale (Napoli et al. 2012). Wird die



Aktivierung des Signalweges beendet, redifferenzieren und remyelinisieren die Schwannzellen in der Folge (Napoli et al. 2012).

Die Redifferenzierung der Schwannzellvorläuferzellen in unreife und schließlich reife, myelinisierende Schwannzellen ähnelt in vieler Hinsicht dem Differenzierungsprozess während der Entwicklung (Jessen und Mirsky 2008). Jedoch ist das Genexpressionsmuster redifferenzierender Schwannzellen nicht identisch mit dem während der Entwicklung, und es ist wahrscheinlich, dass nach einem Nervenschaden spezifische Faktoren exprimiert werden, die den denervierten Schwannzellphänotyp widerspiegeln (Jessen und Mirsky 2008). Bis her sind jedoch nur wenige Faktoren identifiziert worden, die spezifisch die Redifferenzierung von Schwannzellen regulieren (Jessen und Mirsky 2008).

Trotz der Fähigkeit von Schwannzellen, in myelinbildende Zellen zu redifferenzieren, erreicht die neu gebildete Myelinscheide nicht mehr den ursprünglichen Durchmesser (Schröder 1972). Die neu ausgewachsenen Axone bleiben hypomyelinisiert und die Internodienabstände verkürzt (Schröder 1972, Sherman und Brophy 2005, Chen et al. 2007). Die unvollständige Remyelinisierung führt zu einer verringerten Nervenleitgeschwindigkeit und somit zu einer eingeschränkten Funktionsfähigkeit des regenerierten peripheren Nerven (Chen et al. 2007, Bosse 2012).

## **1.5. ZIELSETZUNG UND HYPOTHESE DER PROMOTIONSARBEIT**

Die Ursachen für die unvollständige Remyelinisierung nach einer Nervenverletzung im PNS sind bisher unverstanden. Als mögliche kausale Faktoren werden insbesondere fehlende Stimulationsfaktoren für remyelinisierende Schwannzellen oder inhibitorische Signale diskutiert (Sherman und Brophy 2005). Weiterhin könnten Schwannzellen die Fähigkeit verlieren, auf myelinisierungsinduzierende Faktoren zu reagieren (Sherman und Brophy 2005).

Neuregulin-1 kontrolliert während der Entwicklung alle Stadien der Schwannzellentwicklung und reguliert die Myelindicke im PNS. In dieser Promotionsarbeit wurde die Hypothese verfolgt, dass eine veränderte Neuregulin-1-Expression oder ein dysregulierter Neuregulin-1-Signalweg für die unvollständige Remyelinisierung nach Nervenschaden verantwortlich sein könnte (Sherman und Brophy 2005, Fricker und Bennett 2011).

Vorherige Untersuchungen zu Neuregulin-1 nach einer Nervenschädigung konnten zeigen, dass sich die Funktion des Neuregulin-1 / ErbB-Signalwegs nach einer Nervenverletzung von der während der Entwicklung unterscheidet (Atanoski et al. 2006, Fricker et al. 2011, Fricker und Bennett 2011). So bleibt Neuregulin-1 zwar nach einer Nervenschädigung essentiell für die Myelinisierung im PNS (Fricker et al. 2011), ist aber, im Gegensatz zur Entwicklung, nicht für das Überleben und die Proliferation von Schwannzellen nach einer Nervenverletzung notwendig (Atanoski et al. 2006, Fricker et al. 2011, Fricker und Bennett 2011).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Funktion von neuronal und glial exprimiertem Neuregulin-1 für die Remyelinisierung und die Regeneration des PNS mit Hilfe verschiedener Neuregulin-1-transgener und -mutierter Mauslinien analysiert.

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1. MATERIAL

#### 2.1.1. CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN

Acrylamid	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Agarose	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Amylalkohol	Merck, Darmstadt
Ammoniumperoxiddisulfat (APS)	Merck, Darmstadt
Ammoniumacetat	Merck, Darmstadt
Aqua Poly Mount (Einbettmedium)	Polysciences Inc., Eppelheim
AraC	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Azur-II-Farbstoff	Merck, Darmstadt
Beta-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Bleicitrat	Merck, Darmstadt
Bovines Pituitary Extract (BPE)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Bromphenolblau	International Biotechnology Inc.
BSA (bovines Serumalbumin)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Chloroform	Merck, Darmstadt
Chlorhydrat	Merck, Darmstadt
DAB (3-3'-Diaminobenzidin)	Dako Cytomation, Hamburg
DAPI (4,6-Diamino-2-phenylindol)	Boehringer, Mannheim
DDSA (2-Duodecenyloxy-succinicacidanhydrid)	Serva, Heidelberg
DMP30 (2,4,6-tris-dimethylaminomethyl-Phenol)	Serva, Heidelberg
DTT (1,4-Dithiotreitol)	GibcoBRL, Karlsruhe
EDTA (Ethylendiamintetraacetat)	Merck, Darmstadt
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Eukitt (Einbettmedium)	Kindler GmbH, Freiburg
Fetales Kälberserum (FCS)	PAN Biotech, Aidenbach
Formol	Merck, Darmstadt
Formvar	Merck, Darmstadt
Forskolin	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Gelatine	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Glutamax	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Glutardialdehyd	Merck, Darmstadt
Glyzerin	Merck, Darmstadt
Glycidether	Serva, Heidelberg

Glyzin	Merck, Darmstadt
Hämalaun	Merck, Darmstadt
HBSS (Hanks Balanced Salts Solution)	GibcoBRL, Karlsruhe
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kalialaun (Kaliumaluminiumsulfat)	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogencarbonat (KHCO <sub>3</sub> )	Merck, Darmstadt
Ketamin (Ketanest®)	Parke-Davis, Berlin
Lidocain, Salbe 2%	Merck, Darmstadt
Magermilchpulver Naturaflor	Töpfer, Dietmannsried
Magnesiumsulfat (MgSO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
Methylenblau	Merck, Darmstadt
MNA (Methylnorbornen-2,3-dicarboxyl-anhydrid)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
MOPS (3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Dinatriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat-2-hydrat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *2 H <sub>2</sub> O)	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
Natriumcitrat (C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>7</sub> )	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat-hydrat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O)	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt
Natriumiodid (NaI)	Merck, Darmstadt
Osmiumtetroxid	Serva, Heidelberg
Paraformaldehyd (PFA)	Serva, Heidelberg
Pellet Paint TM	Merck, Darmstadt
Pferdeserum	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
PLL (Poly-L-Lysin)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Propylenoxid	Serva, Heidelberg
Proteinase-Hemmer-Tabletten (Complete)	Roche, Grenzach
Salzsäure (HCl)	Serva, Heidelberg
Schiff´s Reagenz	Merck, Darmstadt
Sodium-Dodecyl-Sulfat (SDS)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Streptomycin/Penicillin	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Tribomethanol	Merck, Darmstadt
Tris-HCl-Base	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Trypsin	Merck, Darmstadt
Uranylacetat	Merck, Darmstadt
Xylencyanol	Merck, Darmstadt
Xylol	Merck, Darmstadt

Xylazin (Rompun®)	Bayer, Leverkusen
Ziegenserum	Invitrogen, Darmstadt
Zitronensäure	Merck, Darmstadt

### 2.1.2. VERBRAUCHSMATERIALIEN

Coverplates für Immunhistochemie	Dako Cytomation, Hamburg
Deckgläschen	Marienfeld, Lauda-Königshofen
Diafilme	Plano, Wetzlar
ECL-Filme	GE Healthcare, Freiburg
Einmalhandschuhe	Hartmann, Heidenheim
Eppendorfgefäße	Eppendorf, Hamburg
Falconröhrchen, Größe: 15ml, 50 ml	Becton & Dickinson, Heidelberg
Filterpapier (3mm)	Whatman, GE Healthcare, Freiburg
Injektionskanülen	Becton & Dickinson, Freiburg
Kosmetiktücher	Wepa Professional, Arnshausen
Kupfergrids für Elektronenmikroskopie	Plano, Wetzlar
Nahtmaterial	Braun, Tuttlingen
NuPage 4-12% Bis-Tris Gele	Invitrogen, Darmstadt
Objektträger	Menzel-Gläser, Braunschweig
	Marienfeld, Lauda-Königshofen
PCR-Mikrotiterplatten	ABgene, Surrey, UK
PCR-Plattenfolie „Air Pore Sheet“	ABgene, Surrey, UK
Pipettenspitzen	Molecular Bioproducts, San Diego, CA, USA
Präparationsbesteck und Arterienklemme	Fine Science Tools, Heidelberg
PVDF-Membran Hybond-PTM	GE Healthcare, Freiburg
Spritzen „NormInjekt“, Größe : 1ml	Henke Saas Wolf, Tuttlingen
Sterilfiltrationseinheit 100ml, 500ml	Corning Life Sci., Amsterdam, NL
Stickstoff, flüssig	Messer-Griesheim, Krefeld
Transferpipetten	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Trockeneis	Messer-Griesheim, Krefeld
Zellkulturplatten (6, 12, 24 Vertiefungen)	Becton & Dickinson, Freiburg
Zellkulturschalen (3,5mm, 6cm, 10cm ø)	Becton & Dickinson, Freiburg

### 2.1.3. ENZYME, NUKLEINSÄUREN UND REAKTIONSKOMPLETTSYSTEME

Alkalische Phosphatase (CIP)	Boehringer, Mannheim
Chemilumineszenzkit (Western Blot)	Perkin Elmer, Rodgau
Desoxyribonukleosid-Triphosphate (dNTPs)	Boehringer, Mannheim
DNA-Größenmarker Lambda/HindIII	Promega, Mannheim

DNA-Größenmarker PhiX174/HaeIII	Promega, Mannheim
DNeasy 96TM Kit für DNA-Isolation	Qiagen, Hilden
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Invitrogen, Darmstadt
GoTaqTM DNS-Polymerase	Promega, Mannheim
Lowry Assay	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
LSAB2 Kit für Immunhistochemie	Dako Cytomation, Hamburg
Power Sybr® Green PCR Master Mix	Applied Biosystems, UK
Precision Plus ProteinTM Standard Dual Color	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Proteinase K	Boehringer, Mannheim
Randomisierte Nonamerprimer	F. Benseler, MPI für exp. Med.
RNA 6000 Nano Assay	Agilent Technologies, Böblingen
RNeasyTM Mini Kit für RNA Isolation	Qiagen, Hilden
Superscript IIITM RT-Kit	Invitrogen, Carlsbad, USA
SybrGreen	Perkin Elmer, Rodgau
Taq-Polymerase Puffer	Promega, Mannheim
Taq-DNA-Polymerase (5 U/µl)	Boehringer, Mannheim
TRIzol Reagent	GibcoBRL, Karlsruhe

#### 2.1.4. GERÄTE

7500 Real-Time PCR System	Applied Biosystems
Agarose-Gelekkammer mit Kämmen	Hauswerkstatt MPI exp. Med
Agarosegeldokumentation ImageMaster VDS Freiburg	Amersham Pharmacia Biotech,
Agilent Bioanalyzer 2100	Agilent Technologies, Böblingen
Ausgießstation AP280	Microm, Walldorf
Blotkammern für Western Blots	Invitrogen, Darmstadt
Binokular	Zeiss, Jena
Coverplate-Kassetten	Dako Cytomation, Hamburg
Diamantmesser Semithin Diamond Knife 45°	Diatome U.S., Fort Washington, PA, USA
Elektronenmikroskop EM 900	Zeiss, Jena
Feinwaage, digital	Heraeus Instruments, Langenselbold
Fräse für Epon-Präparate	Reichert, Wien, Österreich
Gefrierschrank -20°C	Liebherr, Ochsenhausen
Gefrierschrank -80°C	New Brunswick Scientific, Nürtingen
Gelladestation für Agilent Bioanalyzer	Agilent Technologies, Böblingen
Gelkammern für Polyacrylamidgele	Invitrogen, Darmstadt
Gewebe-Einbettautomat (EM) Lynx el	Vision BioSystems Inc, Norwell, MA USA

Gewebehomogenisierer Ultraturrax T8	IKA Labortechnik, Staufen
Gewebeinfiltrationsautomat (Paraffin) HMP110	Microm, Walldorf
Glaswaren	Schott, Mainz
Konfokales Mikroskop	Leica, Wetzlar
Lichtmikroskop Leica DM RXA2	Leica, Wetzlar
Magnetrührer	Omnilab, Bremen
Mikrowelle Mikromat	AEG, Berlin
PCR-Thermocycler T3	Biometra, Göttingen
PCR-Versiegler Combi Thermosealer	Advanced Biotechnologies, Surrey, UK
Peristaltikpumpe	Heraeus Instruments, Langenselbold
Pipetten, Größen: 10µl, 20µl, 200µl, 1000µl	Gilson, Villiers-le-Bel, Frankreich
Photometer Ultraspec 3000	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Reinstwasseranlage SeralPur Pro 90 CN	Seral, Ransbach
Rotationsmikrotom Leica RM 2155	Leica Microsystems, Wetzlar
Schlittenmikrotom HM400	Microm, Walldorf
Spannungsgeräte Elektrophorese	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Spektralphotometer	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Sterilbank	Heraeus Instruments, Langenselbold
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg
Trocknungszentrifuge Speed Vac	Eppendorf, Hamburg
Ultramikrotom	Leica, Wetzlar
UV-Illuminator	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Videomikroskopie-Kamera	Hamamatsu, Herrsching
Probenmischgerät Vortexer	Bender & Hobein, München
Zellkulturinkubator	Heraeus Instruments, Langenselbold
Zentrifuge Laboratory Centrifuge 4K15	Sigma Laborzentrifugen, Osterode am Harz
Zentrifuge Heraeus Biofuge 13	Heraeus Instruments, Langenselbold

#### 2.1.5. ANTIKÖRPER

##### Primärantikörper:

Anti-EGR2 (polyklonal Kaninchen, 1:400)	Dies Meijer, Rotterdam
Anti-KI-67 (monoklonal Maus, 1:100)	Dako Cytomation, Hamburg
Anti-MPZ (polyklonal Kaninchen, 1:250)	J. Archelos, Würzburg
Anti-NRG1 (polyklonal Kaninchen, 1:250)	Santa Cruz SC-348, Heidelberg

Anti-POU3F1 (polyklonal Kaninchen, 1:500)	Dies Meijer, Rotterdam
Anti-S100 (monoklonal Maus, 1:250)	Merck-Millipore, Darmstadt
Anti-Tubulin (monoklonal Maus, 1:5000)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf

Sekundärantikörper:

Cy2-gekoppelt-anti-Kaninchen (Ziege, 1:1000)	Jackson Immu. Res., Newmarket, UK
Cy2-gekoppelt-anti-Maus (Ziege, 1:1000)	Jackson Immu. Res., Newmarket, UK
Cy3-gekoppelt-anti-Kaninchen (Ziege, 1:1000)	Jackson Immu. Res., Newmarket, UK
Cy3-gekoppelt-anti-Maus (Ziege, 1:1000)	Jackson Immu. Res., Newmarket, UK
HRP-anti-Kaninchen (Ziege, 1:1000)	Jackson Immu. Res., Newmarket, UK
HRP-anti-Maus (Ziege, 1:1000)	Jackson Immu. Res., Newmarket, UK

### 2.1.6. OLIGONUKLEOTIDE

Die Primeroligonukleotide für die semiquantitative Expressionsanalyse mittels RT-PCR wurden mit der Internet-basierten Software Universal ProbeLibrary Assay Design Center von der Firma Roche Applied Science entworfen, mit Hilfe der Software Oligo Analyzer (Teemu Kuulasmaa 2009) gegengeprüft und von F. Benseler (Abt. 501 des MPI für exp. Medizin, Göttingen) synthetisiert.

Primer zur Genotypisierung der *Nrg1 Typ I* transgenen Mäuse:

Fwd: 5'-CTGGTAGAGCTCCTCCGCTTC -3'

Rev: 5'-TGGCAAAGGACCTTAGGCAGTGT -3'

Primer zur Genotypisierung der *Nrg1 Typ III* transgenen Mäuse:

Fwd: 5'-CGATAAGTTTAGGAGCAGTTTGCAG -3'

Rev: 5'-TGGCAAAGGACCTTAGGCAGTGT -3'

Primer zur Genotypisierung der *Dhh-Cre* Mauslinie:

Fwd: 5'-CAGCCCGGACCGACGATGAA -3'

Rev: 5'-CCTGCGGAGATGCCCAATTG -3'

Primer zur Genotypisierung der *Nrg1<sup>loxP/loxP</sup>* Mäuse:

Fwd: 5'-GCACCAAGTGGTTGCGATTGTTGCT -3'

Rev: 5'-TCCTTTTGTGTGTGTTTCAGCACCGG -3'

Primer für die semiquantitative Expressionsanalyse von *Nrg1 Typ I* mittels RT-PCR:

Fwd: 5'-GGGAAGGGCAAGAAGAAGG -3'

Rev: 5'-TTTCACACCGAAGCACGAGC -3'

Primer für die semiquantitative Expressionsanalyse von *Hmgcr* mittels RT-PCR:

Fwd: 5'-CAACCTTCTACCTCAGCAAGC -3'

Rev: 5'-CACAGTGCCACATACAATTTCG -3'

Primer für die semiquantitative Expressionsanalyse von *Scap* mittels RT-PCR:

Fwd: 5'-CTCAGGGGCAATCACAGC -3'

Rev: 5'-TGAGCAAATGTTTGGCTGAC -3'

Primer für die semiquantitative Expressionsanalyse von *Mbp* mittels RT-PCR:

Fwd: 5'-GCCTGTCCCTCAGCAGATT -3'

Rev: 5'-GCCTCCGTAGCCAAATCC -3'

## 2.1.7. PUFFER UND LÖSUNGEN

### 2.1.7.1. DNA Aufreinigung und Genotypisierungs PCR:

TAE-Puffer (50x, 1000ml):

242 g Tris-HCl Base

57,1 ml Essigsäure 100%

100 ml EDTA (0,5 M pH 8)

auf 1000 ml mit H<sub>2</sub>O auffüllen

### 2.1.7.2. IMMUNHISTOCHEMIE

Blockierungslösung:

2 g BSA

2 g Pferdeserum

0,1 g Gelatine

In 100 ml d-PBS unter Erwärmen lösen.

Hämalaun:

1 g Hämalaun

0,1 g Natriumiodid

50 g Kalialaun

unter Schütteln in 1 l Aqua bidest. lösen.

50 g Chlorhydrat

1 g Zitronensäure

zugeben und mischen.

Phosphatpuffer (PBS):

Stammlösung A: 0,2 M Natriumdihydrogenphosphat

Stammlösung B: 0,2 M Dinatriumhydrogenphosphat

Gebrauchslösung (0,1M, pH 7,4):

20 ml Stammlösung A

80 ml Stammlösung B

100 ml Aqua bidest.



## Fixierungslösung (1000 ml):

100 ml	PBS Stammlösung A
400 ml	PBS Stammlösung B
100 ml	Formol 37% (filtriert)
400 ml	Aqua bidest.

## PBS/BSA:

20 ml	PBS Stammlösung A
80 ml	PBS Stammlösung B
1,8 g	NaCl
1 g	BSA
100 ml	Aqua bidest.

## Scotts Lösung:

2 g	Kaliumhydrogencarbonat
20 g	Magnesiumsulfat

Aqua bidest. ad 1000 ml.

## Trispuffer:

## Stammlösung (0,5 M, pH 7,6):

60, 75 g TRIS(hydroxymethyl)-aminomethan in 500 ml Aqua bidest. lösen, mit 1 M HCl auf pH 7,6 einstellen und mit H<sub>2</sub>O auf 1000 ml auffüllen.

## Gebrauchslösung (0,05 M, pH 7,6):

100 ml	Stammlösung
9 g	NaCl

Mit H<sub>2</sub>O auf 1000 ml auffüllen.

## Zitratpuffer:

Stammlösung A: 0,1M Zitronensäure

Stammlösung B: 0,1M Natriumcitrat

## Gebrauchslösung (0,01 M, pH 6):

9 ml	Stammlösung A
41ml	Stammlösung B

Aqua bidest. ad 500 ml

## 2.1.7.3. ELEKTRONENMIKROSKOPIE

## Bleicitrat nach Reynolds (1963):

1,33 g	Bleinitrat
1,76 g	Natriumcitrat

in 30 ml ddH<sub>2</sub>O lösen.

Stark schütteln, nach ca 30 min Umwandlung von Bleinitrat in Bleicitrat. Anschließend max. 8 ml 1 N NaOH hinzugeben, mit Aqua dest. auf 50 ml auffüllen und schwenken bis sich das Bleicitrat aufgelöst hat (pH Wert 12). Vor Gebrauch zentrifugieren.

Fixanz nach Karnovsky, pH 7,5 (1965):

0,36 g	Natriumdihydrogenphosphat x H <sub>2</sub> O
3,1 g	Dinatriumhydrogenphosphat x 2 H <sub>2</sub> O
1g	NaCl
20 ml	Glutardialdehydlösung
8g	Paraformaldehyd (PFA)

PFA in 60 ml ddH<sub>2</sub>O lösen und unter Rühren auf 60-70°C erhitzen. Anschließend mit ddH<sub>2</sub>O auf 80 ml auffüllen. Tröpfchenweise 1 M NaOH zugeben, bis die Lösung klar wird. Anschließend steril filtrieren und mit 1 M HCl den pH Wert auf 7,4 einstellen. Die Salze in 100 ml ddH<sub>2</sub>O lösen und zu dem PFA geben. Glutardialdehydlösung zugeben.

Formvar-Lösung zum Befilmen von Kupfergitter:

0,25 g Formvar in eine dunkle, trockene Flasche geben. 100 ml Chloroform durch einen Papierfilter laufen lassen und zum Formvar geben. Die Flasche gut verschließen und mindestens 24 h lang bis zur kompletten Auflösung des Formvars stehen lassen. Die Lösung ist dunkel gelagert mindestens ein Jahr haltbar.

Kunstharzmischung Epon (Luft 1961):

Lösung A:

67,5 g	Glycidether
88,2 g	DDSA

eine Stunde mit Magnetrührer rühren

Lösung B:

82,3 g	Glycidether
73,3 g	MNA

eine Stunde mit Magnetrührer rühren

Gebrauchslösung Epon:

Epon Lösungen A + B im Verhältnis 1 : 1 mischen; 1,8% DMP30 zugeben

Methylen-Azur-II-Färbelösung (Richardson et al. 1960):

Methylenblau-Lösung: 1% Methylenblau in 1% wässriger Boraxlösung

Azur-II-Lösung: 1% Azur II in H<sub>2</sub>O

beide Lösungen in einem Verhältnis von 1:1 mischen.

## 2.1.7.4. PROTEINBIOCHEMIE

Laufpuffer für Polyacrylamidgele (20x):

1M	MOPS
1M	Tris Base
69,3 mM	SDS
20,5 mM	EDTA

Lysepuffer für Proteinlysaten aus Ischiasnerven:

320 mM	Sucrose
10 mM	Tris
1 mM	NaHCO <sub>3</sub>
1 mM	MgCl <sub>2</sub>

Proteinase-Hemmer (Complete, Roche), 1 Tablette für 50 ml Lösung.

Lysepuffer für Proteinlysaten aus primären Rattenschwanzzellen:

1 %	SDS
0,1 M	PBS

Proteinase-Hemmer (Complete, Roche), 1 Tablette für 50 ml Lösung.

Protein-Probenpuffer (2x):

20%	Glyzerin
4,6%	SDS
0,4%	Bromphenolblau
125 mM	Tris-Base

auf 50 ml mit dd H<sub>2</sub>O auffüllen pH 6,8

zu 20 µl Probenpuffer vor Probenzugabe 1 µl β-Mercaptoethanol (5%) zugeben

SDS-Sammelgelpuffer (250 ml):

15,15 g (0,5 M)	Tris-Base
5 ml (0,4%)	SDS (20%)

auf 250 ml mit dd H<sub>2</sub>O auffüllen, pH 6,8 mit HCl einstellen

SDS-Trenngelpuffer (250 ml):

45,42 g (1,5 M)	Tris-Base
5 ml (0,4%)	SDS (20%)

auf 250 ml mit dd H<sub>2</sub>O auffüllen, pH 8,8 mit HCl einstellen

Waschpuffer:

1x	PBS
5%	Tween 20

Western Blot-Puffer (1000 ml):

20% v/v	Methanol pH 9,2
48mM	Tris-Base
39 mM	Glyzin
0,1%	SDS

auf 1000 ml mit Aqua bidest. auffüllen

#### 2.1.7.5 SCHWANNZELLKULTUR

Lysepuffer:

100 µl	Kollagenase
200 µl	Trypsin
1700 µl	DMEM

Ruhemedium:

DMEM

10% FCS

Glutamax

Penicillin/Streptomycin

#### 2.1.7.6. NARKOSE UND TÖTUNG VON MÄUSEN

Ketamin-Xylazin:

0,6 ml	Ketamin (10%)
0,2 ml	Xylazin (2%)

Avertin:

1 g	Tribomethanol
0,81 g	Amylalkohol
71,49 ml	Aqua bidest.

H<sub>2</sub>O auf 40°C (max) erwärmen und zu Tribromethanol und Amylalkohol langsam hinzupipettieren. Etwa 10 min. unter Rühren lösen. Anschließend steril filtrieren (0,2µm) und bis zur Verwendung in dunklen Gefäßen einfrieren.

#### 2.1.8. VERSUCHSTIERE

Alle Tiere wurden gemäß dem deutschen Tierschutzgesetz im Tierhaus des Max-Planck-Institutes für experimentelle Medizin, Göttingen, gehalten. Es wurden Neuregulin-1 Typ I und Typ III transgene Tiere (C57Bl6-Tg(*Thy1-Nrg1\*III*)1*Kan*+/- und C57Bl6-Tg(*Thy1-Nrg1\*I*)1*Kan*+/-, in Text und Abbildung bezeichnet als Nrg1(I) tg und Nrg1(III) tg) verwendet (Michailov et al. 2004). Des Weiteren wurden *Dhh*<sup>Cre</sup> (C57Bl6-Tg(*Dhh-cre*)1*Mejr*)-positive Tiere

mit *Nrg1*<sup>loxP/loxP</sup> (C57Bl6-(*Nrg1tm2Cbm*))-Mäusen verpaart (Jaegle et al. 2003, Li et al. 2002). In diesen Versuchen dienten *Nrg1*<sup>loxP/loxP</sup>-Mäuse als Kontrollen. Diese Tiere unterschieden sich morphologisch und phänotypisch nicht von Wildtypmäusen.

### 2.1.9. COMPUTERSOFTWARE

7500 Fast System SDS Software	Applied Biosystems, UK
Excel 2003	Microsoft Europe, Berlin
Illustrator 13.0.2	Adobe Systems Software Saggart, Irland
ImageJ 1.40g	NIH, USA
Oligo Analyzer 1.1.2	Teemu Kuulasmaa, Kuopio, Finnland
Openlab 2.1	Improvision, Heidelberg
Photoshop 10.0.1	Adobe Systems Software Saggart, Irland
qBase 1.3.5	Center for Medical Genetics, Belgium Ghent, Belgien (Hellemans et al. 2007)
Statistica 6.0	StatSoft Europe, Hamburg
Universal Probe Library	Roche Applied Science, Mannheim
Assay Design Center	
Word 2003	Microsoft Europe, Berlin

## 2.2. METHODEN

### 2.2.1. HANDHABUNG UND ANALYSE VON VERSUCHSTIEREN

Alle in der vorliegenden Arbeit verwendeten Mäuse (siehe 2.1.8.) wurden in der lokalen Tierhaltungseinheit des Max-Planck-Institutes für experimentelle Medizin, Göttingen, gezüchtet und gehalten. Die Haltung erfolgte gemäß den Richtlinien der deutschen Gesellschaft für Versuchstierkunde.

#### 2.2.1.1. IDENTIFIKATION DER MÄUSE

Zur eindeutigen Identifikation der Mäuse wurden die Tiere im Alter von 3-4 Wochen mit Hilfe eines Ohrlochstanzgerätes mit einem Lochcode versehen. Dieser erlaubt die Nummerierung der Mäuse von 1-99. Die weitere Zuordnung erfolgte durch an den Käfigen angebrachte Identifikationskarten, auf denen die Mauslinie mit Name und Nummerncode sowie das Geburtsdatum, das Geschlecht und die Identifikationsnummern der Elterntiere notiert sind. Zur Verwaltung der Zucht wurde das Tierdatenbankprogramm PyRAT (Scionics Computer Innovation GmbH) verwendet.

Zur Genotypisierung der Mäuse wurde zum Zeitpunkt der Ohrlochkodierung eine ca. 5mm lange Schwanzbiopsie entnommen, die bis zur weiteren Verwendung (Isolierung der genomischen DNA) in einem Eppendorfgefäß auf -20°C gelagert wurde.

#### 2.2.1.2. NARKOTISIERUNG UND TÖTUNG VON VERSUCHSTIEREN

Für die Durchführung der Nervenkompressionsoperationen wurden die Tiere mit einer Injektionsnarkose betäubt. Die Mäuse erhielten hierfür eine intraperitoneale Injektion einer Kombination auf 5 mg/kg Körpergewicht 5 mg/kg Körpergewicht Ketamin (Ketanest®) und 2 mg/kg Körpergewicht Xylazin (Rompun®). Für die Entnahme von Gewebe und die Perfusion von Tieren wurden die Mäuse mit Hilfe einer intraperitonealen Injektion von Avertin (0,2 ml pro 10 g Körpergewicht) betäubt.

#### 2.2.1.3. NERVENKOMPRESSIONSMODELL

Das Nervenkompressionsmodell wurde bei allen verwendeten Mäusen im Alter von drei Monaten durchgeführt. Zunächst wurden die Tiere mit einer Injektionsnarkose (siehe **2.2.1.2.**) betäubt. Anschließend wurden die Hinterläufe der Mäuse leicht fixiert, und die Hautfläche im Bereich des rechten proximal lateralen Oberschenkels (ca 1 x 1 cm) rasiert. Die Haut wurde dann insgesamt 3-mal desinfiziert. Mit Hilfe eines Skalpells wurde die Haut in Verlaufsrichtung des N. ischiadicus über eine Länge von ca. 0,8 cm eröffnet. Das subkutane Fettgewebe wurde stumpf präpariert und minimalinvasiv der Bereich zwischen Musculus gluteus maximus und Musculus semimembranosus freigelegt, um so einen Zugang zum Nervus ischiadicus zu erhalten. Mit Hilfe eines nicht resorbierbaren Fadens (Dafilon DSMP13 3/8c, Braun) wurde das Endoneurium mit einem Knoten versehen, und direkt proximal dieser Markierung der N. ischiadicus mit einer Arterienklemme (Breite 3 mm) für 40 s komprimiert. Anschließend wurde die Haut mit zwei bis drei Einzelknopfnähten verschlossen, erneut desinfiziert und mit Lidocainsalbe bestrichen. Die Tiere wurden nach der Operation bis zum vollen Erwachen halbstündlich überwacht, und in der Folge 2-mal täglich kontrolliert.

Zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Nervenkompressionsoperation (4 Tage, 2 Wochen und 4 Wochen) wurden die Mäuse getötet und der N. ischiadicus entnommen. Für Transkriptions- und Proteinanalysen wurde der N. ischiadicus nativ entnommen und in einem Eppendorf-Gefäß bei -80°C bis zur Verwendung gelagert. Für diese Experimente wurde der gesamte N. ischiadicus distal der endoneuralen Markierung verwendet. Alle N. ischiadici die für histologische Analysen verwendet wurden, wurden nach der Fixation der Mäuse durch Perfusion (**2.1.1.4.**) entnommen. Hierbei wurde der N. ischiadicus immer 4 mm distal des endoneuralen Knotens histologisch untersucht.

#### 2.1.1.4. FIXATION DURCH PERFUSION

Für die histologische Analyse des N. ischiadicus wurden die Mäuse mittels einer Ganzkörperperfusionstechnik fixiert, um die Struktur des zu analysierenden Gewebes besser zu erhalten. Zunächst wurden die Tiere mit einer Avertin Injektionnarkose betäubt und anschließend Bauch- und Brustraum ohne die Verletzung größerer Gefäße eröffnet. Nach Freilegung des Herzens wurde eine Kanüle in den linken Ventrikel eingeführt, welche mit einer Peristaltikpumpe (Heraeus SR70) verbunden wurde. Vor Beginn der Blutgerinnung wurde das Kreislaufsystem mit einem isotonischen Blutersatz (HBSS) (30 ml) über ca. 5 min gespült. Anschließend wurde das Tier mit 50 ml Fixans nach Karnovsky (1965) für Elektronenmikroskopie oder mit 50 ml 4% PFA für Immunhistochemie perfundiert. Anschließend wurde der Nervus ischiadicus präpariert und das Tier danach in der Fixanslösung dauerhaft konserviert.

#### 2.2.2. HISTOLOGISCHE METHODEN

##### 2.2.2.1. EINBETTEN IN KUNSTHARZ UND HERSTELLUNG VON SEMI- UND ULTRADÜNNNSCHNITTEN

Die N. ischiadici wurden nach der Perfusion und Präparation für mind. 24 h in Fixans nach Karnovsky (1965) postfixiert. Für die Herstellung von Semidünnschnitten (0,5  $\mu\text{m}$ ) für Lichtmikroskopie sowie von Ultradünnschnitten (50-70 nm) für Elektronenmikroskopie wurden die Nerven anschließend in ein Kunstharz, Epon, eingebettet. Die Einbettung erfolgte über 24 h vollautomatisch in einem Einbettautomaten der Firma Leica (Lynx el). Dabei werden die Nerven mit Osmium infiltriert und über Entwässerungsschritte mit Hilfe von aufsteigenden Alkoholkonzentrationen erfolgt die Fixierung in Epon nach unten aufgeführtem Schema.

Anschließend wurden die Nerven in Ausgießformen mit reinem Epon gegeben. Die Proben wurden durch Erhitzen auf 60°C für 24 h polymerisiert, um feste Kunstharzblöcke zu erhalten. Die fertigen Eponblöcke wurden danach mit einer Diamantenfräse getrimmt. Dabei wurde der Block so angespitzt, dass eine kleine trapezförmige Fläche entstand, die den Nerv mittig enthielt. Die Herstellung von Semidünn- und Ultradünnschnitten erfolgte mit einem Diamantenmikrotom.

Die 0,5  $\mu\text{m}$  dicken Semidünnschnitte wurden auf Objektträger gegeben und mit einer Azur-Methylenblau-Lösung für eine Minute gefärbt und auf einer Heizplatte bei 60°C getrocknet. Zuletzt wurden die Schnitte mit Eukitt fixiert und mit einem Deckglas geschützt.

Die Ultradünnschnitte (50-70 nm) wurden auf mit Formvar befilmte Kupfergitter gezogen (2.2.2.2.) und getrocknet. Anschließend wurden die Schnitte für ca. 30 min auf einem Tropfen 2% Uranylacetatlösung kontrastiert und mit danach mit H<sub>2</sub>O gespült. Die zweite Kontrastierung erfolgte über 6 min mit Bleicitrat nach Reynolds.

<u>Reagenz</u>	<u>Dauer</u>	<u>Temperatur</u>
1. Puffer	15 min	RT
2. 2 % OsO <sub>4</sub>	4 h	RT
3. 3 mal A. dest.	3 mal 20 min	RT
6. 30 % Ethanol	30 min	RT
7. 50 % Ethanol	30 min	RT
8. 70 % Ethanol	30 min	RT
9. 90 % Ethanol	30 min	RT
10. 4 mal 100 % Ethanol	4 mal 15 min	RT
14. 3 mal Propylenoxid	3 mal 15 min	RT
17. Propylenoxid/Epon 2:1	2 h	RT
18. Propylenoxid/Epon 1:1	2 h	RT
19. Propylenoxid/Epon 1:2	4 h	RT
20. Epon rein Dauer	4 h	RT

#### 2.2.2.2. BEFILMEN VON KUPFERNETZEN

Sorgfältig gesäuberte Objektträger wurden in eine spezielle Glasküvette mit einer Ablaufvorrichtung gestellt. Die Glasküvette wurde mit 0,25 % Formvar befüllt. Das Ventil der Küvette wurde Anschließend geöffnet, so dass der Objektträger langsam und gleichmäßig mit der Formvarlösung benetzt wurde. Nach dem Trocknen wurde der Formvar Film auf dem Objektträger an allen Seiten mit einer Rasierklinge abgeschnitten und Anschließend angehaucht. Der Objektträger wurde dann in einem kleinen Winkel vorsichtig an die Wasseroberfläche eines voll mit Wasser befüllten Gefäßes gehalten, so dass der Formvarfilm auf die Wasserobfläche abschwimmen konnte. Die Kupfergitter wurden mit der Unterseite auf den Formvarfilm gelegt. Zuletzt wurde ein mit Papier beklebter Objektträger in das Wasser getaucht und so der Formvarfilm mit den Kupfergittern aufgenommen. Nach Trocknung konnten die Kupfergitter von dem Objektträger gelöst werden und verwendet werden.

#### 2.2.2.3. ANALYSE DER HISTOLOGISCHEN PRÄPARATE

Auf lichtmikroskopischer Ebene wurde die Gesamtanzahl der myelinisierten Axone, die Anzahl der Schwannzellen in 1:1 Verhältnis mit Axonen sowie die Häufigkeitsverteilung der Axondurchmesser quantifiziert. Hierfür wurden von den gefärbten Semidünnschnitten mikroskopische Bilder bei 1000x mit einem Lichtmikroskop (Leica DM RXA2) angefertigt. Von jedem verwendeten Tier wurde ein gesamter Nervenquerschnitt mit Hilfe einer Videomikroskopie-Kamera und dem Programm Openlab 2.1 abfotografiert. Die weitere Verarbeitung erfolgte mit den Programmen Photoshop 10.0.1 und ImageJ 1.40g. Mit Hilfe von ImageJ wurden verblindet alle myelinisierten Axone pro Nervenquerschnitt sowie alle Schwannzellen in einem 1:1 Verhältnis mit Axonen ausgezählt. Für die Häufigkeitsverteilung



der Axondurchmesser wurden je 300 Axone mittels eines Plugins zufällig ausgewählt und der Umfang mit ImageJ gemessen.

Die elektronenmikroskopischen Analysen umfassten die Bestimmung der Myelindicke (mittels g-ratio) zu verschiedenen Zeitpunkten nach Nervenkompression sowie die Quantifizierung der Myelinovoide, der myelinisierten und degenerierten Axone nach 4 Tagen und die Analyse der Schwanzzellanzahl. Für die g-ratio Analyse wurden randomisiert ca. 30 elektronenmikroskopische Bilder mit einer Vergrößerung von 3000x aufgenommen und mit ImageJ analysiert. Hierzu wurde der Umfang des Axons (ohne Myelin) und der Umfang des Axons mit Myelinscheide bei mindestens 100 Nervenfasern pro Tier gemessen. Anschließend wurde der Quotient aus dem ersten und dem zweiten Wert gebildet, um das g-ratio zu erhalten. Für die Zählungen von Axonen und Schwanzzellen erfolgte eine Auswertung auf 10 randomisierten EM Bildern (entspricht einer Fläche von 8,247µm<sup>2</sup>).

#### 2.2.2.4. PARAFFINEINBETTUNG

Die N. ischiadici für die immunhistochemischen Untersuchungen wurden in 4% PFA für mind. 24 h nachfixiert. Anschließend wurde das Gewebe mit Hilfe eines Gewebeinfiltrationsautomaten (MICROM HMP 110) nach unten aufgeführten Schema paraffiniert.

Danach wurden die Nerven an einer Ausgießstation mit Paraffin in entsprechende Formen ausgegossen. Nach Aushärtung des Paraffins wurden Paraffinschnitte mit einer Dicke von 5µm angefertigt. Die Schnitte wurden auf beschichtete Objektträger (Histobond) aufgezogen und danach bei 37°C über Nacht getrocknet.

<u>Reagenz</u>	<u>Dauer</u>
50% Ethanol	1h
70% Ethanol	2h
70% Ethanol	2h
96% Ethanol	1h
96% Ethanol	1h
100% Ethanol	1h
100% Ethanol	1h
Isopropanol	1h
Xylol	2h
Xylol	2h
Paraffin	2h
Paraffin	2h

#### 2.2.2.5. DAKO-LSAB2 UND DOPPELIMMUNFLUORESCENZFÄRBUNGEN DER PARAFFINSCHNITTE

Die getrockneten Paraffinschnitte wurden zunächst entparaffiniert, indem sie für 10 min bei 60°C Anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe inkubiert wurden. Danach wurden die Schnitte für 10 min in Zitratpuffer inkubiert und für weitere 10 min in dem Puffer bei 650 Watt in der Mikrowelle gekocht. Nach erfolgter Abkühlung (20 min) wurden die Objektträger kurz in Tris-Puffer mit Milchpulver (2 %) gewaschen.

Für die DAKO-LSAB2 Färbung wurden die Schnitte dann in das Coverslip System von DAKO eingesetzt und erneut mit dem Tris-Puffer gespült. Die endogene Peroxidase wurde durch eine 5 min. Inkubation mit 100 µl 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inaktiviert. Danach wurden die Schnitte wieder mit dem Tris-Puffer gewaschen.

Die Schnitte für die DAKO-LSAB2 Färbung wie auch für die Doppelimmunofluoreszenz wurden Anschließend für 10 min mit Ziegen Serum (1:5 verdünnt, 100 µl pro Schnitt) inkubiert, um die Hintergrundfärbung zu minimieren. Danach wurde der Primärantikörper in PBS/BSA verdünnt aufgetragen und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Schnitte wurden Anschließend mit dem Tris-Puffer mehrmals gewaschen.

Für das DAKO-LSAB2 System wurden die Schnitte danach für 10 min mit dem biotinylierten Brückenantikörper von DAKO inkubiert (bei Raumtemperatur) und Anschließend erneut mit Tris-Puffer gewaschen. Das Gewebe auf dem Objektträger wurde dann mit dem „Cytomation Pen“ von DAKO umrandet und Anschließend wurden für die enzymhistochemische Reaktion 100 µl DAB in DAKO Puffer auf die Schnitte gegeben. Nach 2-maligem waschen mit H<sub>2</sub>O wurden die Schnitte für 30 min mit Hämalaun gefärbt, dann in HCl-Alkohol differenziert und mit Hilfe von Scotts-Lösung gebläut und zuletzt durch eine aufsteigende Alkoholreihe geführt. Die Schnitte wurden dann mit Eukitt und Deckgläsern verschlossen.

Für die Doppelimmunofluoreszenzfärbungen erfolgte nach dem Waschen die Inkubation mit dem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper für 1 h bei Raumtemperatur. Nach 3 maligem Waschen mit dem Trispuffer wurde Anschließend die DAPI-Lösung (0,5 µg/µl) für die Kernfärbung aufgetragen. Die Schnitte wurden danach erneut mit dem Tris-Puffer gespült und mit Immu-Mount eingedeckt.

Die Analyse der immunhistochemischen Färbungen erfolgte pro Fläche entweder mit einem Lichtmikroskop oder mit Hilfe konfokaler Mikroskopie.

### 2.2.3. MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

#### 2.2.3.1. ISOLATION VON DNA AUS SCHWANZBIOPSIEN

Für die Genotypisierung der verschieden transgenen und mutierten Mäuse wurde DNA aus den Schwanzbiopsien der Tiere isoliert. Hierfür wurde das DNeasy 96 Kit der Firma Qiagen und das entsprechende Protokoll des Herstellers verwendet. Zunächst wurden die Proben in einer Mischung aus dem Puffer ALT (180 µl) und Proteinase K (20 µl) über Nacht bei 55°C lysiert. Am nächsten Tag wurde 400 µl des Puffers AL/E hinzugegeben und nach Mischen und kurzer Zentrifugation (bei 3000 rpm) wurde der Überstand auf die Silicamembran der DNeasy Säulchen pipettiert. Anschließend wurden die Proben für 10 min bei 6000 rpm zentrifugiert. Danach wurden die Säulchen mit 500 µl des Puffers AW1 und AW2 inkubiert, jeweils gefolgt von einem Zentrifugationsschritt (5 min bei 6000 rpm). Die Proben wurden Anschließend für 15 min bei 70°C inkubiert. Die an die Silicamembran der Säulen gebundene DNA wurde zuletzt mit dem Puffer AE (200 µl, vorgewärmt) eluiert. Nach dem der Puffer auf die Säulchen gegeben wurde, wurden die Proben für 5 min. bei 60°C inkubiert und 2 min bei 6000 rpm zentrifugiert. Der gleiche Vorgang wurde mit weiteren 100 µl Puffer AE wiederholt. Die eluierte genomische DNA wurde bei 4°C gelagert.

#### 2.2.3.2. DIE POLYMERASEKETTENREAKTION ZUR GENOTYPISIERUNG VON GENOMISCHER DNA

Die Bestimmung des Genotyps der transgenen und mutierten Mäuse erfolgte mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR), (Mullis et al. 1986). Die PCR erlaubt die exponentielle Vervielfältigung spezifischer DNA-Abschnitte, sofern die Sequenzen der beiden Enden bekannt sind. Die Ausgangskonzentration an DNA, das template, kann dabei sehr gering sein (z.B. 300 ng genomische DNA). Ein PCR-Programm besteht in der Regel aus drei unterschiedlichen Schritten, einem Denaturierungsschritt, einem Annealing-schritt und einem Elongationsschritt. Die Reaktion wird zunächst mit einer Temperatur-erhöhung auf 92-95°C gestartet, so dass die DNA in ihre Einzelstränge aufgetrennt wird. Im Folgenden fügt man DNA-Fragmente von ca. 20 Nucleotiden Länge, die Primer, hinzu. Diese sind zu den 3' Enden des zu amplifizierenden DNA-Abschnittes des Sense- und des Antisense-Stranges komplementär und lagern sich bei einer Temperatur von 50-60°C spezifisch an die DNA an (Annealing). Die so flankierte Zielsequenz wird danach durch Elongation der Primer kopiert. Hierzu verwendet man das hitzestabile Enzym Taq-DNA-Polymerase (aus dem Bakterienstamm *Thermus aquaticus*), welches bei 72°C die Primer durch Polymerisierung der zugegebenen Desoxynucleotidtriphosphate (dNTPs) an beiden Strängen komplementiert. Mit jedem Zyklus von Neusynthese und Denaturierung erhält man so eine Verdopplung des DNA-Abschnittes (Fig.1). Die PCR führt zu einer exponentiellen Amplifikation, da auch die jeweils neu gebildeten Stränge als Matrize zur Verfügung stehen. Für die meisten Anwendungen liegt nach 35-40 Zyklen genügend Produkt zur weiteren Analyse vor. Ein programmierbares Heizprogramm, der Thermocycler, ermöglicht den automatischen Ablauf der PCR-Zyklen. Das Temperatur / Zeit Profil der PCR wurde an die

Reaktionserfordernisse des jeweiligen Experimentes angepasst, im Prinzip erfolgte die Amplifikation jedoch immer nach folgendem Protokoll:

Die DNA-Amplifikation:

3 min	95°C	
30 s	57,5°C	
90 s	72°C	35 Zyklen
60 s	95°C	
60 s	57,5°C	
10 min	72°C	

Für die Reaktionen wurde ein Reaktionskit der Firma Promega verwendet mit einem Reaktionsvolumen von 20 µl pro DNA-Probe. Der Reaktionsansatz bestand aus:

1 µl	Matritzen-DNA
2 µl 10x	PCR-Puffer Promega
2 µl	dNTPs (je Nukleotid f.c. 200 µM)
0,5 µl	Forward-Primer (f.c. 300 nM)
0,5 µl	Reverse-Primer (f.c. 300 nM)
1 µl	Taq DNA-Polymerase (f.c.1,6 U / 50 µl)
ddH <sub>2</sub> O ad 20µl	

#### 2.2.3.3. AGAROSE-GELELEKTROPHORESE VON GENOMISCHER DNA

Die mittels PCR amplifizierten DNA-Fragmente wurden Anschließend per Gelelektrophorese im elektrischen Feld nach ihrer Grösse aufgetrennt. Prinzipiell ist die elektrische Mobilität für alle Nucleinsäuren – unabhängig von ihrem Molekulargewicht – gleich groß. Unterschiede in der Mobilität kommen erst durch die Siebstruktur der Gelmatrix zustande, da kleinere Moleküle im Vergleich zu größeren Nucleinsäuremolekülen das Gelsieb schneller durchwandern können. Agarose ist das wichtigste Trägermaterial für die Elektrophorese von Nucleinsäuren. Für die Auftrennung der DNA wurden 1,5%-Agarosegele verwendet. Die Agarose wurde in 1x-TAE-Puffer durch Erhitzen in der Mikrowelle gelöst. Anschließend wurde Ethidiumbromid (1 µg/µl) hinzugegeben, welches die Nucleinsäurebanden durch Interkalation in die DNA Anschließend unter einem UV-Illuminator sichtbar macht. Die Flüssigkeit wurde dann in Gelkammern mit Gelkammern gegeben. Nach dem Aushärten des Gels wurden die Gelkämme entfernt, das Gel in einer Laufkammer platziert und mit 1x-TAE-Laufpuffer überdeckt. Die DNA-Proben wurden mit 1/10 Volumen Probenpuffer versetzt und in die Geltaschen eingefüllt und Anschließend zum Auftrennen der DNA eine Spannung zwischen 30-180 V (5-10 V/cm) angelegt. Die entstandenen Banden wurden danach photographiert und ausgewertet. Als Größenmarker dienten je nach Größe des untersuchten Fragments entweder 100 bp oder 1-kb-Marker der Firma Promega.

#### 2.2.3.4. ISOLATION VON RNA AUS NERVENGEWEBE

Bei der RNA-Extraktion wird zunächst die gesamte RNA (rRNA, mRNA, tRNA) aus dem mechanisch zerkleinerten Nerven-Gewebe herausgelöst und stabilisiert. Hierzu wurde ein Standardprotokoll (RNeasy Lipid Tissue Mini Kit, Quiagen) und Reagenzien der Firma Qiagen verwendet. Die bei -80°C gelagerten Proben wurden zunächst in Falconröhrchen mit 1 ml TRIzol Lyseagenz überführt und mit Hilfe des Gewebehomogenisierers Ultraturrax homogenisiert und danach für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden je 200 µl Chloroform hinzugegeben und die Proben ca. 3 min inkubiert, gefolgt von einem 15-minütigen Zentrifugationsschritt bei 12000 g (bei 4°C). Die obere Phase wurde danach in ein neues Eppendorfgefäß überführt und eine Volumeneinheit 70%igen Alkohol hinzugegeben. Das Gemisch wurde anschließend auf eine Säule mit Silikatmembran (RNeasy Mini Spin) gegeben und die Probe bei 8000 g für 15 s. zentrifugiert. Danach wurden insgesamt drei Waschschrte mit dem Waschpuffer RW1 (2 mal je 700 µl, immer gefolgt von einem Zentrifugationsschritt (15 s., 8000 g) und dem RPE-Puffer in Ethanol (1 mal mit 500 µl, gefolgt von einer 3 minütigen Zentrifugation bei 8000 g) durchgeführt. Zuletzt wurde die RNA mit zwei Zentrifugationsschritten bei 8000 g mit jeweils 50 µl RNase-freiem Wasser eluiert. Die aufgereinigte RNA wurde anschließend bei -80°C gelagert. Die Konzentration der RNA wurde spektrometrisch bei OD260 vermessen.

#### 2.2.3.5. cDNA-SYNTHESE DURCH REVERSE TRANSKRIPTION VON RNA

Für die cDNA-Synthese wird die gesamte RNA, mit RNase Inhibitoren behandelt, eingesetzt. Im Verlauf der Synthese verwendet man jedoch möglichst mRNA spezifische Primer, so dass nur diese in cDNA umgeschrieben wird und die Genexpression analysiert werden kann. Die komplementäre DNA wurde mit dem „Superscript-III-RT“ Kit (Invitrogen) synthetisiert. Es wurden Primer mit einem Poly-T-Schwanz (dT-Primer, 0,6 µM) verwendet, um spezifisch mRNA (welche einen Poly-A-Schwanz hat) in cDNA umzuschreiben. Zusätzlich wurden randomisierte Nonamer-Primer (N9-Primer, 120 µM) zugesetzt, so dass auch eine Umschreibung in die Gegenrichtung (antisense) erfolgen konnte. Je 500 ng RNA Transkript wurden mit 1 µl der dT- und N9-Primer für 2 min bei 70°C inkubiert, und die Proben danach auf Eis gelagert. Anschließend wurden zu den Proben ein Reaktionsgemisch bestehend aus dem 1st Strand-Puffer (5x, 12 µl), Dichlordiphenyltrichlorethan (DDT, 100 mM, 6 µl), gemischten Nukleotiden (10 mM, 3 µl) und Superscript-III-Polymerase (3 µl, Wechselzahl von 200 U/µl) hinzugegeben. Die cDNA Synthese erfolgte dann bei einer Inkubation von 10 min bei 25°C, 45 min bei 45°C und 45 min bei 55°C. .

#### 2.2.3.5. SEMIQUANTITATIVE REAL-TIME-PCR MIT SYBR®-GREEN

Bei der Real-Time semiquantitativen PCR vergleicht man über fluoreszierende Signale die PCR-Kinetik einer unbekannt Probe mit einem endogenen Standard, und kann so die relative Konzentration der Probe berechnen. Die Methode erlaubt somit die mRNA

Expressionsbestimmung verschiedener Gene. In den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Expressionsanalysen wurde die Real-Time semiquantitative PCR mit dem Fluorochrom Sybr®-Green durchgeführt. Sybr®-Green bindet an doppelsträngige DNA, und fluoresziert im gebundenen Zustand nach Anregung mit Licht entsprechender Wellenlänge. Die Fluoreszenz korreliert dabei proportional mit der Menge an doppelsträngigen Nukleinsäuren. Sybr®-Green bindet an jeden DNA-Doppelstrang, so dass der Farbstoff universell eingesetzt werden kann. Beachten muss man jedoch die mangelnde Spezifität, da z.B. auch Primer Dimere und unspezifische PCR-Produkte gebunden werden. Bei jeder PCR-Reaktion werden sowohl die zu untersuchende Probe als auch ein Standardgen amplifiziert. Dieses Standardgen, auch Haushaltsgen genannt, ist für die spätere Auswertung der PCR notwendig. Nach der PCR Reaktion werden die Fluoreszenzkurven der Probe und des Standards ermittelt, indem die Fluoreszenzintensität gegen die Zyklenzahl aufgetragen wurde. Danach wird die Zyklenzahl bestimmt, bei der sich das Reportersignal um die zehnfache Standardabweichung von den Störsignalen unterscheidet und die Amplifikation exponentiell verläuft. Diese Zahl gibt den Schwellenwert oder Ct-Wert an und ist von der ursprünglichen Konzentration der amplifizierten Sequenz abhängig. Anschließend werden die Ct-Werte der Probe mit den Ct-Werten des Haushaltsgens verglichen, welches die relative Quantifizierung der Proben-Sequenz ermöglicht. Als Standard werden Gene verwendet, von denen man annimmt, dass sie in dem zu untersuchenden Gewebe nicht reguliert sind. Das heisst, diese Gene sollten im Idealfall unter allen Bedingungen eine konstante Expression, und damit den gleichen Ct-Wert aufweisen. Die Auswertung wurde nach folgendem Rechenschema angefertigt ( $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode):

1. Berechnung der Differenz zwischen dem Ct-Wert der Probensequenz und dem Ct-Wert des Haushaltsgens:

$$\Delta\text{Ct-Wert (Zielgen)} = \text{Ct-Wert (Probe)} - \text{Ct-Wert (Standard)}$$

2. Bestimmung des  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wertes, welcher die Ct-Wertdifferenz des Zielgens relativ zu einer als Kalibrator gewählten Probe angibt:

$$\Delta\Delta\text{Ct-Wert} = \Delta\text{Ct-Wert (Zielgen)} - \Delta\text{Ct-Wert (Kalibrator)}$$

Für die Auswertung und die Normalisierung der Ct-Werte wurde die auf Excel basierende Software qBase verwendet.

Für die Real-Time semiquantitativen PCR mit Sybr®-Green wurde der folgende Reaktionsansatz sowie das folgende Amplifikationsprotokoll verwendet:

Reaktionsansatz:

cDNA	2 $\mu\text{l}$
5'-Primer (10 pmol/ $\mu\text{l}$ )	1 $\mu\text{l}$
3'-Primer (10 pmol/ $\mu\text{l}$ )	1 $\mu\text{l}$
Sybr®-Green Master Mix	5 $\mu\text{l}$
H <sub>2</sub> O	1 $\mu\text{l}$

Amplifikationsprotokoll:

10 min bei 95°C

15 sec bei 95°C

20 sec bei 60°C     40 Zyklen

40 sec bei 72°C

## 2.2.4. PROTEINBIOCHEMIE

### 2.2.4.1. PROTEINISOLATION AUS GEWEBE

Die auf minus 80°C eingefrorenen Nerven wurden in dem Lysepuffer für Ischiasnerven mit dem Gewebehomogenisator Ultraturrax lysiert. Für die primären Rattenschwanzzellkulturen wurde der entsprechende Lysepuffer für Zellen verwendet, und diese ebenfalls mit Hilfe des Ultraturrax lysiert.

### 2.2.4.2. KONZENTRATIONSBESTIMMUNG DER PROTEINE

Die Bestimmung des Proteingehaltes verschiedener Proben erfolgte mit Hilfe des Lowry-Assays (Reagenzien und Protokoll der Firma Biorad), einem kolorimetrischem Verfahren, bei welchem die Proteine aufgrund der Farbreaktion im alkalischen wässrigen Milieu irreversibel denaturiert werden. Zunächst bildet sich ein Proteinkomplex mit Kupfersulfat, der dann die Reaktion mit einem zweiten Farbstoff, einem Folinreagenz, unterstützt. Die Konzentrationsbestimmung wurde anschließend mit einem Photometer durchgeführt, indem die gemessene Absorption der Probe mit der einer Standardproteinreihe (hergestellt mit Bovinem Serumalbumin) verglichen wurde.

### 2.2.4.3. SDS-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE (SDS PAGE)

SDS (Natriumdodecylsulfat) ist ein anionisches Detergenz und überdeckt die Eigenladung von Proteinen, so dass Micellen mit konstanter negativer Ladung pro Masseneinheit entstehen. Die Proteine werden so nur nach einem Parameter, dem Molekulargewicht, getrennt. Für die Gelelektrophorese nach Laemmli (1970) wurden selbst gegossene Gele mit einem Sammelgel und einem Trenngel (mit 12% SDS) verwendet. Die Elektrophorese wurde bei 200 V und 0,12 A pro Gel durchgeführt.

### 2.2.4.4. WESTERN-BLOT UND IMMUNOLOGISCHE DETEKTION DER PROTEINE

Beim Western-Blot werden die aufgetrennten Proteine aus der Polyacrylamidmatrix über das senkrecht zum Gel angelegte elektrische Feld eluiert und auf eine Membran transferiert. Dabei bleibt die Bandenstruktur des SDS-Gels erhalten. Als Blot-Membranen wurden Polyvinylidendifluorid (PVDF) Membranen verwendet. Die Membran wurde zunächst in 20%

Methanol aktiviert. Anschließend wurden die Proteine über einen Zeitraum von einer Stunde in der Blotkammer bei 30 V und 0,17 A von dem Gel auf die Membran transferiert.

Bevor die Membran für eine Immundetektion genutzt werden kann, müssen die restlichen Proteinbindungsstellen der Membran gesättigt werden. Hierzu wurde ein Puffer aus PBS mit Tween 20 (PBS-T) und 2 % Magermilchpulver verwendet. Anschließend wurde die Membran mit dem Primärantikörper über Nacht auf 4°C inkubiert. Nach 3-maligem Waschen mit dem entsprechenden Washpuffer wurde der Horseradish-Peroxidase (HRP) gekoppelte Sekundärantikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Zuletzt wurde die Membran erneut gründlich gewaschen.

Die Detektion der Proteine erfolgte mit einer Chemilumineszenzdetektionslösung der Firma Amersham. Diese enthält das Substrat ECL, welches fluoresziert nachdem es durch das Enzym HRP umgesetzt worden ist. Nach Applikation der Detektionslösung wurden Photofilme der Membran nach unterschiedlich langen Belichtungszeiten angefertigt.

#### 2.2.5. ISOLIERUNG UND KULTIVIERUNG VON PRIMÄREN SCHWANZZELLEN

Für die Herstellung von primären Rattenschwanzzellkulturen wurden die *N. ischiadici* neugeborener Ratten (zwischen 1 und 3 Tage alt) präpariert. Im Durchschnitt wurden ca. 13 Ratten auf einmal präpariert. Die Ischiasnerven wurden anschließend in einen Lysepuffer (100 µl Kollagenase, 200 µl 2,5 % Trypsin und 1700 µl DMEM) überführt und für 45 min bei 37°C angedaut. Der Lysevorgang wurde danach mit 4 ml DMEM mit 10 % FCS gestoppt und die Probe für 5 min bei 800 rpm zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in 8 ml Ruhemedium resuspendiert und auf eine mit PLL beschichtete Zellkulturschale (10 cm Durchmesser) ausplattiert. Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Nach 24 h wurde zu dem Ruhemedium für 3 Tage 0,01 mM das Antimitotikum AraC hinzugegeben, um schnell proliferierende Zellen wie Fibroblasten zu eliminieren. Die Behandlung der Schwanzzellen erfolgte nach 5 Tagen in Kultur mit 20 ng/ml Medium mit rekombinantem humanen Neuregulin-1 beta (EGF-like domain) der Firma ReproKine.

#### 2.2.6. STATISTIK

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten wurden zunächst mit Excel 2003 weiterbearbeitet. Die statistische Auswertung erfolgte mit Statistica 6.0. Es wurde der students t-test für unverbundene Stichproben sowie Wilcoxon-Mann-Whitney-Test als statistische Tests verwendet. Ein Ergebniss mit einem P-Wert < 0,05 wurde als signifikant bewertet. In allen Balkendiagrammen sind der Mittelwert (Balken) und der Standardfehler (T-Graph) angegeben. In den Box-Plot-Diagrammen sind der Mittelwert (kleines Kästchen), der Standardfehler (großer Kasten) und die Standardabweichung (T-Graph) angegeben.



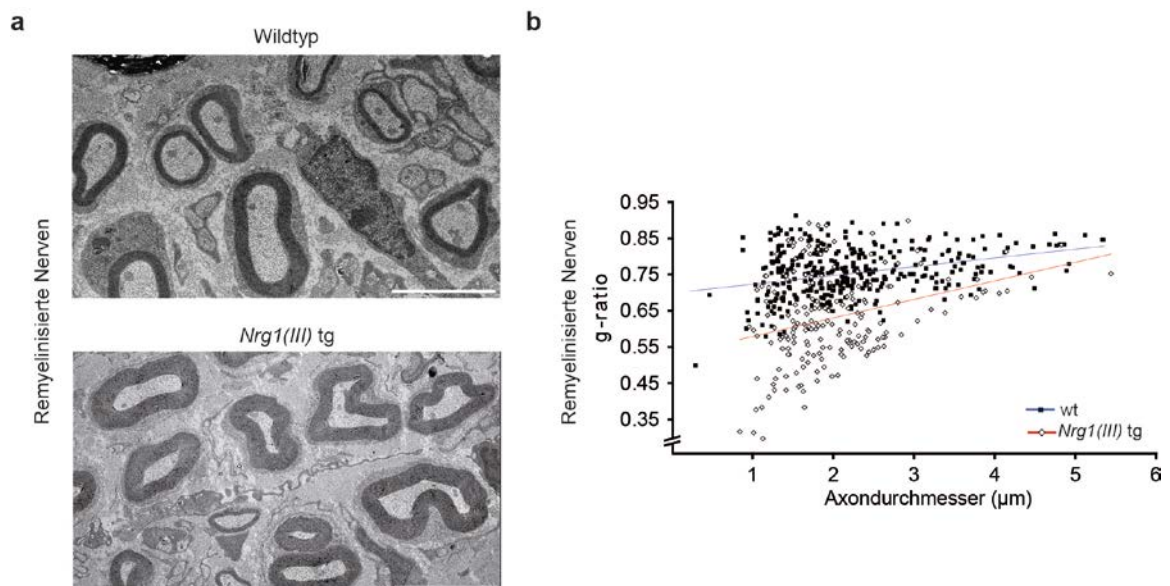
### 3. ERGEBNISSE

#### 3.1. NEURONALES NEUREGULIN-1 VERBESSERT DIE REMYELINISIERUNG IM PNS

Die Funktion von neuronalem Neuregulin-1 für die Remyelinisierung des peripheren Nervensystems wurde mit Hilfe verschiedener transgener Mauslinien untersucht (Michailov et al. 2004). In Mäusen mit einer neuronalen Überexpression (unter dem Thy1.2 Promoter) von Neuregulin-1 Typ I und III (*Nrg1 Typ I* und *III* transgene Tiere; Michailov et al. 2004) wurde eine akute Schädigung des Nervus ischiadicus mit Hilfe eines standardisierten Nervenkompressionsmodells induziert. In diesem Modell sind die axonale Regeneration sowie die Remyelinisierung nach vier Wochen weitgehend abgeschlossen.

Zunächst wurde die Remyelinisierung in *Nrg1 Typ III* transgenen Mäusen untersucht. Hierzu wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen von Nervenquerschnitten 4 mm distal der Schädigung angefertigt und die Remyelinisierung analysiert, in dem die Myelindicke quantifiziert wurde. Während Kontrollmäuse vier Wochen nach einer Nervenkompression in der g-ratio Analyse eine deutlich zu dünne Myelinscheide aufweisen, zeigen *Nrg1 Typ III* transgene Mäuse eine Hypermyelinisierung des N.ischiadicus, welche ungefähr der Hypermyelinisierung während der Entwicklung entspricht (**Abb. 3a,b**).

Die Hypermyelinisierung in *Nrg1 Typ III* transgenen Tieren nach Nervenkompression lässt sich dabei insbesondere bei Axonen mit einem kleinen bis mittleren Axondurchmesser beobachten (**Abb. 3b**).



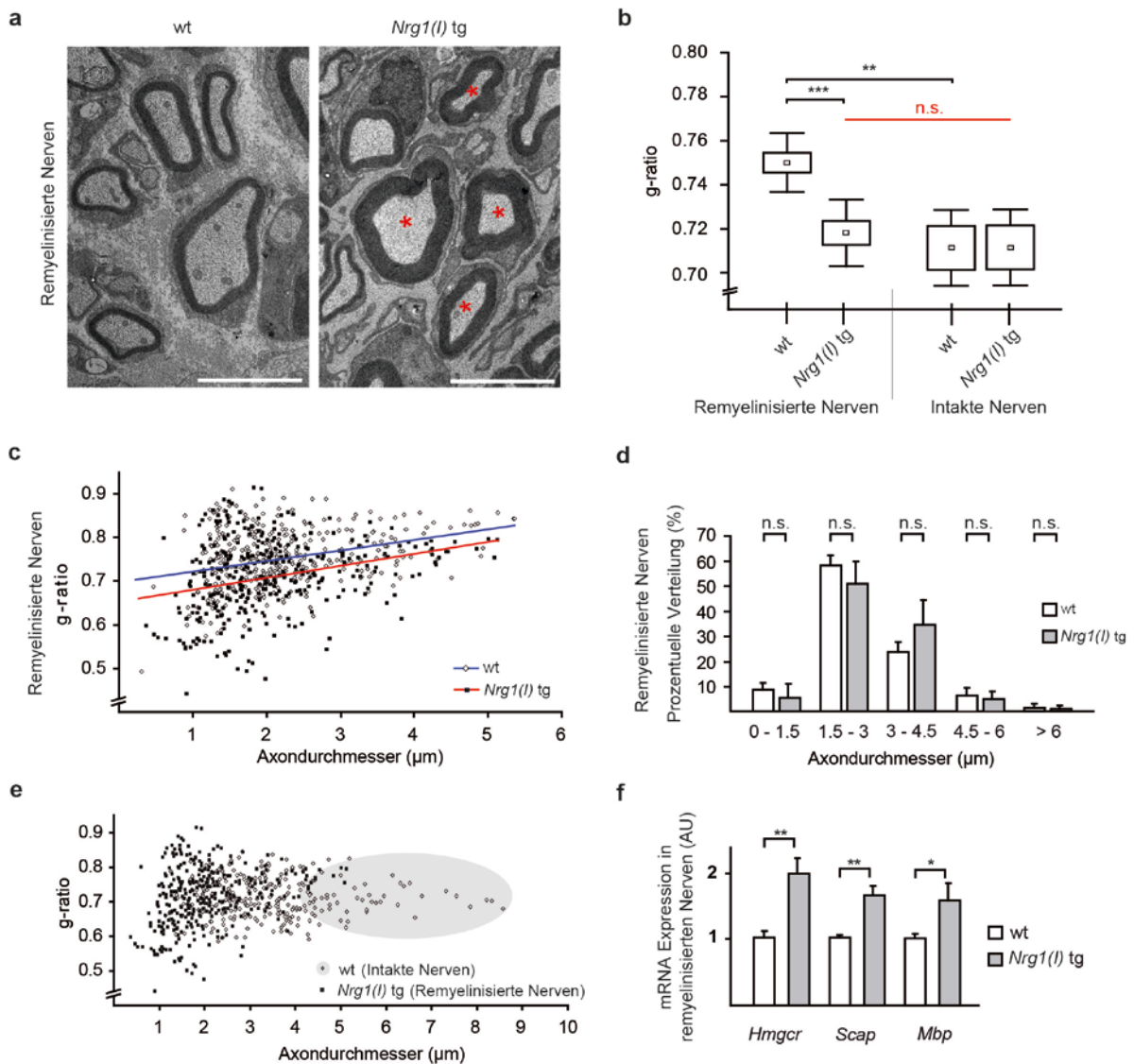
**Abb. 3: Die neuronale Überexpression von NRG1 Typ III führt zu einer Hypermyelinisierung nach Nervenkompression.** a: Repräsentative elektronenmikroskopische Aufnahme eines querangeschnittenen N. ischiadicus eines Wildtyp und eines *Nrg1 Typ III* transgenen Tieres (*Nrg1(III) tg*) 4 Wochen nach Nervenkompression (Messbalken 5 µm). b: Die Quantifizierung der Myelindicke (g-ratio) im Verhältnis zum Axondurchmesser lässt eine Hypermyelinisierung insbesondere der klein- mittelkalibrigen Axone in *Nrg1(III) tg* Tieren im Vergleich zu Wildtyp (wt) Kontrollen erkennen. N=3 pro Gruppe.

Während der Entwicklung reguliert spezifisch die Neuregulin-1 Typ-III-Isoform die Myelindicke im PNS (Michailov et al. 2004). Mäuse mit einer neuronalen Überexpression von Neuregulin-1 Typ I hingegen weisen keine Zunahme der Myelindicke in peripheren Nerven während der Entwicklung auf (Michailov et al. 2004).

Vier Wochen nach einer Nervenkompression dagegen lassen elektronenmikroskopische Aufnahmen des N. ischiadicus eine deutlich verbesserte Remyelinisierung in *Nrg1 Typ I* transgenen Tieren im Vergleich zu Wildtypkontrollen erkennen (**Abb. 4a**). Die Ergebnisse der g-ratio Analyse zeigen entsprechend eine signifikante Zunahme der Myelindicke in *Nrg1 Typ I* transgenen Mäusen im Vergleich zu Kontrollen (**Abb. 4b,c**). Die Myelindicke remyelinisierter Nerven von Neuregulin-1 Typ I überexprimierenden Tiere erreicht dabei das Normalmaß, d.h. das g-ratio von geschädigten Nerven transgener Mäuse entspricht dem nicht geschädigter Kontrollnerven (**Abb. 4a,b**).

Die Zunahme der Myelindicke lässt sich für alle Axonkaliber gleichermaßen beobachten (**Abb. 4c**). Auch besteht kein Unterschied in der Grössenverteilung der axonalen Durchmesser zwischen geschädigten Nerven von *Nrg1 Typ I* transgenen Mäusen und Kontrolltieren. Nach der Nervenkompression weisen beide Gruppen eine reduzierte Anzahl grosskalibriger Axone im Vergleich zu nicht geschädigten N. ischiadici auf (**Abb. 4d,e**).

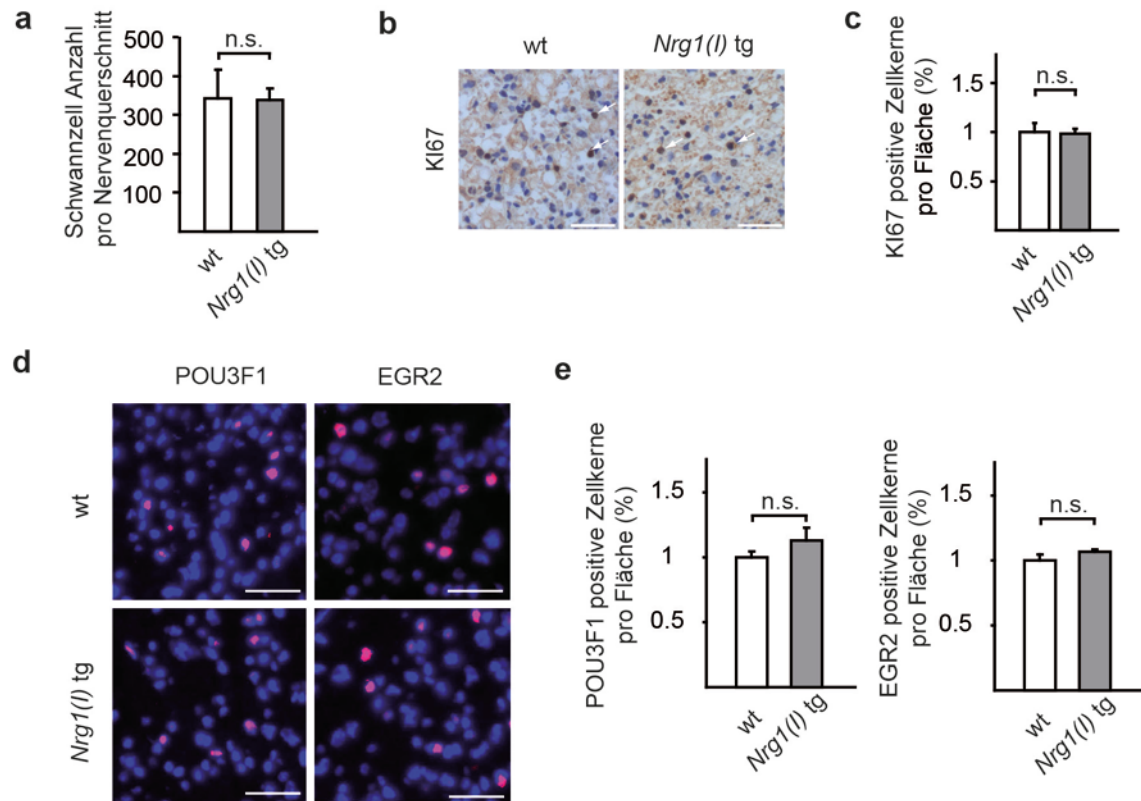
Die verbesserte Remyelinisierung *Nrg1 Typ I* transgener Tiere spiegelt sich auch auf transkriptioneller Ebene wieder (**Abb. 4f**). Vier Wochen nach Nervenkompression lässt sich eine erhöhte mRNA Expression myelinierungs-assoziiierter Gene in RNA Extrakten geschädigter Nerven *Nrg1 Typ I* transgener Tieren im Vergleich zu Kontrollen feststellen. (**Abb. 4f**). Neuregulin Typ I überexprimierende Mäuse weisen eine erhöhte mRNA Abundanz des umsatzbestimmenden Enzyms für die Cholesterinsynthese, der HMG-CoA-Reduktase (*Hmgcr*, 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase) auf (**Abb. 4f**). Auch andere am Lipidmetabolismus von Schwanzzellen beteiligte Gene, wie *Scap* (Sterol regulatory element-binding protein cleavage-activating protein) werden in geschädigten Nerven *Nrg1 Typ I* transgener Tiere induziert (**Abb. 4f**). Ebenfalls lässt sich eine Induktion des Myelin basischen Proteins (*Mbp*) beobachten (**Abb. 4f**).



**Abb. 4: Neuronales NRG1 Typ I verbessert die Remyelinisierung im PNS.** **a:** Repräsentative elektronenmikroskopische Aufnahmen querangeschnittener N. ischiadici *Nrg1 Typ I (Nrg1(I) tg)* transgener Tiere und Wildtyp Kontrollen (wt) 4 Wochen nach Nervenkompression. Die Sterne markieren Axone mit „normaler“ Myelindicke; (Messbalken 5  $\mu\text{m}$ ). **b:** Dargestellt ist ein Boxplot mit der g-ratio Analyse von wt (n=9) und *Nrg1(I) tg* Tieren (n=8) 4 Wochen nach Nervenkompression (Remyelinisierte Nerven) und in nicht geschädigten Kontrollen (Intakte Nerven, n=3 pro Gruppe). Die Remyelinisierung *Nrg1(I) tg* Nerven erreicht das Normalmaß nicht geschädigter Nerven. **c:** Das Verhältnis von g-ratio und Axondurchmesser in remyelinisierten Nerven von *Nrg1(I) tg* und wt Tieren; (n=3 pro Gruppe). **d:** Die prozentuale Häufigkeitsverteilung der Axondurchmesser in *Nrg1(I) tg* und wt Nerven (n=3 pro Gruppe). **e:** Das Verhältnis von g-ratio und Axondurchmesser zeigt eine Reduktion des Axondurchmessers (grau unterlegter Bereich) in *Nrg1(I) tg* Tieren nach Nervenkompression im Vergleich zu intakten wt Nerven (n=3 pro Gruppe). **f:** Die mRNA Expression (AU = arbitrary units) myelinisierungsinduzierter Gene ist in *Nrg1(I) tg* Tieren (n=4) im Vergleich zu Wildtypmäusen (n=5) 4 Wochen nach Nervenkompression erhöht (*Hmgcr* = 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase, *Scap* = Sterol regulatory element-binding protein cleavage-activating protein, *Mbp* = Myelin basische Protein). \*P<0,05; \*\*P<0,01; \*\*\*P<0,001; n.s.= nicht signifikant.

Beeinflusst axonales Neuregulin-1 Typ I spezifisch die Myelinbildung nach Nervenschädigung, oder ist es ebenfalls an der Proliferation und Redifferenzierung von Schwannzellen beteiligt? Die Anzahl der Schwannzellen, die in einem 1:1 Verhältnis mit Axonen assoziiert sind, ist vier Wochen nach Nervenkompression in *Nrg1 Typ I* transgenen Mäusen unverändert (**Abb. 5a**).

Die Schwanzzellproliferation und Differenzierung wurden zu einem früheren Zeitpunkt nach Nervenkompression (zwei Wochen nach Nervenkompression) untersucht, da die Redifferenzierung der Schwanzzellen vier Wochen nach Nervenkompression bereits weitgehend abgeschlossen ist.



**Abb. 5: Die Schwanzzellproliferation und Differenzierung ist nach Nervenkompression in *Nrg1 Typ I* transgenen Tieren unverändert.** **a:** Die Anzahl der Schwanzzellen in einem 1:1 Verhältnis mit Axonen pro Nervenquerschnitt in *Nrg1 Typ I* transgenen (*Nrg1(I) tg*, n=3) und Wildtyp (wt, n=3) Tieren 4 Wochen nach Nervenkompression. **b:** Lichtmikroskopische Aufnahmen querangeschnittener Nerven mit einer immunhistochemischen Färbung gegen Ki67. Die Pfeile markieren Ki67 positive Zellkerne. **c:** Quantifizierung der Ki67 positiven Zellen in *Nrg1(I) tg* und wt Tiere 2 Wochen nach Nervenkompression (n=3 pro Gruppe). **d:** Lichtmikroskopische Aufnahmen querangeschnittener Nerven mit immunhistochemischen Fluoreszenzfärbungen gegen POU3F1 und EGR2. In blau DAPI gefärbte Zellkerne, in pink Zellkerne die POU3F1 oder EGR2 exprimieren. **e:** Die Quantifizierung POU3F1 (links) und EGR2 (rechts) positiver Zellkerne pro Fläche in wt und *Nrg1(I) tg* Tieren (n=3 pro Gruppe). n.s.= nicht signifikant.

Die Schwanzzellproliferation wurde auf immunhistochemischer Ebene mit Hilfe eines Antikörpers gegen Ki67, einem nukleären Protein, welches selektiv von mitotischen Zellen exprimiert wird, analysiert. *Nrg1 Typ I* transgene Tiere weisen keine erhöhte Anzahl Ki67 exprimierender Zellen im Vergleich zu Kontrollen zwei Wochen nach Nervenkompression auf (**Abb. 5b,c**). Diese Ergebnisse sind gut vereinbar mit anderen Studien, die ebenfalls keinen Einfluss von Neuregulin-1 auf die Schwanzzellproliferation nach einer Nervenschädigung feststellen konnten (Atanosoki et al. 2006, Fricker et al. 2011).

Immunhistochemische Färbungen gegen die Transkriptionsfaktoren POU3F1 und EGR2 wurden im Folgenden verwendet, um die Schwanzzellendifferenzierung nach Nervenkompression

zu analysieren. POU3F1 markiert dabei unreife Schwannzellen, während EGR2 von myelinisierenden Schwannzellen exprimiert wird (Jessen und Mirsky 2005). Zwei Wochen nach Nervenkompression zeigt sich kein Unterschied in der Anzahl POU3F1 und EGR2 exprimierender Schwannzellen zwischen *Nrg1 Typ I* transgenen Tieren und Kontrollen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass axonal exprimiertes NRG1 Typ I die frühe Redifferenzierung von Schwannzellen nach einer Nervenkompression nicht maßgeblich beeinflusst (**Abb. 5d,e**).

Zusammenfassend führt sowohl die transgene Überexpression von Neuregulin-1 Typ III als auch von Neuregulin-1 Typ I in Neuronen zu einer verbesserten Remyelinisierung nach Nervenkompression. Die Überexpression von Neuregulin-1 Typ III induziert dabei eine Hypermyelinisierung der regenerierten Axone. *Nrg1 Typ I* transgene Tiere zeigen hingegen eine Rekonstitution der ursprünglichen Myelindicke mit einem g-ratio Wert, welcher im Mittel dem Wert nicht geschädigter Nerven entspricht.

Diese Ergebnisse führten zu der Hypothese, dass ein unzureichendes axonales Neuregulin-1-Signal nach einem Nervenschaden die unvollständige Remyelinisierung im peripheren Nervensystem bedingen könnte.

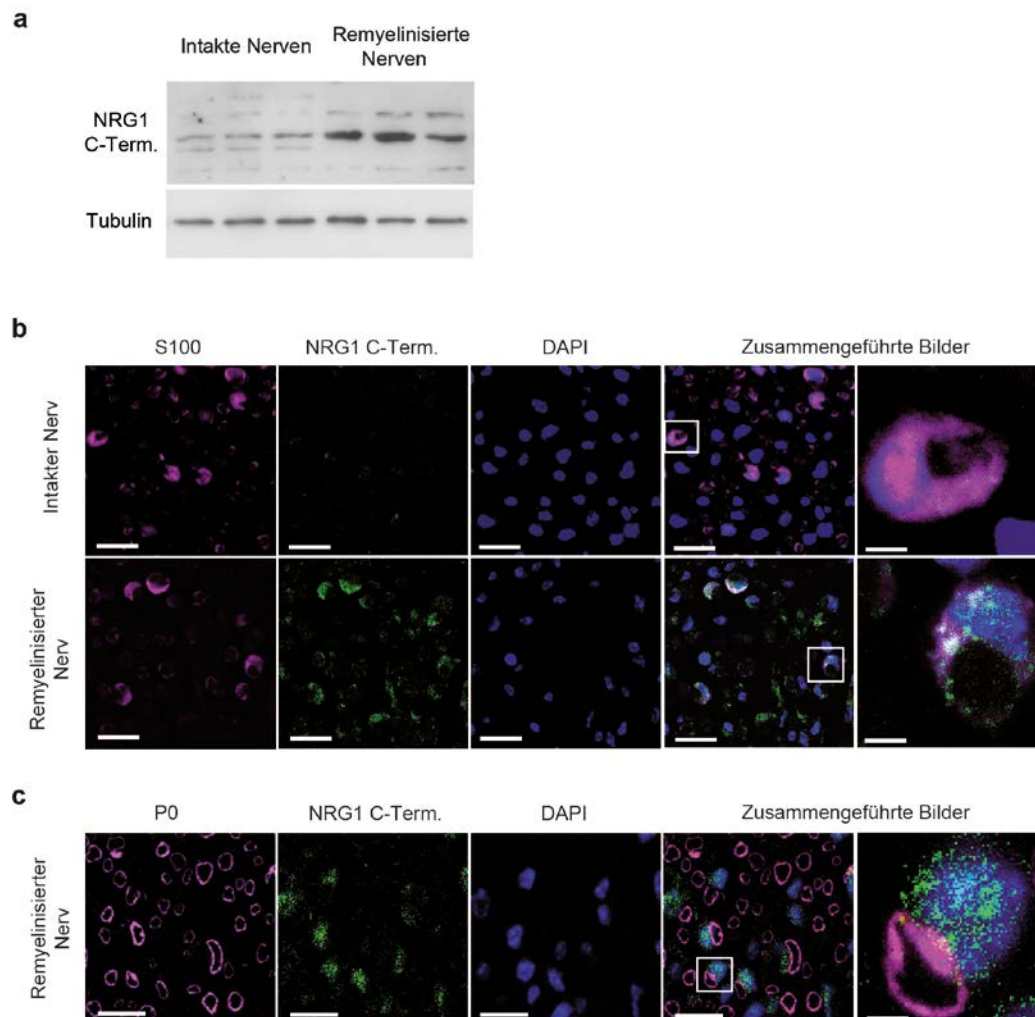
### 3.2. SCHWANNZELLEN EXPRIMIEREN NRG1 TYP I NACH EINER NERVENSCHÄDIGUNG

Nach einer Nervenschädigung verlieren Schwannzellen aufgrund der Wallerischen Degeneration zunächst den Kontakt zum Axon, und somit ebenfalls den Kontakt zu axonal exprimierten Wachstumsfaktoren wie Neuregulin-1. Untersuchungen zur neuronalen Expression von Neuregulin-1 nach einem Nervenschaden ergaben zudem, dass die Neuregulin-1-Expression nach einer Nervenschädigung deutlich reduziert ist, und erst vier Wochen nach Nervenkompression wieder die ursprüngliche Höhe erreicht (Birmingham-McDonogh et al. 1997, Stassart et al. 2012a). Diese Beobachtungen führten zu der Frage, ob denervierte Schwannzellen selbst die Expression von Wachstumsfaktoren induzieren, um so die Reduktion des axonalen Neuregulin-1-Signals zu kompensieren.

Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass nach einem Nervenschaden die Expression von Neuregulin-1 in Schwannzellen stark induziert wird (**Abb. 6a**; Carroll et al. 1997, Stassart et al. 2012a). In nicht geschädigten Nerven dagegen ist die Expression von Neuregulin-1 in Schwannzellen extrem gering (**Abb. 6a**, Stassart et al. 2013).



Die transkriptionelle Analyse der Neuregulin-1-Isoformen Typ I-III in geschädigten Ischiasnerven zu verschiedenen Zeitpunkten ergab, dass spezifisch die *Nrg1 Typ-I-Isoform* (und nicht *Typ II* oder *III*) in geschädigten Schwanzzellen, insbesondere zwischen Tag 1 und 14 nach Nervenkompression, induziert wird (Stassart et al. 2013).



**Abb. 6: Schwanzzellen exprimieren Neuregulin-1 nach Nervenkompression im PNS.** **a:** Western Blot Analyse von Ischiasnerven 4 Wochen nach Nervenkompression (Remyelinisierte Nerven) und von nicht geschädigten, intakten Nerven. Verwendet wurde ein Antikörper gegen den C-Terminus von Neuregulin-1 (Höhe der Bande: 70 kDa) sowie Tubulin als Ladekontrolle (Höhe der Bande: 55 kDa). **b,c:** Konfokale Mikroskopie Aufnahmen von querangeschnittenen Ischiasnerven gefärbt mit Antikörpern gegen S100 (einem von Schwanzzellen exprimierten Protein), gegen den C-Terminus von Neuregulin-1 und gegen das Myelinprotein P0. Eine Kernfärbung erfolgte mit DAPI. Messbalken 20 µm sowie 3,5 µm in den vergrößerten Aufnahmen ganz rechts.

Die Induktion der Schwanzzell Neuregulin-1-Expression ist jedoch auf Proteinebene auch vier Wochen nach Nervenkompression noch deutlich sichtbar (**Abb. 6a**). Für die Analyse der Neuregulin-1 Proteinexpression wurde ein Antikörper verwendet, der gegen die C-terminale Region von allen Neuregulin-1-Isoformen gerichtet ist (**Abb. 6a**). Hierbei ist zu beachten, dass mit diesem Antikörper die axonale Neuregulin-1-Expression kaum detektierbar ist (Velanac et al. 2012).

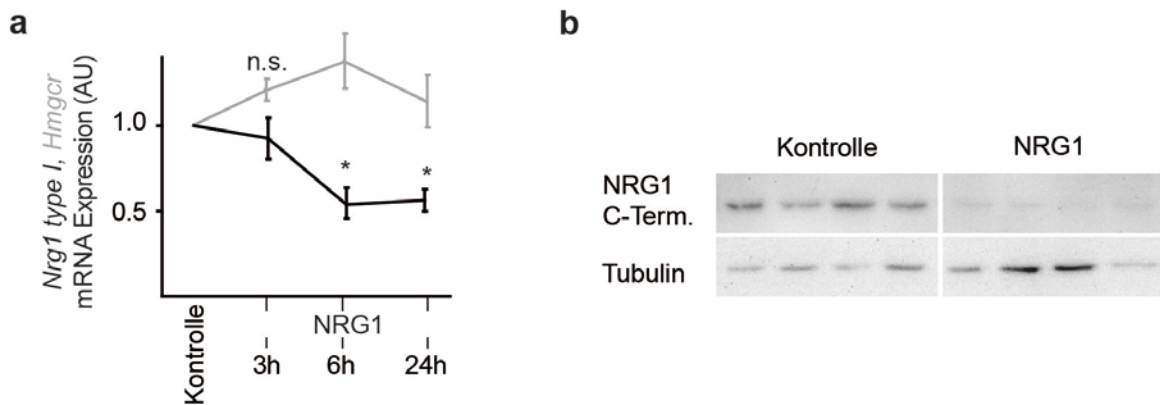
Um nachzuweisen, dass die Expression von Neuregulin-1 im geschädigten N. ischiadicus in der Tat von Schwannzellen induziert wird, wurden immunhistochemische Färbungen gegen Neuregulin-1 und das von Schwannzellen exprimierte Protein S100 vier Wochen nach Nervenkompression durchgeführt (**Abb. 6b**). Die Analyse mittels konfokaler Mikroskopie konnte bestätigen, dass Neuregulin-1 mit S100 in Schwannzellen kolokalisiert (**Abb. 6b**). Doppelfluoreszenzfärbungen von Neuregulin-1 und dem Myelin Protein Zero (P0) zeigen weiterhin, dass Neuregulin-1 exprimierende Schwannzellen an der Bildung von Myelin während der Remyelinisierung beteiligt sind (**Abb. 6c**).

### 3.3. DIE EXPRESSION VON SCHWANNZELL-NRG1 WIRD DURCH NEURONALES NRG1 REGULIERT

Eine Nervenschädigung im PNS führt temporär zu einer Reduktion des axonalen Neuregulin-1-Signals (Stassart et al. 2012a). Während dieser Zeit wird die Neuregulin-1-Expression in Schwannzellen induziert (**Abb. 6a, b**; Stassart et al. 2012a). Axonal exprimiertes Neuregulin-1 könnte daher die Schwannzell Neuregulin-1-Expression negativ regulieren.

Um diese Hypothese mit Hilfe eines einfachen experimentellen Schemas zu untersuchen, wurden primäre Ratten-Schwannzellkulturen verwendet (**Abb. 7a**). Die Schwannzellkulturen wurden für fünf Tage in einem Minimalmedium kultiviert, um den denervierten Schwannzellphänotyp zu imitieren. Anschließend wurden die Schwannzellen mit rekombinatem Neuregulin-1 (d.h. mit der EGF-like domain von Neuregulin-1) behandelt, um so das axonale Neuregulin-1-Signal zu simulieren (**Abb. 7a**). Nachfolgend wurde die mRNA Expression von *Nrg1 Typ I* in den mit Neuregulin-1 behandelten primären Schwannzellen und in unbehandelten Kontroll-Schwannzellkulturen analysiert (**Abb. 7a**). Diese Ergebnisse zeigen, dass die exogene Zugabe von rekombinatem Neuregulin-1 innerhalb von sechs Stunden eine signifikante Herunterregulation der *Nrg1 Typ I* mRNA in primären Schwannzellen induziert (**Abb. 7a**). Die Reduktion der *Nrg1 Typ I* mRNA ist dabei mindestens für 24 Stunden in den behandelten Kulturen nachweisbar (**Abb. 7a**). Als Kontrollexperiment wurde in allen untersuchten Schwannzellkulturen die mRNA Expression von *Hmgcr* gemessen, da aus der Literatur bekannt ist (Pertusa et al. 2007), dass die Behandlung mit Neuregulin-1 zu einer Induktion dieses Genes in Schwannzellen führt (**Abb. 7a**). Die Heraufregulation der *Hmgcr* mRNA nach Behandlung belegt, dass die Transkriptionsleistung nach Zugabe von Neuregulin-1 in Schwannzellen nicht generell eingeschränkt ist (**Abb. 7a**).

Die Reduktion der *Nrg1 Typ I* mRNA nach Neuregulin-1 Behandlung konnte mittels einer Western Blot Analyse auf Proteinebene bestätigt werden (**Abb. 7b**). Drei Tage nach der Behandlung mit rekombinatem Neuregulin-1 zeigen primäre Schwannzellkulturen eine deutliche Reduktion der Neuregulin-1 Protein Expression im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen (**Abb. 7b**).



**Abb. 7: Die Behandlung von primären Schwanzzellkulturen mit rekombinatem NRG1 inhibiert die NRG1 Expression in Schwannzellen.** **a:** Primäre Ratten-Schwanzzellkulturen wurden mit 20 ng/ml rekombinatem NRG1 (EGF-ähnliche Domäne) behandelt. Nicht behandelte Kontrollen sowie Schwanzzellkulturen 3,6 und 24 h nach Neuregulin-1 Behandlung wurden hinsichtlich ihrer *Nrg1 Typ 1* mRNA Expression untersucht. Dabei wurde die *Hmgcr* mRNA Expression als Positivkontrolle verwendet, da die Stimulation von Schwannzellen mit Neuregulin-1 die mRNA Expression von *Hmgcr* induziert (Pertusa et al. 2007). (AU: arbitrary units, n.s. = nicht signifikant, angegeben ist der Mittelwert und der Standardfehler, \*P<0,05). **b:** Dargestellt ist eine Western Blot Analyse von primären Schwanzzellkulturen mit einem Antikörper gegen den C-Terminus von Neuregulin-1 (Bande auf Höhe 70 kDa) sowie mit einem Antikörper gegen Tubulin als Ladekontrolle (Bande auf Höhe 55 kDa). Verglichen wurden nicht behandelte Kontrollschwanzzellen (Kontrolle) mit Schwanzzellen 3 Tage nach Behandlung mit rekombinatem Neuregulin-1 (NRG1).

Weitere Analysen *in vitro* ergaben zudem, dass primäre Schwanzzellkulturen eine signifikant geringere Expression von Neuregulin-1 aufweisen, wenn sie mit Axonen zusammen kultiviert werden (Stassart et al. 2012a). Umgekehrt zeigen Schwannzellen von Mausmutanten mit einer Hemizygotie für Neuregulin-1 Typ III eine höhere *Nrg1 Typ I* mRNA Expression *in vivo* (Stassart et al. 2012a). Verschiedene zusätzliche *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen konnten nachweisen, dass die Regulation der Schwanzzell Neuregulin-1-Typ-I-Expression durch exogenes Neuregulin-1 über die ErbB2/3 Rezeptoren und den ERK1/2 Signalweg in Schwannzellen vermittelt wird (Stassart et al. 2012a).

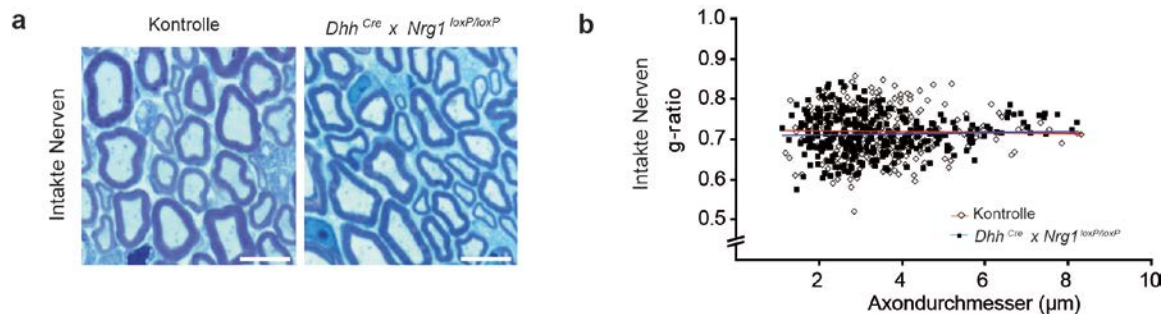
### 3.4. DIE ROLLE VON SCHWANNZELL-NRG1 FÜR DIE REMYELINISIERUNG IM PNS

Um die Funktion von Schwanzzell Neuregulin-1 *in vivo* untersuchen zu können, wurden Mausmutanten mit einer spezifischen Deletion von Neuregulin-1 in Schwannzellen generiert. Mausmutanten mit einer Expression der Cre-Rekombinase unter dem Desert hedgehog Promotor wurden hierzu mit Mäusen mit einem von zwei loxP-Stellen flankierten Neuregulin-1 Gen verpaart (*Dhh<sup>Cre</sup> x Nrg1<sup>loxP/loxP</sup>* Mäuse), (Jaegle et al. 2003, Li et al. 2002).

Die *Dhh<sup>Cre</sup> x Nrg1<sup>loxP/loxP</sup>* Mausmutanten wurden zunächst im Alter von drei Monaten analysiert (**Abb. 8a, b**). Phänotypisch weisen die Tiere zu diesem Zeitpunkt keine Auffälligkeiten auf. Lichtmikroskopische Aufnahmen von Nervenquerschnitten des N. ischiadicus lassen ebenfalls keine Unterschiede zwischen drei Monate alten *Dhh<sup>Cre</sup> x Nrg1<sup>loxP/loxP</sup>* Mäusen und



entsprechenden Kontrollen erkennen (**Abb. 8a**). Die Ergebnisse der Quantifizierung des g-ratios (auf elektronenmikroskopischer Ebene) im Verhältnis zum Axondurchmessers zeigen eine unveränderte Myelindicke in  $Dhh^{Cre} \times Nrg1^{loxP/loxP}$  Mäusen (**Abb. 8b**).



**Abb. 8: Schwanzzell-NRG1 defiziente Mäuse zeigen eine normale Myelinisierung im PNS.**

**a:** Lichtmikroskopische Aufnahmen von querangeschnittenen N. ischiadici drei Monate alter  $Dhh^{Cre} \times Nrg1^{loxP/loxP}$  Mäuse und Kontrollen. Messbalken entsprechen 7,5  $\mu\text{m}$ . **b:** Quantifizierung von **a**. Dargestellt ist das g-ratio im Verhältnis zum Axondurchmesser von n=3 N.ischiadici pro Gruppe.

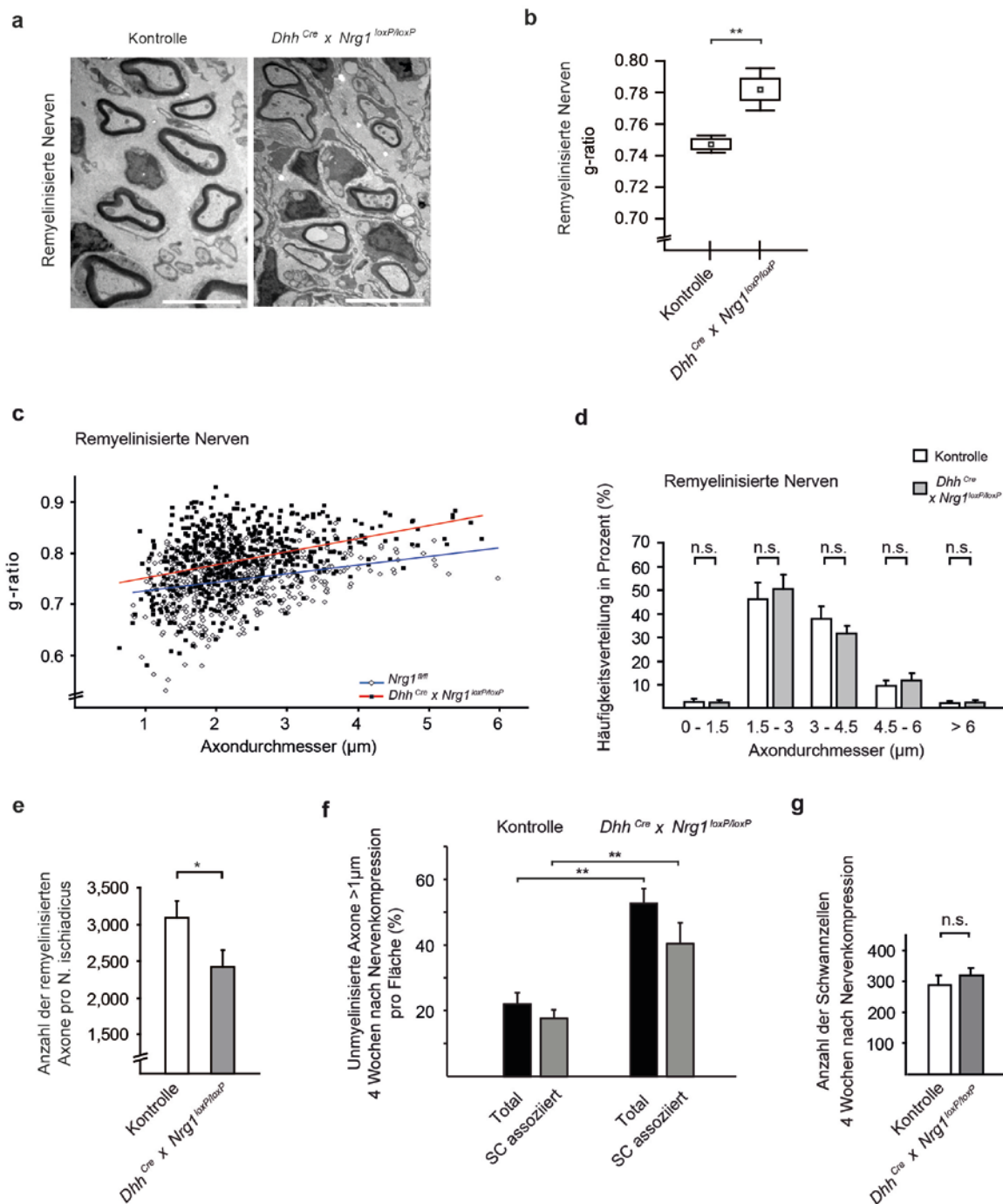
Um die Funktion von Schwanzzell Neuregulin-1 während der Nervenregeneration und Remyelinisierung zu untersuchen, wurde in  $Dhh^{Cre} \times Nrg1^{loxP/loxP}$  Mausmutanten das Nervenkompressionsmodell angewandt. Die Remyelinisierung wurde dabei zunächst vier Wochen nach der Nervenkompression histologisch untersucht (**Abb. 9a**). Elektronenmikroskopische Aufnahmen der geschädigten Nerven von  $Dhh^{Cre} \times Nrg1^{loxP/loxP}$  Mäusen lassen zahlreiche regenerierte Axone mit einer nur sehr dünnen Myelinschicht erkennen (**Abb. 9a**). Die g-ratio Analyse vier Wochen nach Nervenkompression ergab, dass Tiere mit einer Deletion von Neuregulin-1 in Schwanzzellen eine signifikant stärkere Hypomyelinisierung des distalen N. ischiadicus aufweisen als entsprechende Kontrollmäuse (**Abb. 9b**). Eine Zunahme der Hypomyelinisierung lässt sich dabei für alle untersuchten Axondurchmesser feststellen, obgleich sie im Bereich grösserer Axonkaliber deutlicher ausgeprägt ist (**Abb. 9c**). Eine Veränderung der Häufigkeitsverteilung der Axondurchmesser lässt sich in  $Dhh^{Cre} \times Nrg1^{loxP/loxP}$  Mutanten vier Wochen nach Nervenkompression nicht erkennen (**Abb. 9d**).

Im Folgenden wurde die Anzahl der remyelinisierten Axone im Nervenquerschnitt auf lichtmikroskopischer Ebene vier Wochen nach Nervenkompression quantifiziert (**Abb. 9e**). Mäuse mit einer Deletion von Neuregulin-1 in Schwanzzellen weisen in dieser Analyse eine verringerte Anzahl remyelinisierter Axone im distalen N. ischiadicus im Vergleich zu entsprechenden Kontrollen auf (**Abb. 9e**). Die Reduktion der myelinisierten Axone in  $Dhh^{Cre} \times Nrg1^{loxP/loxP}$  Mutanten könnte dabei sowohl durch eine verschlechterte axonale Regeneration, als auch durch eine fehlende Remyelinisierung regenerierter Axone entstehen. Aus diesem Grund wurden weitere Untersuchungen auf elektronenmikroskopischer Ebene durchgeführt (**Abb. 9f**). In  $Dhh^{Cre} \times Nrg1^{loxP/loxP}$  Mäusen lässt sich eine signifikant höhere Anzahl unmyelinisierter Axone mit einem Durchmesser überhalb von 1  $\mu\text{m}$  im Vergleich zu Kontrollmäusen feststellen (**Abb. 9f**). Normalerweise werden im PNS alle Axone überhalb eines

Durchmessers von 1  $\mu\text{m}$  myelinisiert. Die genauere Analyse der unmyelinisierten Axone grösser 1  $\mu\text{m}$  in den  $Dhh^{Cre} \times Nrg1^{loxP/loxP}$  Mäusen ergab, dass über zwei Drittel der unmyelinisierten Axone von Schwanzzell Zytoplasma umgeben sind (**Abb. 9f**). Die Reduktion der myelinisierten Axone im Nervenquerschnitt von  $Dhh^{Cre} \times Nrg1^{loxP/loxP}$  Mäusen (**Abb. 9e**) lässt sich somit zumindestens teilweise auf eine fehlende Schwanzzellremyelinisierung zurückzuführen (**Abb. 9f**). Elektrophysiologische Untersuchungen zeigten jedoch auch eine Reduktion des Muskelsummenaktionspotentials (CMAP) in  $Dhh^{Cre} \times Nrg1^{loxP/loxP}$  Mäusen vier Wochen nach Nervenkompression, so dass vermutlich zusätzlich auch eine eingeschränkte axonale Regeneration in den Mausmutanten vorliegt (Stassart et al. 2012a).

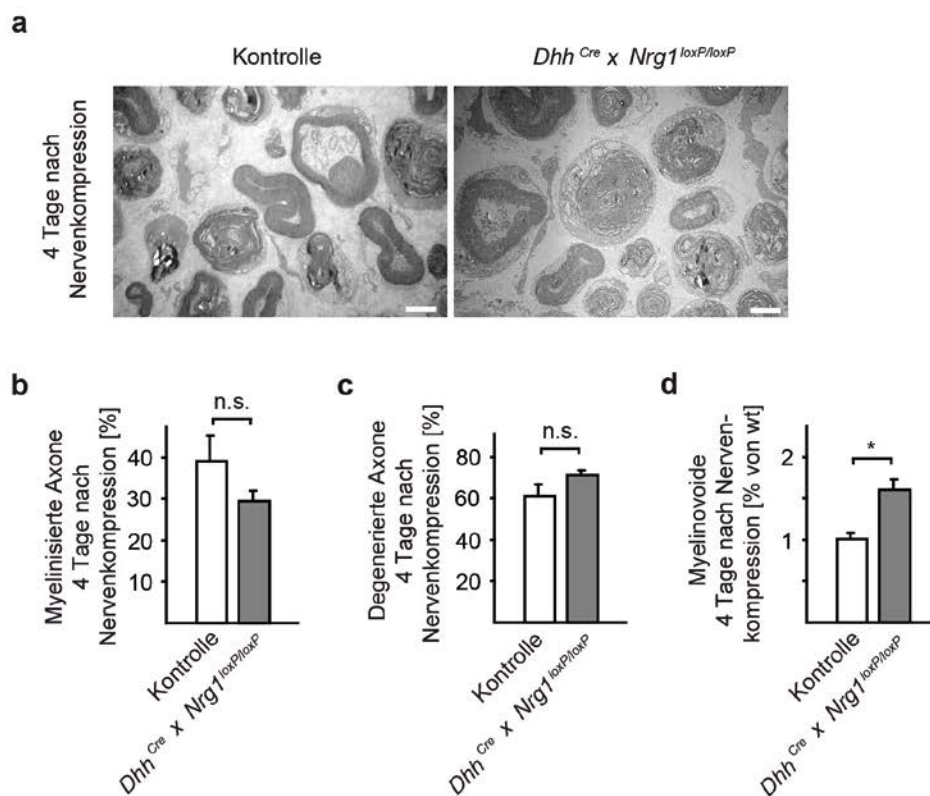
Die Anzahl der Schwanzzellen in einem 1:1 Verhältnis mit Axonen ist in  $Dhh^{Cre} \times Nrg1^{loxP/loxP}$  Mäusen im Vergleich zu Kontrolltieren vier Wochen nach Nervenkompression unverändert (**Abb. 9g**).

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die Expression von Neuregulin-1 in Schwanzzellen nach einer Schädigung des peripheren Nervens für eine effiziente und vollständige Remyelinisierung benötigt wird. Ein Verlust von Neuregulin-1 in Schwanzzellen (in  $Dhh^{Cre} \times Nrg1^{loxP/loxP}$  Mäusen) führt morphologisch zu einer Hypomyelinisierung und einer reduzierten Anzahl remyelinisierter Axone und schränkt in der Folge die Funktionalität des regenerierten Nerven ein (**Abb. 9a-g**, Stassart et al. 2012).



**Abb. 9: Die Deletion von NRG1 in Schwannzellen führt zu einer verschlechterten Remyelinisierung vier Wochen nach Nervenkompression.** **a:** Repräsentative elektronenmikroskopische Aufnahmen querangeschnittener N. ischiadici von Kontrollmäusen und *Dhh<sup>Cre</sup> x Nrg1<sup>loxP/loxP</sup>* Tieren. Die Messbalken entsprechen 5 µm. **b:** Die Quantifizierung der Myelindicke mittels g-ratio Analyse zeigt eine Zunahme der Hypomyelinisierung in *Dhh<sup>Cre</sup> x Nrg1<sup>loxP/loxP</sup>* Mäusen (n=3-4 pro Gruppe). **c:** Dargestellt ist das g-ratio im Verhältnis zum Axondurchmesser (n=3 pro Gruppe). **d:** Licht-mikroskopische Analyse der Axondurchmesser in Kontrollen und *Dhh<sup>Cre</sup> x Nrg1<sup>loxP/loxP</sup>* Mäusen. **e:** Die Anzahl der remyelinisierten Axone (pro N. ischiadicus Querschnitt) ist in *Dhh<sup>Cre</sup> x Nrg1<sup>loxP/loxP</sup>* Mäusen reduziert **f:** Die Anzahl der unmyelinisierten Axone über einem Durchmesser von 1 µm pro Fläche. Quantifiziert wurde zum einen die Totalanzahl der Axone sowie diejenigen Axone, die mit Schwannzellen assoziiert, aber nicht remyelinisiert sind. N=3 pro Gruppe. **g:** Dargestellt ist die Anzahl der Schwannzellen in einem 1:1 Verhältnis mit Axonen pro querangeschnittenem N. ischiadicus (n=3 pro Gruppe). (n.s. = nicht signifikant; \*P<0,05; \*\*P<0,01).

Um die Funktion von Schwanzzell Neuregulin-1 für die Remyelinisierung und Regeneration des peripheren Nerven besser zu verstehen, wurden weitere Zeitpunkte nach Nervenschädigung in *Dhh<sup>Cre</sup> x Nrg1<sup>loxP/loxP</sup>* Mäusen charakterisiert. Dabei wurden die Mausmutanten zunächst vier Tage nach Nervenkompression untersucht, um die Wallerische Degeneration und somit die Dedifferenzierungsphase von Schwanzzellen zu analysieren. Ein Teil der Axone ist zu diesem Zeitpunkt bereits vollständig degeneriert, während andere Axone noch relativ gut erhalten sind. Weiterhin lassen sich während dieser Phase zahlreiche kollabierte Myelinscheiden, sogenannte Myelinovoide, feststellen. Diese werden in der Folge von Makrophagen und Schwanzzellen selbst phagozytiert.



**Abb. 10: Der Einfluss von Schwanzzell-NGR1 auf die Wallerische Degeneration vier Tage nach Nervenkompression.** **a:** Repräsentative elektronenmikroskopische Aufnahmen des querangeschnittenen N. ischiadicus von Kontrollen und *Dhh<sup>Cre</sup> x Nrg1<sup>loxP/loxP</sup>* Mäusen. Messbalken entspricht 5  $\mu$ m. **b:** Die Anzahl myelinisierter Axone (dargestellt als Prozentsatz der Totalanzahl der Axone (myelinisiert und degeneriert (siehe c))) ist in *Dhh<sup>Cre</sup> x Nrg1<sup>loxP/loxP</sup>* Mäusen im Vergleich zu Kontrollen unverändert. **c:** Ebenfalls zeigt sich kein Unterschied in der Anzahl der degenerierten Axone zwischen beiden Gruppen **d:** *Dhh<sup>Cre</sup> x Nrg1<sup>loxP/loxP</sup>* Mäuse weisen während der Wallerischen Degeneration eine erhöhte Anzahl an Myelinovoiden im Vergleich zu Kontrolltieren auf. (n.s. = nicht signifikant; \* $P < 0,05$ ).

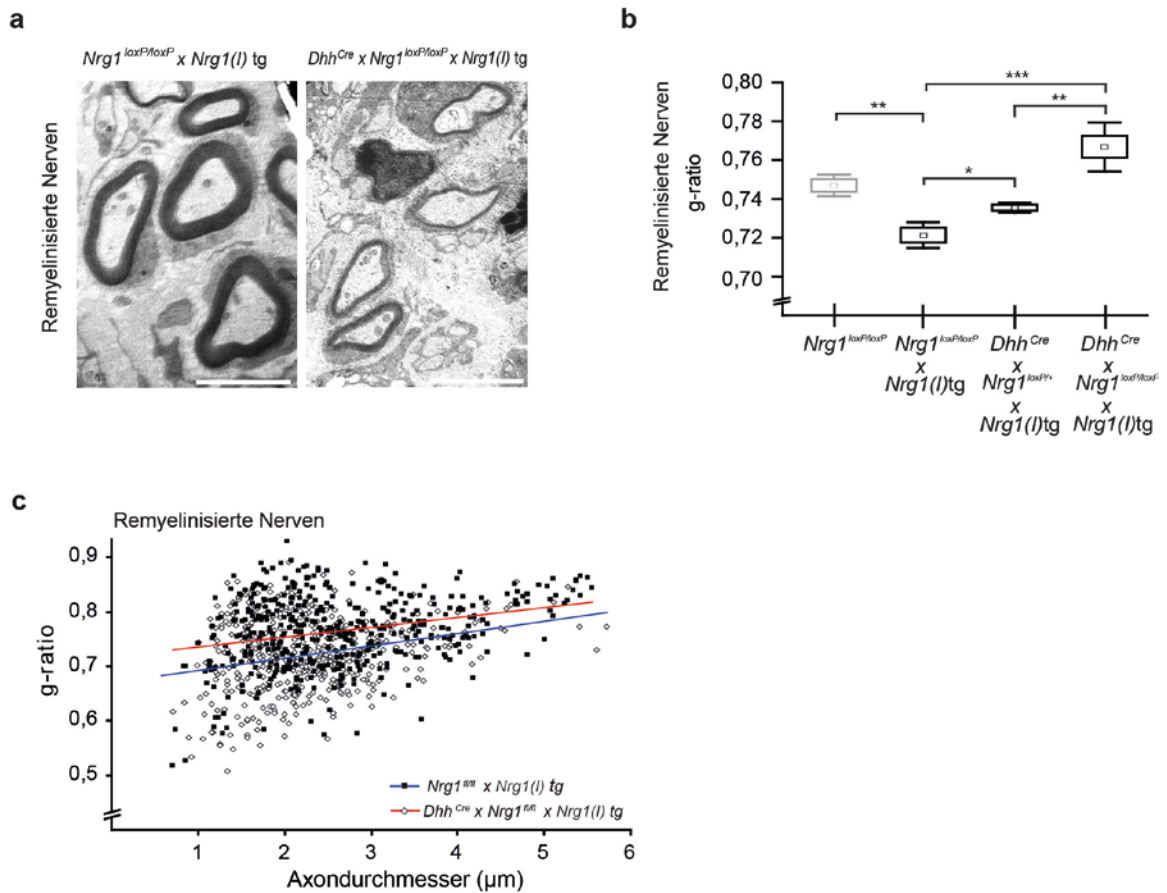
Die Analyse der Wallerischen Degeneration erfolgte auf elektronenmikroskopischer Ebene. Der distale N. ischiadicus von Mäusen mit einer Deletion von Schwanzzell Neuregulin-1 weist keinen Unterschied in der Anzahl der myelinisierten, noch nicht degenerierten Axone vier Tage nach Nervenkompression im Vergleich zu Kontrollen auf (**Abb. 10a,b**). Ebenfalls zeigt sich eine unveränderte Anzahl an Axonen mit Anzeichen einer Degeneration in *Dhh<sup>Cre</sup> x Nrg1<sup>loxP/loxP</sup>*

Mäusen (**Abb. 10c**). Hingegen weisen  $Dhh^{Cre} \times Nrg1^{loxP/loxP}$  Mäuse im distalen N. ischiadicus eine erhöhte Anzahl von Myelinovoiden auf (**Abb. 10a,d**).

Zwei Wochen nach Nervenkompression, d.h. zu Beginn der Remyelinisierung, zeigen  $Dhh^{Cre} \times Nrg1^{loxP/loxP}$  Mäuse eine reduzierte Anzahl remyelinisierter Axone im Vergleich zu Kontrollmäusen (Stassart et al. 2012a). Zu diesem Zeitpunkt lässt sich zudem eine verringerte Anzahl an Schwannzellen feststellen, die den Transkriptionsfaktor EGR2 exprimieren (Stassart et al. 2012a). Die Schwanzzellproliferation und die Anzahl der Schwannzellen sind jedoch auch zwei Wochen nach Nervenkompression unverändert (Stassart et al. 2012a).

### 3.5. AXONALES NRG1 TYP I KANN DEN VERLUST VON SCHWANNZELL-NRG1 NICHT KOMPENSIEREN

Die neuronale Überexpression von Neuregulin-1 Typ I führt zu einer verbesserten Remyelinisierung nach Nervenkompression. Um die Funktionen von axonal und glial exprimiertem Neuregulin-1 besser zu verstehen, wurden im Folgenden Mäuse mit einer neuronalen Überexpression von Neuregulin-1 Typ I mit  $Dhh^{Cre} \times Nrg1^{loxP/loxP}$  Tieren verpaart. In diesen Doppelmütanten wurde das Nervenkompressionsmodell angewandt, und der N. ischiadicus vier Wochen nach Nervenschädigung untersucht. Elektronenmikroskopische Aufnahmen des distalen N. ischiadicus zu diesem Zeitpunkt lassen erneut die vollständige Wiederherstellung der Myelindicke in Tieren mit einer neuronalen Überexpression von Neuregulin-1 Typ I erkennen. Im Gegensatz dazu weisen  $Nrg1(I)$  transgene Tiere verpaart mit  $Dhh^{Cre} \times Nrg1^{loxP/loxP}$  Mäusen eine deutlich schlechtere Remyelinisierung auf (**Abb. 11a**). Die Quantifizierung mittels g-ratio Analyse zeigte entsprechend eine signifikante Reduktion der Myelindicke in den Doppelmütanten ( $Dhh^{Cre} \times Nrg1^{loxP/loxP} \times Nrg1(I)$  tg) im Vergleich zu  $Nrg1(I)$  transgenen Mäusen (**Abb. 11b**). Der Vergleich von  $Nrg1(I)$  tg Mäusen mit einer Hemizygotie für Schwanzzell Neuregulin-1 mit Mäusen mit einer homozygoten Deletion von Schwanzzell Neuregulin-1 ergab zudem, dass die Reduktion der Myelindicke in diesen Mutanten von der Schwanzzell Neuregulin-1 Gendosis abhängig ist (**Abb. 11b**). Die Hypomyelinisierung in den  $Dhh^{Cre} \times Nrg1^{loxP/loxP} \times Nrg1(I)$  tg Mäusen ist unabhängig vom Axondurchmesser, und lässt sich im Bereich aller Axonkaliber beobachten (**Abb. 11c**). Diese Ergebnisse zeigen zusammenfassend, dass die axonale Überexpression von Neuregulin-1 Typ I eine Deletion von Schwanzzell Neuregulin-1 in konditionalen Mausmutanten nach Nervenkompression nicht kompensieren kann.



**Abb. 11: Die neuronale Überexpression von NRG1 Typ I kann den Verlust von Schwanzzell-NRG1 vier Wochen nach Nervenkompression nicht kompensieren.** **a:** Repräsentative elektronenmikroskopische Aufnahmen des quer angeschnittenen N. ischiadicus von Kontrollmäusen mit einer neuronalen Überexpression von Neuregulin-1 Typ I (*Nrg1<sup>loxP/loxP</sup> x Nrg1(I) tg*) sowie von *Nrg1(I)* transgenen Mäusen verpaart mit *Dhh<sup>Cre</sup> x Nrg1<sup>loxP/loxP</sup>* Tieren. Die Messbalken entsprechen 5 µm. **b:** Die Quantifizierung der Myelindicke mittels g-ratio Analyse lässt eine Hypomyelinisierung in *Nrg1(I)* transgenen Tieren verpaart mit Mäusen mit einem Verlust von Schwanzzell-Neuregulin-1 Gendosis (*Nrg1<sup>loxP/loxP</sup>* und *Nrg1<sup>loxP/loxP</sup> x Nrg1(I) tg* je n=3; *Dhh<sup>Cre</sup> x Nrg1<sup>loxP/loxP</sup> x Nrg1(I) tg* und *Dhh<sup>Cre</sup> x Nrg1<sup>loxP/+</sup> x Nrg1(I) tg* je n=5). **c:** Dargestellt ist das Verhältnis von g-ratio zu Axondurchmesser. Die Reduktion der Myelindicke in den Doppelmutanten lässt sich im Bereich aller Axondurchmesser erkennen (n=3 pro Gruppe); (\*P<0,05; \*\*P<0,01; \*\*\*P<0,001).

## 4. DISKUSSION

### 4.1. SCHWANNZELLEN REAGIEREN AUCH NACH EINER NERVENSCHÄDIGUNG AUF AXONAL EXPRIMIERTES NEUREGULIN-1

Die Entwicklung von Schwannzellen im peripheren Nervensystem wird maßgeblich durch die neuronale Expression von Neuregulin-1 Typ III gesteuert (Nave und Salzer 2006). Axonal exprimiertes Neuregulin-1 Typ III kontrolliert zudem die Myelindicke im PNS (Michailov et al. 2004). Obwohl das periphere Nervensystem eine herausragende Plastizität und Regenerationsfähigkeit nach einer Nervenverletzung aufweist, zeigen Schwannzellen häufig nur eine unvollständige Remyelinisierung und die Myelindicke regenerierter Axone erreicht nicht wieder ihren ursprünglichen Wert (Jessen und Mirsky 2008, Schröder 1972, Sherman und Brophy 2005). Verlieren Schwannzellen nach einer Nervenverletzung die Fähigkeit, den Axondurchmesser – d.h. den Surrogatmarker Neuregulin-1 Typ III auf der axonalen Oberfläche – wahrzunehmen? Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass die neuronale Überexpression von Neuregulin-1 Typ III in transgenen Tieren auch nach einer Nervenschädigung zu einer Hypermyelinisierung führt, die in etwa der Hypermyelinisierung während der Entwicklung entspricht (Michailov et al. 2004). Im Gegensatz zur Entwicklung beeinflusst jedoch nicht nur Neuregulin-1 Typ III, sondern auch Neuregulin-1 Typ I die Remyelinisierung im PNS. Die Überexpression von Neuregulin-1 Typ I führt dabei zu einer Rekonstitution der physiologischen Myelindicke regenerierter Axone.

Redifferenzierte Schwannzellen bleiben demnach auch nach einer Nervenschädigung Neuregulin-1 responsibel. Dies bedeutet, dass Schwannzellen nach einem Nervenschaden die „normale“ Myelindicke wieder herstellen können, wenn ein ausreichendes Angebot an neuronal exprimiertem Neuregulin-1 vorliegt.

Nach einem akuten Nervenschaden degenerieren die Axone distal des Schädigungsortes im Rahmen der Wallerischen Degeneration (Jessen und Mirsky 2008, Chen et al. 2007). Die neu auswachsenden Nervenfasern erreichen erst nach einigen Wochen ihren Zielort (Jessen und Mirsky 2008, Chen et al. 2007). Die Schwannzellen distal der Schädigung verlieren in dieser Zeit den Kontakt zum Axon und sind denerviert. Folglich können Schwannzellen währenddessen nicht durch axonal exprimiertes Neuregulin-1 stimuliert werden. Im Gegensatz zur Entwicklung weisen Schwannzellen nach einer Nervenschädigung somit die Fähigkeit auf, ohne axonalen Kontakt und neuronales Neuregulin-1-Signal die initiale Redifferenzierung (nach abgeschlossener Dedifferenzierungsphase) auszuführen.

### 4.2. SCHWANNZELLEN EXPRIMIEREN NEUREGULIN-1 TYP I NACH EINER NERVENVERLETZUNG

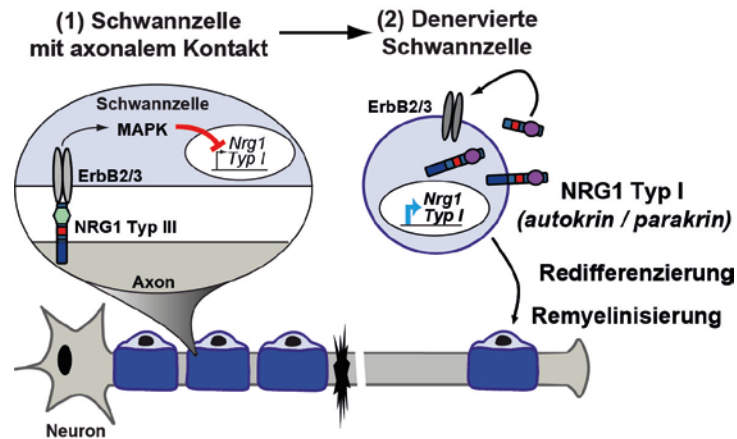
Bisher wurden keine spezifischen Faktoren identifiziert, die die Redifferenzierung von Schwannzellen nach einer Nervenverletzung regulieren. Jedoch wurde schon in früheren

Studien beobachtet, dass die Expression von Neuregulin-1 im N. ischiadicus nach einer Schädigung induziert wird (Carroll et al. 1997). Neuregulin-1, spezifisch die Typ-I-Isoform, wird dabei insbesondere zwischen dem 1. und 14. Tag, d.h. zu frühen Zeitpunkten nach einer Nervenverletzung heraufreguliert (Stassart et al. 2012a). Schwannzellen exprimieren folglich Neuregulin-1 Typ I, wenn sie den Kontakt zu Axonen, und somit auch zu axonal exprimiertem Neuregulin-1, verloren haben. Im nicht geschädigten Nerven hingegen weisen Schwannzellen nur eine sehr geringe Neuregulin-1-Expression auf.

Wie wird die Neuregulin-1-Expression in Schwannzellen reguliert? Die Behandlung von primären Schwannzellkulturen mit exogenem, rekombinantem Neuregulin-1 inhibiert die Expression von Schwannzell Neuregulin-1 Typ I sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene. Diese Ergebnisse konnten mit verschiedenen weiteren *in vitro* und *in vivo* Analysen bestätigt werden (Stassart et al. 2012a). Zudem wurde gezeigt, dass ErbB2/3 Rezeptoren und der MAPK Signalweg die Herunterregulation der Neuregulin-1-Typ-I-Expression durch exogenes Neuregulin-1 vermitteln (Stassart et al. 2012a).

In der Zusammenschau führten diese Ergebnisse zu dem hypothetischen Modell, dass die axonale Neuregulin-1-Expression im nicht geschädigten Nerven die Expression von Schwannzell Neuregulin-1 über ErbB2/3 Rezeptoren auf der glialen Zellmembran und den MAPK Signalweg inhibiert (**Abb.12**). Im Fall einer Nervenschädigung wird diese Inhibition durch den Verlust des axonalen Neuregulin-1-Signals aufgehoben, und die denervierte Schwannzelle induziert selbst die Expression von Neuregulin-1 Typ I (**Abb. 12**). Prinzipiell könnten auch andere Faktoren wie die Demyelinisierung und die Dedifferenzierung von Schwannzellen nach einer Nervenschädigung zu einer Induktion von Schwannzell Neuregulin-1 beitragen. Interessanterweise lässt sich die Heraufregulation von Neuregulin-1 in Schwannzellen jedoch auch in Mausmutanten mit einer Hemizygotie für Neuregulin-1 Typ III ohne zusätzliche Nervenschädigung (und folglich ohne Demyelinisierung und Dedifferenzierung) beobachten (Stassart et al. 2012a).





**Abb. 12: Modell zur Funktion von NRG1 im intakten Nerv und nach einer Nervenschädigung.**

**a:** In nicht geschädigten, intakten Nerven reguliert Neuregulin-1 Typ III, exprimiert auf der axonalen Oberfläche, die Schwanzzellentwicklung und die Myelindicke im PNS. Solange die Schwanzzelle Kontakt zum Axon hat, wird die Schwanzzell Expression von Neuregulin-1 Typ I über ErbB2/3 Rezeptoren und den MAPK Signalweg inhibiert. Nach einer Nervenschädigung kommt es temporär (aufgrund der Wallerischen Degeneration) zu einem Verlust des axonalen Kontaktes, und die Schwanzzellen sind denerviert. Während dieses Zeitraumes empfangen die Schwanzzellen kein axonales Neuregulin-1-Signal. Die Inhibition von Schwanzzell Neuregulin-1 wird somit aufgehoben, und Schwanzzellen synthetisieren selbst Neuregulin-1 Typ I. Schwanzzell Neuregulin-1 Typ I unterstützt während der Abwesenheit von neuronalem Neuregulin-1 Typ III die Redifferenzierung und Remyelinisierung von Schwanzzellen im regenerierten Nerven.

#### 4.3. SCHWANNZELL-NRG1 BEEINFLUSST DIE SCHWANNZELL-REDIFFERENZIERUNG

Eine spezifische Deletion von Neuregulin-1 in Schwanzzellen (in  $Dhh^{Cre} \times Nrg1^{loxP/loxP}$  Mäusen) führt während der Entwicklung des peripheren Nervensystems zu keinen Auffälligkeiten, und die Nerven adulter Mäuse zeigen eine unveränderte Myelindicke. Dass Schwanzzell Neuregulin-1 für die Funktion des ungeschädigten peripheren Nerven nicht erforderlich ist, könnte durch die kontinuierliche Stimulation von Schwanzzellen mit axonal exprimiertem Neuregulin-1 Typ III während der Entwicklung erklärt werden. Diese Ergebnisse sind somit gut vereinbar mit einer spezifischen Rolle von Schwanzzell Neuregulin-1 für Situationen, in denen axonal exprimiertes Neuregulin-1 fehlt.

Tatsächlich zeigen Schwanzzell Neuregulin-1 defiziente Mäuse nach einer Nervenschädigung eine verschlechterte Remyelinisierung mit einer verstärkten Hypomyelinisierung sowie einer Reduktion der Anzahl remyelinisierter Axone. Während der Dedifferenzierungsphase ist die Anzahl der degenerierten und noch erhaltenen Axone in  $Dhh^{Cre} \times Nrg1^{loxP/loxP}$  Mäusen unverändert. Allerdings zeigen die Mutanten eine erhöhte Anzahl an Myelinovoiden. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass der Prozess der Wallerischen Degeneration in den Mutanten geringfügig schneller verläuft. Möglicherweise ist Schwanzzell Neuregulin-1 an der Feinregulierung der Demyelinisierung und der Dedifferenzierung von Schwanzzellen beteiligt, indem es als Differenzierungsfaktor den zeitlichen Ablauf der Wallerischen Degeneration verlangsamt. Um diese Beobachtungen besser zu verstehen, sind zusätzliche Analysen zu verschiedenen Zeitpunkten während der Dedifferenzierungsphase notwendig.

Im weiteren Verlauf der Nervenregeneration (zwei Wochen nach Nervenkompression) zeigen Mäuse mit einer Deletion von Schwanzzell Neuregulin-1 eine eingeschränkte Redifferenzierung mit einer reduzierten Expression des Transkriptionsfaktors EGR2 im Vergleich zu Kontrollmäusen (Stassart et al. 2012a).

Die Induktion der Expression von Neuregulin-1 in Schwanzzellen ist demnach notwendig, um die Schwanzzellredifferenzierung im richtigen Zeitfenster zu induzieren, und in der Folge eine erfolgreiche Remyelinisierung im peripheren Nervensystem zu gewährleisten (**Abb.12**). Schwanzzell Neuregulin-1 stellt somit einen spezifischen, endogenen Reparatur-Wachstumsfaktor für Schwanzzellen nach einer Nervenschädigung dar. Ob Schwanzzell Neuregulin-1 seine Wirkung über einen autokrinen oder einen parakrinen Signalweg vermittelt, muss in weiterführenden Studien untersucht werden.

#### 4.5. DIE FUNKTION VON GLIALEM UND NEURONALEM NRG1 TYP I WÄHREND DER REMYELINISIERUNG

Was ist die spezifische Rolle der Typ-I-Isoform von Neuregulin-1 für die Remyelinisierung des peripheren Nervensystems? Die neuronale Überexpression von Neuregulin-1 Typ I in transgenen Mäusen führt zu einer deutlich verbesserten Remyelinisierung mit einer Wiederherstellung der ursprünglichen, physiologischen Myelindicke. In Schwanzzellen wird die Expression von Neuregulin-1 Typ I (und nicht von Typ II und III) nach einer Nervenschädigung induziert, und eine Deletion von Neuregulin-1 in Schwanzzellen führt zu einer verschlechterten Remyelinisierung im PNS.

Die endogene Expression von Neuregulin-1 Typ I in Motoneuronen und Spinalganglien ist sehr gering (Falls 2003, Loeb et al. 1999), und während der Entwicklung ist Neuregulin-1 Typ I nicht an der Regulation der Myelindicke beteiligt (Michailov et al. 2004). Demnach stellt die neuronale Überexpression eine sehr artifizielle Situation dar und es ist folglich eher unwahrscheinlich, dass die endogene neuronale Expression von Neuregulin-1 Typ I in Neuronen peripherer Axone *in vivo* während der Remyelinisierung von Bedeutung ist. Neuregulin-1 Typ I wirkt jedoch im Gegensatz zu Neuregulin-1 Typ III als parakrines Signal (Falls 2003). Dies hat insbesondere nach einem Nervenschaden den Vorteil, dass das Neuregulin-1 Typ I Signal denervierte Schwanzzellen über eine verhältnismäßig grössere Distanz erreichen kann.

Simuliert nach einem Nervenschaden die neuronale Neuregulin-1 Typ I Überexpression die Induktion von Neuregulin-1 Typ I in Schwanzzellen? Interessanterweise zeigen *Nrg1 Typ I* transgene Tiere, verpaart mit *Dhh<sup>Cre</sup> x Nrg1<sup>loxP/loxP</sup>* Mäuse keine verbesserte Remyelinisierung als reine *Dhh<sup>Cre</sup> x Nrg1<sup>loxP/loxP</sup>* Tiere. Die neuronale Überexpression von Neuregulin-1 Typ I kann also den Verlust von Schwanzzell Neuregulin-1 nicht kompensieren. Neuronales und gliales Neuregulin-1 Typ I müssen sich dennoch funktionell nicht unterscheiden. Vielmehr scheint der zeitliche Verlauf der Remyelinisierung und der Neuregulin-1-Expression in beiden Zelltypen eine wesentliche Rolle zu spielen. Das axonale Neuregulin-1-Signal kann die Schwanzzellen erst wieder nach erfolgter axonaler Regeneration erreichen. Dass heisst, auch in Mäusen mit

einer neuronalen Neuregulin-1 Typ I Überexpression fehlt denervierten Schwannzellen zunächst das axonale Neuregulin-1 Typ I Signal. In dieser Phase müssen Schwannzellen jedoch dedifferenzieren, proliferieren und die initiale Redifferenzierung beginnen. In dieser Zeit sind Schwannzellen folglich abhängig von selbst exprimierten Wachstumsfaktoren, d.h. sie benötigen endogenes Neuregulin-1 Typ I. Wenn die initiale Redifferenzierung aufgrund der Deletion von Neuregulin-1 in Schwannzellen in diesem Zeitfenster nicht erfolgen kann, kann auch axonales Neuregulin-1 Typ I (welches erst viel später in der Remyelinisierung die Schwannzellen erreicht) den Redifferenzierungsdefekt nicht mehr kompensieren.

Zusammenfassend beeinflusst nach diesem Modell Schwannzell Neuregulin-1 Typ I die frühe Redifferenzierung und Remyelinisierung, während axonal exprimiertes Neuregulin-1 (Typ I und III) die terminale Remyelinisierung und die Myelindicke regenerierter Axone reguliert.

Für das Zeitfenster nach einer Nervenverletzung, in dem Schwannzellen durch Wallerische Degeneration den axonalen Kontakt verlieren, wechselt die für die Regeneration notwendige Neuregulin-1-Expression temporär von Axonen zu Schwannzellen selbst. Dieses Zeitfenster stellt somit einen interessanten Ansatzpunkt für zukünftige therapeutische Strategien zur Verbesserung der Remyelinisierung und Regeneration im PNS dar.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Im Gegensatz zu den meisten reifen Geweben weist das periphere Nervensystem eine ausgeprägte Regenerationsfähigkeit nach Verletzungen auf (Jessen und Mirsky 2008). Schwannzellen zeigen während der Nervenregeneration eine erstaunliche Plastizität, indem sie zunächst in proliferierende Vorläuferzellen dedifferenzieren um anschließend in remyelinisierende, reife Schwannzellen zu redifferenzieren (Jessen und Mirsky 2008). Die Myelindicke regenerierter Axone erreicht jedoch nicht wieder den ursprünglichen, physiologischen Durchmesser, und die Nervenfasern bleiben hypomyelinisiert (Schröder 1972, Sherman und Brophy 2005).

Während der Entwicklung des peripheren Nervensystems kontrolliert axonal exprimiertes Neuregulin-1 Typ III alle Stadien der Schwanzzellentwicklung und reguliert die Myelindicke (Michailov et al. 2004). Auch nach einer Nervenschädigung bleibt Neuregulin-1 für eine erfolgreiche Remyelinisierung essentiell (Fricker et al. 2011, Stassart et al. 2013), die Rolle von Neuregulin-1 unterscheidet sich jedoch in vieler Hinsicht von der während der Entwicklung.

In der vorliegenden Promotionsarbeit konnte gezeigt werden, dass nach einer Nervenverletzung durch die transgene Überexpression von Neuregulin-1 Typ III in Neuronen eine Hypermyelinisierung der regenerierten Axone induziert werden kann. Im Gegensatz zur Entwicklung führt jedoch auch die axonale Überexpression der parakrinen Neuregulin-1 Typ-I-Isoform zu einer verbesserten Remyelinisierung, und die Myelindicke erreicht in diesen Tieren ihren ursprünglichen, physiologischen Wert. Schwannzellen verlieren folglich nach einer Nervenverletzung nicht die Fähigkeit auf axonal exprimiertes Neuregulin-1 zu reagieren.

Nach einer Nervenschädigung werden Schwannzellen – im Unterschied zur Nervenentwicklung – nicht kontinuierlich durch axonal exprimiertes Neuregulin-1 stimuliert, da die Axone distal der Schädigung im Rahmen der Wallerischen Degeneration abgebaut werden. Dies bedeutet, dass denervierten Schwannzellen temporär das neuronale Neuregulin-1-Signal fehlt. Während dieses Zeitraumes „wechselt“ die Neuregulin-1-Expression von Axonen zu Schwannzellen, welche innerhalb eines Tages nach einer Nervenschädigung spezifisch die Synthese von Neuregulin-1 Typ I induzieren. Eine erhöhte Schwanzzell Neuregulin-1-Typ-I-Expression ist dabei insbesondere während der frühen Remyelinisierung, d.h. in den ersten 14 Tagen nach Nervenschädigung, zu beobachten.

Axonal exprimiertes Neuregulin-1 reguliert die *de novo* Synthese von Schwanzzell Neuregulin-1 Typ I. *In vitro* Analysen ergaben, dass die Behandlung von primären Schwanzzellkulturen mit exogenem, rekombinantem Neuregulin-1 zu einer Inhibition der Schwanzzell Neuregulin-1-Typ-I-Expression führt. Weiterführende Untersuchungen zeigten, dass exogenes (axonales) Neuregulin-1 über ErbB2/3 Rezeptoren und den MAPK Signalweg die Expression von Schwanzzell Neuregulin-1 Typ I negativ reguliert (Stassart et al. 2013).

Die *in vivo* Relevanz der Schwanzzell Neuregulin-1-Expression nach einer Nervenschädigung konnte mit Hilfe von Mausmutanten mit einer Deletion von Schwanzzell Neuregulin-1 (*Dhh<sup>Cre</sup> x Nrg1<sup>loxP/loxP</sup>* Mäuse) nachgewiesen werden. Die Analyse dieser Mutanten ergab, dass

Schwanzzell Neuregulin-1 für die frühe Redifferenzierung und Remyelinisierung nach Nervenschädigung benötigt wird, wohingegen es im intakten Nerven entbehrlich ist.

Die Überexpression von neuronalem Neuregulin-1 Typ I (in *Nrg1 Typ I* tg Tieren, die eine Rekonstitution der Myelindicke nach Nervenschädigung aufweisen) kann dabei den Verlust von Schwanzzell Neuregulin-1 (in einer Verpaarung mit *Dhh<sup>Cre</sup> x Nrg1<sup>loxP/loxP</sup>* Mäusen) nicht kompensieren. Die Funktionen von glialem und neuronalem Neuregulin-1 sind demnach im zeitlichen Verlauf der Remyelinisierung verschieden.

Zusammenfassend ist die Funktion von Neuregulin-1 nach einer Nervenschädigung wesentlich komplexer als während der Entwicklung, und umfasst sowohl axonal als auch glial exprimiertes Neuregulin-1. Gliales Neuregulin-1 Typ I wird induziert, wenn Schwanzzellen den Kontakt zu Axonen und axonal exprimiertem Neuregulin-1 Typ III verloren haben. Schwanzzell Neuregulin-1 dient dabei als endogener Wachstumsfaktor, welcher spezifisch die initiale Redifferenzierungs- und Remyelinisierungsphase von Schwanzzellen beeinflusst. Neuronal exprimiertes Neuregulin-1 (Typ I und III) reguliert hingegen die terminale Redifferenzierung und die Myelindicke nach einer Nervenschädigung im PNS.

## 6. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1:	Die Entwicklung von Schwannzellen im peripheren Nerv	12
Abbildung 2:	Die Struktur der Neuregulin-1-Isoformen Typ I-III	14
Abbildung 3:	Die neuronale Überexpression von NRG1 Typ III führt zu einer Hypermyelinisierung nach Nervenkompression	42
Abbildung 4:	Neurales NRG1 Typ I verbessert die Remyelinisierung im PNS	44
Abbildung 5:	Die Schwanzzellproliferation und Differenzierung ist nach Nervenkompression in Nrg1 Typ I transgenen Tieren unverändert	45
Abbildung 6:	Schwannzellen exprimieren Neuregulin-1 nach Nervenkompression im PNS	47
Abbildung 7:	Die Behandlung von primären Schwanzzellkulturen mit rekombinantem NRG1 inhibiert die NRG1 Expression in Schwannzellen	49
Abbildung 8:	Schwanzzell Neuregulin-1 defiziente Mäuse zeigen eine normale Myelinisierung im PNS	50
Abbildung 9:	Die Deletion von Neuregulin-1 in Schwannzellen führt zu einer verschlechterten Remyelinisierung vier Wochen nach Nervenkompression	52
Abbildung 10:	Der Einfluss von Schwanzzell Neuregulin-1 auf die Wallerische Degeneration vier Tage nach Nervenkompression	53
Abbildung 11:	Die neuronale Überexpression von Neuregulin-1 Typ I kann den Verlust von Schwanzzell Neuregulin-1 vier Wochen nach Nervenkompression nicht kompensieren	55
Abbildung 12:	Model zur Funktion von Neuregulin-1 im intakten Nerv und nach einer Nervenschädigung	58

## 7. LITERATURVERZEICHNIS

Arthur-Farraj PJ et al. (2012): c-Jun reprograms Schwann cells of injured nerves to generate a repair cell essential for regeneration. *Neuron* 75 (4), 633-647

Atanasoski S, Scherer SS, Sirkowski E, Leone D, Garrat AN, Birchmeier C, Suter U (2006): ErbB2 signaling in Schwann cells is mostly dispensable for maintenance of myelinated peripheral nerves and proliferation of adult Schwann cells after injury. *J Neurosci* 26 (7), 2124-2131

Bähr M, Frotscher M, Küker W: *Duus' Neurologisch-topische Diagnostik*. 8., komplett überarbeitete Auflage; Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2003

Bermingham-McDonogh O, Xu YT, Marchionni MA, Scherer SS (1997): Neuregulin expression in PNS neurons: isoforms and regulation by target interactions. *Mol Cell Neurosci* 10(3-4), 184-195

Birchmeier C, Nave KA (2008): Neuregulin-1, a key axonal signal that drives Schwann cell growth and differentiation. *Glia* 56 (14), 1491-1497

Bosse F (2012): Extrinsic cellular and molecular mediators of peripheral axonal regeneration. *Cell Tissue Res* 349 (1), 5-14

Brinkmann BG et al. (2008): Neuregulin-1/ErbB signaling serves distinct function in myelination of the peripheral and central nervous system. *Neuron* 59 (4), 581-595

Carroll SL, Miller ML, Frohnert PW, Kim SS, Corbett JA (1997): Expression of neuregulins and their putative receptors, ErbB2 and ErbB3, is induced during Wallerian degeneration. *J Neurosci* 17(5), 1642-1659

Campbell NA, Reece JB: *Biologie*. 6. Auflage; Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg 2003

Chen ZL, Yu WM, Strickland S (2007): Peripheral regeneration. *Annu Rev Neurosci* 30, 209-233

Eckert R, Burggren W, French K, Randall D: *Tierphysiologie*. 4. Auflage; Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2002

Emery B (2010): Transcriptional and post-transcriptional control of CNS myelination. *Curr Opin Neurobiol* 20 (5), 601-607

Emery B (2010a): Regulation of oligodendrocyte differentiation and myelination. *Science* 330 (6005), 779-782

Falls DL (2003): Neuregulins: functions, forms, and signaling strategies. *Exp Cell Res* 284 (1), 14-30

Friede RL, Bischhausen R (1982): How are sheath dimensions affected by axon caliber and internode length. *Brain Res* 235 (2), 335-350

Fricker FR et al. (2011): Axonally derived neuregulin-1 is required for remyelination and regeneration after nerve injury in adulthood. *J Neurosci* 31 (9), 3225-3333

Fricker FR, Bennett DL (2011): The role of neuregulin-1 in the response to nerve injury. *Future Neurol* 6 (6), 809-822

Frostick SF, Yin Q, Kemp GJ (1998): Schwann cells, neurotrophic factors, and peripheral nerve regeneration. *Microsurgery* 18 (7), 397-405

Griffin JW, Thompson WJ (2008): Biology and pathology of nonmyelinating Schwann cells. *Glia* 56 (14), 1518-1531

Haberland C: *Clinical Neuropathology*. Demos Medical Publishing, New York 2007

Hanisch UK, Kettenmann H (2007): Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathogenic brain. *Nat Neurosci* 10 (11), 1387-1394

- Hellems J, Mortier G, De Paepe A, Speleman F, Vandesompele J (2007): qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol* 8(2), R19
- Jaegle M, Ghazvini M, Mandemakers W, Piirsoo M, Driegen S, Levavasseur F, Raghoenath S, Grosveld F, Meijer D (2003): The POU proteins Brn-2 and Oct-6 share important functions in Schwann cell development. *Genes Dev* 17(11), 1380-1391
- Jessen KR, Mirsky R (2005): The origin and development of glial cells in peripheral nerves. *Nat Rev Neurosci* 6 (9), 671-682
- Jessen KR, Mirsky R (2008): Negative regulation of myelination: relevance for development, injury, and demyelinating disease. *Glia* 56 (14): 1552-1565
- Kao SC, Wu H, Xie J, Chang CP, Ranish JA, Graef IA, Crabtree GR (2009): Calcineurin/NFAT signaling is required for neuregulin-regulated Schwann cell differentiation. *Science* 323 (5914), 651-654
- Karnovsky MJ (1965): A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for electron microscopy. *J Cell Biol* 27, 137-138
- Laemmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 15, 680-685
- Li L, Cleary S, Mandarano MA, Long W, Birchmeier C, Jones FE (2002): The breast proto-oncogene, HRGalpha regulates epithelial proliferation and lobuloalveolar development in the mouse mammary gland. *Oncogene* 21(32), 4900-4907
- Loeb JA, Khurana TS, Robbins JT, Yee AG, Fischbach GD (1999): Expression patterns of transmembrane and released forms of neuregulin during spinal cord and neuromuscular synapse development. *Development* 126(4), 781-791
- Luft JH (1961): Improvements in epoxy resin embedding methods. *J Biophys Biochem Cytol* 9, 409-414.
- Michailov GV, Sereda MW, Brinkmann BG, Fischer TM, Haug B, Birchmeier C, Role L, Lai C, Schwab MH, Nave KA (2004): Axonal neuregulin-1 regulates myelin sheath thickness. *Science* 304 (5671), 700-703
- Mirsky R, Woodhoo A, Parkinson DB, Arthur-Farraj P, Bhaskaran A, Jessen KR (2008): Novel signals controlling embryonic Schwann cell development, myelination and dedifferentiation. *J Peripher Nerv Syst* 13 (2), 122-135
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986): Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51(1), 263-273
- Napoli I et al. (2012): A central role for the ERK-signaling pathway in controlling Schwann cell plasticity and peripheral nerve regeneration in vivo. *Neuron* 73 (4), 729-742
- Nave KA, Salzer JL (2006): Axonal regulation of myelination by neuregulin 1. *Curr Opin Neurobiol* 16 (5), 492-500
- Nave KA (2010): Myelination and support of axonal integrity by glia. *Nature* 468 (7321), 244-252
- Newbern J, Birchmeier C (2010): Nrg1/ErbB signaling networks in Schwann cell development and myelination. *Semin Cell Dev Biol* 21 (9), 922-928
- Newbern J et al. (2011): Specific functions for ERK/MAPK signaling during PNS development. *Neuron* 69 (1), 91-105
- Oberheim NA, Goldman SA, Nedergaard M (2012): Heterogeneity of astrocytic form and function. *Methods Mol Biol* 814, 23-45
- Ohno M et al. (2009): Nardilysin regulates axonal maturation and myelination in the central and peripheral nervous system. *Nat Neurosci* 12, 1506-1513
- Peters A, Palay SL, deF Webster H: The fine structure of the nervous system. 3. Auflage; Oxford University Press, New York 1991
- Pertusa M, Morenilla-Palao C, Carteron C, Viana F, Cabedo H (2007): Transcriptional control of cholesterol biosynthesis in Schwann cells by axonal Neuregulin-1. *J Biol Chem* 282(39), 28768-28778



- Quarles RH, Macklin WB, Morell P: Myelin Formation, Structure and Biochemistry; in: Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects.; hrsg. Von Siegel G, Albers RW, Brady S, Price D; Band 1; Elsevier Academic Press, London 2006, 51-71
- Reynolds ES (1963): The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol* 17, 208-212
- Richardson KC, Jarett L, Finke EH: Embedding in epoxy resins for ultrathin sectioning in electron microscopy. *Stain Technol* 1960, 35, 313-323
- Rivest S (2009): Regulation of innate immune responses in the brain. *Nat Rev Immunol* 9 (6), 429-439
- Sandrock AW Jr, Dryer SE, Rosen KM, Gozani SN, Kramer R, Theill LE, Fischbach GD (1997): Maintenance of acetylcholine receptor number by neuregulins at the neuromuscular junction in vivo. *Science* 276 (5312), 599-603
- Schröder JM (1972): Altered ratio between axon diameter and myelin sheath thickness in regenerated nerve fibers. *Brain Res* 45 (1), 49-65
- Sherman DL, Brophy PJ (2005): Mechanisms of axon ensheathment and myelin growth. *Nat Rev Neurosci* 6 (9), 683-690
- Simons M, Trotter J (2007): Wrapping it up: the cell biology of myelination. *Curr Opin Neurobiol* 17 (5), 533-540
- Stassart RM, Goebbels S, Nave KA: Factors controlling myelin formation; in Neuroglia; Kettenmann H und Ransom B. 3. Auflage, Oxford University Press, New York 2012, Kapitel 44.
- Stassart RM, Fledrich R, Velanac V, Brinkmann BG, Schwab MH, Meijer D, Sereda MW, Nave KA (2013): A role for Schwann cell-derived neuregulin-1 in remyelination. *Nat Neurosci* 16(1), 48-54
- Stoll G, Müller HW (1999): Nerve injury, axonal degeneration and neural regeneration: basic insights. *Brain Pathol* 9 (2), 313-325
- Taveggia C et al. (2005): Neuregulin-1 type III determines the ensheathment fate of axons. *Neuron* 47 (5), 681-694
- Taveggia C, Feltri ML, Wrabetz L (2010): Signals to promote myelin formation and repair. *Nat Rev Neurol* 6 (5), 276-287
- Trepel M: Neuroanatomie Struktur und Funktion. 2. überarbeitete Auflage; Urban und Fischer Verlag, München 1999
- Velanac V et al. (2012): Bace1 processing of NRG1 type III produces a myelin-inducing signal but is not essential for the stimulation of myelination. *Glia* 60(2), 203-217
- Welsch U: Lehrbuch Histologie. 1. Auflage; Urban und Fischer Verlag, München 2003
- Wolpowitz D, Mason TB, Dietrich P, Mendelsohn M, Talmage DA, Role LW (2000): Cysteine-rich domain isoforms of the neuregulin-1 gene are required for maintenance of peripheral synapses. *Neuron* 25 (1), 79-91

**DANKSAGUNG**

Ich danke Prof. Klaus-Armin Nave, PhD für die Möglichkeit, in seiner Abteilung die Promotionsarbeit durchzuführen. Insbesondere möchte ich mich bei Ihm für die umfassende Unterstützung, sein Vertrauen sowie die vielen wissenschaftlichen Diskussionen und zahlreichen wissenschaftlichen Anregungen während vieler Jahre bedanken.

Ich möchte mich bei Prof. Dr. med. Michael W. Sereda bedanken, in dessen Arbeitsgruppe die Arbeit durchgeführt wurde. Ich danke ihm für die lange gute Zusammenarbeit, die Betreuung und die Möglichkeit, selbstständig und frei alle Projekte und Ideen verfolgen zu können. Ich möchte mich insbesondere für die jahrelange Unterstützung und für seine Fähigkeit, immer motivierend und positiv auch während schwieriger Zeiten zu wirken, bedanken.

Ich möchte der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Michael W. Sereda wie auch der gesamten Abteilung für Neurogenetik für die tolle und offene Arbeitsatmosphäre danken. Besonders danke ich in diesem Zusammenhang Robert Fledrich, Bastian Brinkmann, Gerd Meyer zu Hörste, Theresa Kungl und Susanne Quintes. Weiterhin möchte ich Markus Schwab, Celia Kassmann und Sandra Goebbels für viele Diskussionen danken.

Mein besonderer Dank gilt Robert Fledrich, mit dem dieses Projekt zusammen durchgeführt wurde. Ich möchte mich sehr für die tolle und fruchtbare Zusammenarbeit, die unzähligen Diskussionen und die ständige, unverzichtbare Unterstützung bedanken, ohne die dieses Projekt so nicht zustande gekommen wäre. Zudem möchte ich mich bei Ihm für seine Hilfe in allen Lebenslagen während der letzten Jahre bedanken.

Ich danke Tanja Freerck für die Betreuung meiner Mauslinien sowie Tarik Durkaya für seine Unterstützung bei der Genotypisierung der Tiere. Zudem danke ich Annette Fahrenholz für ihre Hilfe bei der Immunhistochemie.

Weiterhin möchte ich mich bei Prof. Dr. med. Wolfgang Brück für die Möglichkeit bedanken, in der Abteilung für Neuropathologie meine Facharztausbildung absolvieren zu können, sowie für seine Unterstützung, parallel meine wissenschaftlichen Projekte durchführen zu können.

Mein grösster Dank gilt meiner Familie, ohne die das alles nicht möglich gewesen wäre.