



**Aus der Neurologischen Klinik und Poliklinik
der Universität Würzburg**

Direktor: Professor Dr. med. Jens Volkmann

**Präferentielle Lokalisation von Makrophagen im
räumlichen Umfeld von Ranvier'schen Schnürringen –
Morphologische Analysen zur räumlichen Verteilung von
Makrophagen in Mausmodellen für erbliche Neuropathien**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Jonas Franz Pausch

aus Regensburg

Würzburg, Juni 2016

Referent:	Prof. Dr. rer. nat. Rudolf Martini
Korreferent:	PD Dr. rer. Nat. Robert Blum
Dekan:	Prof. Dr. Matthias Frosch
Tag der mündlichen Prüfung:	06.12.2016

Der Promovend ist Arzt.

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Entwicklung und Aufbau peripherer myelinisierter Nervenfasern	1
1.2	Aufbau und Funktion von Ranvier'schen Schnürringen	3
1.3	Entwicklung und Aufbau peripherer nicht-myelinisierter Nervenfasern	5
1.4	Endoneurale Fibroblasten und Makrophagen als weitere Bestandteile peripherer Nerven	5
1.5	Erbliche periphere Neuropathien	8
1.6	CMT1A, -B und -X: Pathogenetische Faktoren im Mausmodell	10
1.7	Rolle endoneuraler Makrophagen in der Pathogenese von CMT1	11
1.8	Rolle der Ranvier'schen Schnürringe in der Pathogenese neurologischer Erkrankungen	14
1.9	Ziel dieser Arbeit	17
2	Material und Methoden	18
2.1	Technische Geräte, Puffer und Lösungen, Antikörper, PCR-Bedingungen und Primersequenzen	18
2.2	Mausmodelle und Genotypisierung	18
2.3	Gewebepräparation und Fixierungsmethoden	19
2.4	Immunhistochemie	19
2.5	Morphologische Analysen	22
2.6	Elektronenmikroskopie	25
2.7	Immunelektronenmikroskopie	25
2.8	Statistische Methoden	26
3	Ergebnisse	27
3.1	Erhöhte Anzahl von Makrophagen in peripheren Nerven von 6 Monate alten CMT1-Modelltieren	27

3.2	Normale Anzahl von Ranvier'schen Schnürringen in peripheren Nerven von 6 Monate alten CMT1-Modelltieren	29
3.3	Räumliche Assoziation von Makrophagen mit Ranvier'schen Schnürringen	30
3.4	Präferentielle Lokalisation von Makrophagen im räumlichen Umfeld von Ranvier'schen Schnürringen	32
3.5	Exemplarische Darstellung von Makrophagen und Fibroblasten im räumlichen Umfeld von RS	38
4	Diskussion	41
4.1	Erhöhte Anzahl von Makrophagen in peripheren Nerven von 6 Monate alten CMT1-Modelltieren	41
4.2	Normale Anzahl von Ranvier'schen Schnürringen in peripheren Nerven von 6 Monate alten CMT1-Modelltieren	42
4.3	Präferentielle Lokalisation von Makrophagen im räumlichen Umfeld von Ranvier'schen Schnürringen in Wt-Mäusen	43
4.4	Ranvier'schen Schnürringe sind nicht präferentieller Angriffspunkt aktivierter pathogener Makrophagen in der CMT1-Pathogenese	46
4.5	Zusammenfassender Ausblick	49
5	Zusammenfassung	52
6	Literaturverzeichnis	54
7	Anhang	65
7.1	Technische Geräte	65
7.2	Puffer und Lösungen	67
7.3	Antikörper	69
7.4	PCR-Bedingungen und Primersequenzen	70
8	Abkürzungen	71
9	Curriculum vitae	
10	Danksagung	

1 Einleitung

1.1 Entwicklung und Aufbau peripherer myelinisierter Nervenfasern

Das Periphere Nervensystem (PNS) von Säugetieren ist ein komplexes bidirektionales Kommunikationssystem, welches mit Hilfe seiner afferenten Anteile die Weiterleitung von Information aus der Umwelt an das Zentrale Nervensystem (ZNS) bewerkstelligt. Dort werden die eingehenden Signale verarbeitet, bewertet (Integration) und gegebenenfalls Antworten über efferente Anteile des PNS, insbesondere α -Motoneuronen, an die Effektororgane (z.B. Muskulatur) gesendet. Dabei ist trotz der bisweilen langen Distanzen eine schnelle, präzise aber auch energieeffiziente Impulsweiterleitung von großer Wichtigkeit.

Die Geschwindigkeit der kontinuierlichen Erregungsausbreitung in 1mm dicken nicht-myelinisierten Tintenfisch-Riesenaxonen variiert abhängig vom Axon-Durchmesser (je dicker, desto schneller) von 1 m/s bis 18 m/s (Rosenthal and Bezanilla, 2000). In Säugetieren hingegen kommt die äußerst platzsparende elektrische Isolierung von großkalibrigen Axonen, die sog. Myelinisierung zur Anwendung. Sie ist dabei essentielle Grundlage der schnellen, sog. saltatorischen Impulsweiterleitung, womit Nervenleitgeschwindigkeiten von bis zu 130 m/s erreicht werden können.

Die hierfür notwendigen Glia-Zellen stammen entwicklungsgeschichtlich von Zellen der Neuralleiste ab und sind als Schwann-Zell-Vorläuferzellen (SCPs) während der Embryogenese eng mit embryonalen Axonenbündeln assoziiert (Jessen et al., 1994; Jessen and Mirsky, 2005). Dabei stellen sie neben der trophischen Unterstützung für Axone auch die Quelle von unreifen Schwann-Zellen dar (Jessen et al., 1994). Hieraus entwickeln sich im weiteren Verlauf, abhängig vom Durchmesser der assoziierten Axone, durch den Prozess des „radial sorting“ differenzierte myelinisierende und nicht-myelinisierende Schwann-Zellen (Jessen and Mirsky, 2005).

Ab einem Durchmesser von $\geq 1\mu\text{m}$ werden Axone von einzelnen Schwann-Zellen segmental ummantelt, wobei diese ihre Fortsätze mehrmals um das Axon winden. Dadurch wird v.a. das nah am Axon (= adaxonal) lokalisierte Schwann-Zell-Zytoplasma nach außen gepresst, wodurch eine sehr dichte Schicht, sog. kompaktes Myelin, entsteht. Weniger dichte Bereiche, sog. nicht-kompaktes Myelin, finden sich vor allem periaxonal und in den paranodalen Schleifen der Ranvier'schen Schnürringe (RS) (siehe 1.2 Aufbau und Funktion von Ranvier'schen Schnürringen) sowie in den sog. Schmidt-Lanterman Inzisuren (Arroyo and Scherer, 2000).

Die Myelinscheide, welche unter anderem zur elektrischen Isolierung der Axone dient, besteht zu etwa 70 % aus Lipiden bzw. Glykolipiden und zu etwa 30 % aus Proteinen, wobei diese unterschiedlichste Funktionen ausüben. Dazu gehören neben der Stabilisierung des Myelins und des assoziierten Axons, auch die Interaktion zwischen Schwann-Zelle und Axon, sowie die Kommunikation innerhalb der Schwann-Zelle (Arroyo and Scherer, 2000; Salzer et al., 2008).

Myelin Protein Zero (MPZ oder P0), welches den Hauptproteinanteil des kompakten Myelins ausmacht, ist sowohl an der Bildung, als auch der Stabilisierung der Myelinscheide beteiligt (Martini and Schachner, 1997; Niemann et al., 2006). Ebenso im kompakten Myelin zu finden sind Peripheres Myelinprotein 22 (PMP22), welches hauptsächlich an der Stabilisierung, aber auch Differenzierung von Schwann-Zellen beteiligt ist (Martini and Schachner, 1997; Muller et al., 1997) und Myelin Basic Protein (MBP). Letzteres ist ebenfalls an der Stabilisierung der Myelinscheide beteiligt (Arroyo and Scherer, 2000).

Proteine, welche vor allem im nicht-kompakten Myelin lokalisiert sind, sind E-Cadherin, Connexin 32 (Cx32) und Myelin-assoziiertes Glykoprotein (MAG). Ersteres ist Bestandteil von adhärenenten, desmosomenartigen Zellkontakten und somit wichtig für die Aufrechterhaltung der Schwann-Zell-Geometrie (Arroyo and Scherer, 2000). Cx32, eine Untereinheit von sog. „gap junctions“, welche v.a. in den Schmidt-Lanterman Inzisuren lokalisiert sind, sorgt für schnelle

intrazelluläre Diffusionswege innerhalb der Schwann-Zellen und spielt dadurch in der Aufrechterhaltung des Schwann-Zell-Stoffwechsels eine Rolle (Scherer et al., 1995; Balice-Gordon et al., 1998). MAG, welches v.a. periaxonal lokalisiert ist, ist ein Adhäsionsmolekül (Trapp and Quarles, 1982), welches maßgeblich an der Aufrechterhaltung der axonalen Stabilität, sowie der Integrität der Myelinscheide beteiligt ist (Fruttiger et al., 1995; Yin et al., 1998; Quarles, 2007; Nguyen et al., 2009).

1.2 Aufbau und Funktion von Ranvier'schen Schnürringen

Die etwa 1µm großen Bereiche zwischen zwei benachbarten Schwann-Zellen, in denen die Myelinscheide unterbrochen ist, werden als Ranvier'sche Schnürringe (RS) bezeichnet (Salzer et al., 2008; Salzer, 2015). Der RS selbst und seine benachbarten Areale können aufgrund ihrer molekularen Architektur in nodale, paranodale und juxtaparanodale Abschnitte untergliedert werden (Poliak and Peles, 2003; Salzer et al., 2008) .

In den nodalen Bereichen, welche sich im Zentrum der RS befinden, sind axonale spannungsabhängige Natriumkanäle (Nav1.6) lokalisiert, welche essentiell für die Generierung von Aktionspotentialen sind (Poliak and Peles, 2003). Während der Entwicklung wird die hohe nodale Konzentration dieser Ionenkanäle durch ihre cis-Interaktion mit benachbarten axonalen Zelladhäsionsmolekülen (CAMs) und der trans-Interaktion mit Schwann-Zell-Adhäsionsmolekülen und deren Extrazellulärmatrix (EZM) initiiert (Susuki and Rasband, 2008). Besonders wichtig ist hierbei die Bindung von axonalem Neurofascin 186 (NF186) an Gliomedin, einem von Schwann-Zellen sezernierten Protein, welches via Neuron-Glia related CAM (NrCAM) mit nodalen Schwann-Zell-Mikrovilli verbunden ist (Eshed et al., 2005; Koticha et al., 2006; Eshed et al., 2007; Thaxton et al., 2011; Zhang et al., 2012). Die Verankerung von Nav1.6 am axonalen Zytoskelett wird vor allem durch Ankyrin G und betaIV-Spektrin vermittelt (Lambert et al., 1997; Dzhashiashvili et al., 2007).

Die paranodalen Bereiche der RS sind durch nicht-kompaktes Myelin gekennzeichnet. Enge Zellkontakte, sog. „septate junctions“, zwischen dem paranodalen Axolemm und den paranodalen Schleifen der angrenzenden Schwann-Zellen begrenzen hierbei die laterale Diffusion von angrenzenden Membranproteinen (Arroyo and Scherer, 2000; Salzer et al., 2008). Diese Domänen, welche aus Komplexen aus Contactin und Contactin assoziiertem Protein (Caspr) sowie Neurofascin 155 (NF155) aufgebaut sind, stabilisieren somit die gesamte Architektur der RS (Arroyo and Scherer, 2000; Boyle et al., 2001; Salzer et al., 2008; Susuki and Rasband, 2008). Abgesehen davon stellen die paranodalen „septate junctions“ auch einen funktionellen Umgehungsweg des lipophilen kompakten Myelins der Internodien für kleine wasserlösliche Moleküle dar, was im Falle von Glukose der axonalen Ernährung dienen könnte (Mierzwa et al., 2010).

Die juxtaparanodalen Abschnitte, welche die Grenzen zwischen nicht-kompaktem Myelin der RS und dem kompaktem Myelin der Internodien bilden, weisen vorwiegend Komplexe aus Kaliumkanälen (Kv1.1 und Kv1.2) und Contactin assoziiertem Protein 2 (Caspr2) auf (Poliak et al., 1999). Vor allem die spannungsabhängigen Kaliumkanäle vom sog. „shaker-Typ“ spielen eine entscheidende Rolle in der Pufferung von Kationenströmen und der Aufrechterhaltung des Ruhemembranpotentials des internodalen Axolemm (Rasband et al., 1998; Zhou et al., 1998).

Die Funktion der RS, nämlich die saltatorische Erregungsausbreitung, ergibt sich somit aus der komplexen molekularen Architektur myelinisierter Nervenfasern. Am initialen Axon Segment (AIS) gebildete Aktionspotentiale werden dabei passiv unter dem Myelin der Internodien fortgeleitet, um an den RS regeneriert zu werden. Auf diesem Wege erfolgt eine wesentlich schnellere und energieeffizientere Impulsweiterleitung als in nicht-myelinisierten Nervenfasern (Eshed-Eisenbach and Peles, 2013).

1.3 Entwicklung und Aufbau peripherer nicht-myelinisierter Nervenfasern

Periphere Nerven von Säugetieren beinhalten abhängig von ihrer anatomischen Lage, Funktion und Zusammensetzung neben myelinisierten auch nicht-myelinisierte Nervenfasern. Vor allem nozizeptive, postganglionäre sympathische und präganglionäre vegetative Axone mit einem Durchmesser von $<1 \mu\text{m}$ werden während des „radial sortings“ nicht zu myelinisierten Fasern bestimmt, sondern kollektiv von nicht-myelinisierenden Schwann-Zellen ummantelt (Jessen and Mirsky, 2005; Griffin and Thompson, 2008). Hierdurch erhalten selbige kleinkalibrige Axone metabolisch-trophische Unterstützung, was in der Aufrechterhaltung ihrer Integrität eine große Rolle spielt (Beirowski et al., 2014; Monk et al., 2015). Des Weiteren erhöht die Abwesenheit einer Myelinscheide in Remakfasern deren Maß an axonaler Plastizität und Regenerationsfähigkeit. Dieser Effekt ist vor allem bei der nozizeptiven Innervation der Haut, welche sich aufgrund physikalischer Verletzungen im permanenten Um- und Wiederaufbau befindet, von großer Bedeutung (Griffin and Thompson, 2008).

Im Gegensatz zur saltatorischen Impulsweiterleitung von myelinisierten Nervenfasern kommt es in Remakfasern zu einer langsameren, energetisch aufwendigeren, kontinuierlichen Erregungsausbreitung (Griffin and Thompson, 2008; Eshed-Eisenbach and Peles, 2013).

1.4 Endoneurale Fibroblasten und Makrophagen als weitere Bestandteile peripherer Nerven

Abgesehen von myelinisierten Nervenfasern und Remakfasern finden sich in peripheren Nerven von Säugetieren ebenso Endothelzellen, Perizyten, endoneurale Fibroblasten und Makrophagen (Arvidson, 1977; Griffin and George, 1993; Griffin et al., 1993; Richard et al., 2012; Richard et al., 2014; Martini and Willison, 2016).

Erstere sind vor allem an der Aufrechterhaltung der Blut-Nerven-Schranke (BNB) beteiligt und sichern somit die Homöostase des Mikromillieus peripherer Nerven (Bell and Weddell, 1984; Ubogu, 2013).

Endoneurale Fibroblasten scheinen, anders als gewöhnliche Gewebsfibroblasten, keinen mesenchymalen Ursprung zu haben, sondern analog zu den SCPs entwicklungsgeschichtlich von Zellen der Neuralleiste abzustammen (Joseph et al., 2004). Schätzungen zu Folge machen Fibroblasten etwa 2-9 % der endoneuralen Zellen peripherer Nerven aus (Oldfors, 1980; Griffin and George, 1993; Richard et al., 2012) und sind sowohl im Epi-, Peri-, als auch Endoneurium lokalisiert (Richard et al., 2014). Elektronenmikroskopisch sind sie anhand ihres spindelförmigen Zellkörpers, den langen dünnen Zellfortsätzen, mit welchen sie ein retikuläres Netzwerk innerhalb des Endoneuriums ausbilden, einem ausgeprägten rauen endoplasmatischem Retikulum (rER) und dem Fehlen einer Basallamina zu erkennen (Gamble and Eames, 1964; Richard et al., 2012; Richard et al., 2014). Abgesehen von der Synthese von Kollagen I (Kaemmer et al., 2010) können endoneurale Fibroblasten auch phagozytierende Eigenschaften entwickeln (Schubert and Friede, 1981) und sind folglich am bindegewebigen Auf- und Umbau peripherer Nerven beteiligt (Obremski et al., 1993). Des Weiteren spielen sie aufgrund der Produktion von Zytokinen wie Colony Stimulating Factor 1 (CSF-1) (Groh et al., 2012; Groh et al., 2016) und der Formierung spezialisierter Zellkontakte mit endoneuralen Makrophagen (Maurer et al., 2003; Groh et al., 2012; Groh et al., 2016) ebenso in der immunologischen Überwachung des Nervengewebes eine Rolle. Unter pathologischen Bedingungen, wie beispielsweise in akuten oder erblichen Neuropathien, wurden neben einer gesteigerter Proliferation endoneuraler Fibroblasten (Richard et al., 2012), abermals deren Interaktion mit Zellen des angeborenen Immunsystems beschrieben (Maurer et al., 2003; Groh et al., 2012; Groh et al., 2016). Somit weisen endoneurale Fibroblasten abgesehen von der Produktion von bindegewebigen Bestandteilen peripherer Nerven, eine Reihe weiterer Eigenschaften und Funktionen auf, welche bislang nur unzureichend charakterisiert sind (Richard et al., 2012; Richard et al., 2014).

Endoneurale Makrophagen, welche schätzungsweise 5-10 % der endoneuralen Zellen ausmachen (Arvidson, 1977; Oldfors, 1980; Griffin et al., 1993), sind analog zu den Kupferzellen der Leber, den Alveolarmakrophagen der Lunge, oder den Mikrogliazellen des ZNS, sog. residente Gewebemakrophagen (Ginhoux and Jung, 2014). Trotz ihres bisher ungeklärten entwicklungsgeschichtlichen Ursprungs, konnte anhand von Knochenmarktransplantationsexperimenten die Existenz residenter endoneuraler Makrophagen nachgewiesen werden und deren Um- und Ersatz durch hämatogene Makrophagen charakterisiert werden (Mueller et al., 2001; Mueller et al., 2003; Muller et al., 2010). Elektronenmikroskopisch sind sie anhand ihres elongierten Zellkörpers, ihrer fingerförmigen Fortsätze, ihrem vakuolisierten Zytoplasma, sowie dem Fehlen einer Basallamina zu erkennen (vgl. endoneurale Fibroblasten) (Oldfors, 1980; Bonetti et al., 1993). Insbesondere nicht aktivierte, residente Makrophagen sind elektronenmikroskopisch oft schwer von endoneuralen Fibroblasten zu unterscheiden (Richard et al., 2012; Richard et al., 2014) und folglich erst anhand immunhistochemischer Marker eindeutig zu identifizieren. Morphologische Abgrenzungskriterien sind neben ihres weniger stark ausgeprägten rER, ein, durch das vermehrte Vorhandensein von Heterochromatin, dunkler erscheinender Zellkern (Richard et al., 2012). Abhängig von Art und Ausmaß der Aktivierung verändern Makrophagen ihre Zellform (Shen et al., 2000; Muller et al., 2008), ihr Phagozytoseverhalten, sowie ihren molekularen Phänotyp (anti- bis proinflammatorisch) (Sun et al., 2010; Ydens et al., 2012; Kroner et al., 2014). So entwickeln sie beispielsweise bedingt durch die Phagozytose von Myelin einen lipidbeladenen, „rundlich geblähten“ morphologischen Phänotyp (sog. Schaumzellen) (Klein and Martini, 2015).

Im Gegensatz zur pathogenetischen Rolle der endoneuralen Makrophagen im Falle eines akuten (z.B. Waller'sche Degeneration nach traumatischer Nervenverletzung) oder chronischen peripheren Nervenschadens (Wang Ip et al., 2006; Martini et al., 2008; Klein and Martini, 2015; Martini and Willison, 2016), ist die Funktion der residenten Makrophagen in gesunden peripheren Nerven noch unzureichend untersucht (Klein and Martini, 2015).

Aus dem Vergleich endoneuraler Makrophagen mit Mikrogliazellen, ihrem zentralnervösen Äquivalent, werden ersteren jedoch Funktionen wie die Überwachung des endoneuralen Mikromilieus, die Produktion von Zytokinen, die Antigenpräsentation, sowie die Phagozytose von Myelinbestandteilen zugeschrieben (Klein and Martini, 2015). Mikrogliazellen spielen außerdem entscheidende Rollen in der Entwicklung, Regulation, und Aufrechterhaltung neuronaler Funktionen im ZNS (Nimmerjahn et al., 2005; Li et al., 2012; Schafer et al., 2012; Parkhurst et al., 2013; Zhan et al., 2014). Beispielsweise wird durch die Assoziation von Mikrogliazellen mit AIS, den Impulsgeneratoren von zentralen Axonen, möglicherweise deren Erregbarkeit reguliert (Baalman et al., 2015). Eine Vielzahl solcher mikroglialen Eigenschaften ist auch für residente endoneurale Makrophagen denkbar, weshalb eine detaillierte Charakterisierung selbiger von großem Interesse ist (Klein and Martini, 2015).

1.5 Erbliche periphere Neuropathien

Die Charcot-Marie-Tooth Erkrankung (CMT), auch Hereditäre Motorische und Sensible Neuropathie (HMSN) genannt, stellt mit einer Prävalenz von 1:2500 eine der häufigsten erblichen neurologischen Erkrankungen dar (Skre, 1974). Diese bereits 1886 von Jean-Martin Charcot, Pierre Marie und Howard Henry Tooth beschriebenen klinisch und genetisch heterogenen Erkrankungen des PNS, können in demyelinisierende (CMT1 und 4) und axonale (CMT2) Subtypen untergliedert werden. Davon abzugrenzen ist des Weiteren eine Gruppe (CMT3) sehr schwer verlaufender Neuropathien mit extrem reduzierter Nervenleitgeschwindigkeit (NLG) und frühem Krankheitsbeginn, welche sowohl das Dejerine-Sottas-Syndrom (DSS), als auch die Kongenitale Hypomyelinisierung (CHN) beinhaltet (Dyck and Lambert, 1968; Shy and Patzko, 2011).

Neben genetischen Kriterien spielen sowohl pathologische (v.a. anhand feingeweblicher Untersuchungen von N. Suralis-Biopsien), als auch elektrophysiologische Kriterien bei oben genannter Einteilung eine Rolle (Patzko and Shy, 2011). Insbesondere die bereits erwähnte NLG wird häufig als

diagnostisches Mittel zur Abgrenzung der demyelinisierenden Verlaufsformen CMT 1 bzw. 4 (NLG <38 m/s) von den axonalen CMT2-Subtypen (NLG >38 m/s) herangezogen (Shy and Patzko, 2011; Rudnik-Schoneborn et al., 2016).

Klinische Manifestationen variieren von Sensibilitätsstörungen, verminderten Muskeleigenreflexen, Gangbeschwerden (Steppergang), fortschreitende Lähmungen, über Fuß-Deformitäten (v.a. Hohlfuß), bis hin zu Muskelatrophie. Für die betroffenen Patienten bedeutet das nicht selten eine starke Einschränkung der Lebensqualität (Shy and Rose, 2005). Bedauernswerterweise sind bis heute keine kurativen Therapien bekannt, weshalb v.a. interdisziplinäre symptomatische Therapieansätze (Rehabilitation; orthopädische Operationen) verfolgt werden (Jerath and Shy, 2015; McCorquodale et al., 2016).

Trotz der, bei heute über 870 bekannten Mutationen in mehr als 80 Genen (Timmerman et al., 2014), stark ausgeprägten genetische Variabilität der erblichen Neuropathien, liegen einem Großteil der CMT-Erkrankungen genetische Alterationen in drei "Hauptgenen" zugrunde:

CMT1A, mit ca. 70 % die häufigste CMT1-Form, basiert auf einer 1,4-Megabasen (Mb) großen Duplikation auf Chromosom 17, welches das PMP22-Gen beinhaltet (Reilly et al., 2011).

CMT1B, verantwortlich für 5-10 % aller CMT1-Erkrankungen, geht aus Mutationen im P0-Gen hervor, wobei einige MPZ-Mutationen auch mit schweren CMT3-Verlaufsformen assoziiert sind (Patzko and Shy, 2012).

CMT1X, nach CMT1A die zweithäufigste CMT1-Unterform, basiert auf einer Reihe von X-chromosomalen Mutationen im Gap Junction Protein Beta1-Gen (GJB1), welches für das Myelinprotein Cx32 kodiert (Kleopa and Scherer, 2006a).

Abgesehen davon gibt es eine Vielzahl weiterer Mutationen, welche im Falle des Myotubularin-Related-Protein-2 (MTMR-2) oder des Periaxin-Gens (PRX) die hauptsächlich demyelinisierende CMT4-Verlaufsform bedingen (Reilly et al.,

2011). Betreffen die Mutationen kodierende Genbereiche für Proteine, welche im axonalen Transport, neuronalen Energie- bzw. mitochondrialen Stoffwechsel, wie beispielsweise Mitofusin-2 (MFN-2), eine Rolle spielen, können daraus axonale CMT2-Verlaufsformen resultieren (Jerath and Shy, 2015; Rudnik-Schoneborn et al., 2016).

1.6 CMT1A, -B und -X: Pathogenetische Faktoren im Mausmodell

Trotz der Identifizierung zahlreicher Genmutationen mitsamt ihrer assoziierten molekularen Signalwegen, die beispielsweise die neuronale transkriptionelle Regulation, den axonalen Proteinstoffwechsel, aber auch die Schwann-Zell-Axon-Interaktion betreffen, sind weite Teile der Pathogenese der erblichen Neuropathien noch ungeklärt (Berger et al., 2006). Vor allem im Hinblick auf die Entwicklung zukünftiger kurativer Therapieansätze, spielen genetisch modifizierte Mausmodelle weiterhin eine große Rolle (Fledrich et al., 2012). Pathomorphologische Veränderungen wie das simultane Auftreten von De-, Hypo- und Remyelinisierung, das Vorhandensein von zusätzlichen überzähligen Schwann-Zellen, (sog. „onion bulbs“), sowie deren Dedifferenzierung, axonaler Schaden, und eine chronisch ablaufende Entzündungsreaktion, sind sowohl in peripheren Nervbiopsien von Patienten als auch in den korrespondierenden Mausmodellen nachweisbar und kennzeichnen die drei häufigsten demyelinisierenden CMT1-Unterformen (Martini, 1997; Groh et al., 2012; Klein and Martini, 2015).

Im Falle der genetischen Modifikation der PMP22-Expression konnte anhand unterschiedlicher Mausmodelle eine dosisabhängige Wirkung von PMP22 auf myelinisierte Nervenfasern gezeigt werden (Martini and Schachner, 1997; Huxley et al., 1998). PMP22-defiziente Mäuse zeigen beispielsweise einen verspäteten Beginn der Myelinisierung, die Formation von hypermyelinisierten Strukturen, sog. Tomakula und schweren axonalen Schaden (Adlkofer et al., 1995). PMP22 überexprimierende Mäuse hingegen weisen, abhängig von der Anzahl zusätzlicher Kopien des PMP22-Gens, einen eher demyelinisierenden Charakter auf. Vor allem die in dieser Arbeit verwendete PMP22tg Mäuse mit

nur 4 PMP22 Kopien (C61 Linie), spiegeln die pathologischen Eigenschaften der humanen CMT1A-Erkrankung gut wider (Martini, 1997; Huxley et al., 1998; Kohl et al., 2010a).

Trotz der großen Bandbreite an bereits beschriebenen Mutationen im GJB1-Gen, resultiert meist ein ähnlicher CMT1X-Phänotyp (Kleopa and Scherer, 2006b). Folglich wird der Funktionsverlust von Cx32 als entscheidender Faktor in der Pathogenese der humanen CMT1X-Erkrankung angesehen, was anhand von pathomorphologischen Analysen von Cx32-defizienten Mäusen (Nelles et al., 1996) bestätigt werden konnte (Anzini et al., 1997; Martini, 1997; Groh et al., 2012).

Mutationen im P0-Gen, von denen derzeit bereits mehr als 100 beschrieben wurden, weisen ein variables klinisches Bild auf, welches von der demyelinisierenden CMT1 bis hin zur axonalen CMT2-Form reicht (Warner et al., 1996). P0-defiziente Mäuse zeigen einen, mit dem DSS vergleichbaren, stark ausgeprägten klinischen Phänotyp, kombiniert mit einem frühen Beginn der Neuropathie (Martini et al., 1995) und axonaler Degeneration (Frei et al., 1999; Samsam et al., 2003; Ey et al., 2007). Die hier verwendeten heterozygot defizienten P0-Mäuse (P0het) hingegen, entwickeln eine milder verlaufende demyelinisierende Neuropathie im Sinne der humanen CMT1B (Giese et al., 1992; Martini, 1997).

1.7 Rolle endoneuraler Makrophagen in der Pathogenese von CMT1

Trotz der unterschiedlichen genetischen Grundlagen der beschriebenen CMT1-Modelle, weisen sowohl PMP22tg-, Cx32def-, als auch P0het-Modellmäuse charakteristische pathomorphologische Gemeinsamkeiten auf. Eine davon ist das Auftreten einer chronischen leichtgradigen Entzündungsreaktion, welche in den Mausmodellen vor allem durch signifikant erhöhte Anzahlen an T-Lymphozyten und endoneuralen Makrophagen deutlich wird (Schmid et al., 2000; Carenini et al., 2001; Kobsar et al., 2002; Kobsar et al., 2003; Kobsar et al., 2005). Ähnliche Beobachtungen sind vereinzelt auch in Nervbiopsien von Patienten nachweisbar (Groh et al., 2012).

Insbesondere Myelin-phagozytierende Makrophagen, als Teil des angeborenen Immunsystems, spielen eine entscheidende Rolle in der Pathogenese und damit dem Verlauf der Erkrankung. Angedeutet wird das anhand der altersabhängigen Dynamik des Anstiegs der Makrophagenanzahlen in peripheren Nerven der einzelnen Mauslinien, welche eng mit dem Schweregrad der Erkrankung verknüpft ist (Carenini et al., 2001; Kobsar et al., 2002; Kobsar et al., 2005). Des Weiteren suggerieren ultrastrukturelle Analysen peripherer Nerven, welche endoneurale Makrophagen in direktem Kontakt mit sowohl intaktem Myelin, als auch demyelinisierten Axonen zeigen, ebenfalls deren aktive Rolle während der Degeneration myelinisierter Nervenfasern (Kobsar et al., 2002; Kobsar et al., 2005; Wang Ip et al., 2006).

Bislang wurden vor allem zwei Mediatoren charakterisiert, welche am Einwandern, der Proliferation und Aktivierung von Makrophagen beteiligt sind. Anhand genetischer Modifikation der Expression bzw. der Inaktivierung von Monocyte Chemoattractant Protein 1 (MCP-1; CCL2) und Colony Stimulating Factor 1 (CSF-1; MCSF), konnte die Wirkung auf Makrophagen und deren Auswirkung auf die Progression der Neuropathien in den drei CMT1-Mausmodellen weiter aufgeklärt werden (Fischer et al., 2008b; Fischer et al., 2008a; Groh et al., 2010; Kohl et al., 2010a; Groh et al., 2012).

Verkreuzungen von heterozygot MCP-1 defizienten Mäusen mit PMP22tg, P0het und Cx32def-Mäusen zeigten eine stark reduzierte Makrophagen-einwanderung und folglich eine entscheidende Abmilderung des neuropathischen Phänotypes (Fischer et al., 2008b; Groh et al., 2010; Kohl et al., 2010a).

Verkreuzungen von P0het und Cx32def-Mäusen mit osteopetrotischen (op/op) Mäusen (Yoshida et al., 1990), welche eine inaktivierende Spontanmutation im CSF-1-Gen enthalten, zeigten ebenfalls eine eindeutig abgemilderte Pathologie der peripheren Neuropathien (Carenini et al., 2001; Groh et al., 2012; Groh et al., 2015). Vergleichbare Ergebnisse konnten durch die medikamentöse Blockade des von Makrophagen exprimierten CSF-1-Rezeptors (CSF-1R) erzielt werden (Klein et al., 2015b).

Des Weiteren konnten in Cx32def-Mäusen endoneurale Fibroblasten als Hauptursprungsort einer löslichen Proteoglykan CSF-1-Isoform (spCSF-1) identifiziert werden (Groh et al., 2012; Groh et al., 2016). Die proinflammatorische Wirkung von spCSF-1 und somit die Aktivierung von Makrophagen wird möglicherweise zusätzlich durch enge Zell-Zell-Kontakte zwischen Fibroblasten und endoneuralen Makrophagen, welche abgesehen von den Mausmodellen auch in Patienten nachweisbar sind, verstärkt (Groh et al., 2012; Klein et al., 2015b; Groh et al., 2016). Reziprok zu den oben genannten „Cx32def-op/op“-Untersuchungen, konnte anhand der Überexpression von spCSF-1 in Cx32def-Mäusen eindeutig eine proinflammatorische und pathogene Wirkung für die Makrophagenaktivierung gezeigt werden (Groh et al., 2016).

Um das Verhalten aktivierter Makrophagen in der CMT1-Pathogenese weiter zu charakterisieren, wurden Cx32 heterozygot-defiziente Mäuse (Cx32het), in welchen - abhängig von der zufälligen X-Inaktivierung- Cx32wt und Cx32def-Schwann-Zellen existieren, untersucht. Immunhistochemische Analysen zeigten Ansammlungen von aktivierten Makrophagen ausschließlich mit Cx32def Schwann-Zellen assoziiert, wodurch ein zielgerichtetes Verhalten der Makrophagen verdeutlicht wird. Dies könnte beispielsweise durch die CCL2/MCP-1-Expression der mutierten Schwann-Zellen gesteuert werden (Groh et al., 2010; Groh et al., 2015).

Die molekulare Erkennung der mutierten Schwann-Zellen durch aktivierte Makrophagen konnte anhand von Analysen an P0het-Mäusen, welche durch eine genetische Modifikation keine B-Lymphozyten und dadurch keine Antikörper bilden (JHD^{-/-}) (Chen et al., 1993), weiter charakterisiert werden. Die genetische Ablation von Antikörpern resultiert hierbei in einem abgemilderten neuropathischen Phänotyp der P0het JHD^{-/-} Mäuse, weshalb eine Antikörper-Fc-Rezeptor-Interaktion zwischen mit Antikörpern dekorierten Schwann-Zellen und aktivierten Makrophagen wahrscheinlich ist (Klein et al., 2015a).

Abgesehen von den bereits beschriebenen pathogenetischen Abläufen, welche zur Makrophageneinwanderung, -aktivierung und Zielerkennung führen, bleibt jedoch deren räumliche Beziehung zu möglichen Angriffsorten an myelinisierten Axonen v.a. im Hinblick auf segmentale Demyelinisierung und juxtaparanodale Fehlverteilung von Ionenkanälen an Ranvier'schen Schnürringen noch weitestgehend ungeklärt (Ulzheimer et al., 2004; Kohl et al., 2010a; Groh et al., 2012; Klein et al., 2014; Groh et al., 2015).

1.8 Rolle der Ranvier'schen Schnürringe in der Pathogenese neurologischer Erkrankungen

Abgesehen von den Vorteilen der molekularen Domänengliederung von myelinisierten Nervenfasern im Sinne der saltatorischen Impulsweiterleitung, stellt eben dieser hochkomplexe Aufbau auch eine potentielle Schwachstelle dar (Salzer et al., 2008). Pathologische Architekturabweichungen, welche sowohl primär durch axonalen Schaden, als auch sekundär durch Störungen der Schwann-Zell-Integrität und Myelinisierung bedingt sein können, führen zu Einschränkungen der Erregbarkeit und Leitungsblöcken, sowie zu axonaler Degeneration. Folglich stellen sie einen wichtigen Morbiditätsfaktor neurologischer Erkrankungen dar (Salzer et al., 2008).

In Mausmodellen für die demyelinisierenden CMT1A, -B und -X-Neuropathien des PNS, sowie in humanen Nervbiopsien erkrankter Patienten, konnte die fehlerhafte Verteilung von Kaliumkanälen in den juxtaparanodalen Regionen der RS beschrieben werden (Ulzheimer et al., 2004; Devaux and Scherer, 2005; Li et al., 2005; Kohl et al., 2010a; Groh et al., 2012). Sowohl die Ausprägung solcher pathologischer Veränderungen, als auch deren ultrastrukturelles Korrelat im Sinne juxtaparanodal lokalisierter, adaxonalen Schwann-Zell-Schwellungen, sind vom Einwandern und der Aktivierung pathogener Makrophagen abhängig (Kohl et al., 2010a; Groh et al., 2012).

In de- bis dysmyelinisierenden Erkrankungen des ZNS, so zum Beispiel in Modellen der Pelizaeus-Merzbacher-Krankheit, einer genetisch bedingten Leukodystrophie, oder Modellen für Multiple Sklerose (MS), die sog.

Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis (EAE), konnten ähnliche molekulare Architekturstörungen nachgewiesen werden (Arroyo et al., 2002; Howell et al., 2006; Zoupi et al., 2013). Im Fall der MS und der korrespondierenden EAE gehen paranodale Störungen der Axon-Glia-Interaktion den Demyelinisierungsvorgängen sogar voraus und scheinen abermals von der Aktivierung und Infiltration von Mikrogliazellen abhängig zu sein (Howell et al., 2010)

Neben den erwähnten primär demyelinisierenden Erkrankungen, stellen molekulare Komponenten der RS des Weiteren Angriffspunkte in autoimmun bedingten Neuropathien des PNS dar. Autoimmunreaktionen gegen RS treten sowohl in der Akut Motorisch Axonalen Neuropathie (AMAN), einer Verlaufsform des Guillain-Barré-Syndroms (GBS), als auch der Chronisch Inflammatorischen Demyelinisierenden Polyradikuloneuropathie (CIDP) auf (Griffin et al., 1996; Koticha et al., 2006; Susuki et al., 2007; Chavada and Willison, 2012; Devaux et al., 2012; Ng et al., 2012; Susuki et al., 2012; Kawamura et al., 2013). Hierbei spielen sowohl humorale, im Sinne von nodalen Autoantikörperablagerungen und Komplementaktivierung (McGonigal et al., 2010; Devaux et al., 2012; Willison and Goodyear, 2013), als auch zelluläre Mechanismen (Griffin et al., 1996) eine Rolle und sind folglich zumindest teilweise für die klinische Symptomatik bis hin zur Paralyse verantwortlich. Anhand elektronenmikroskopischer Analysen von an AMAN erkrankten Patientennerven konnte die Assoziation von Makrophagen mit Ranvier'schen Schnürringen, welche durch eine nodale Verbreiterung und Zerrüttung der paranodalen Schleifen auffielen, als die erste pathologische Veränderungen beschrieben werden (Griffin et al., 1996). Vor allem der Zusammenhang zwischen aktivierten Makrophagen und RS als deren mögliche Angriffspunkte für die nachfolgende axonale Degeneration ist hierbei zu unterstreichen.

Die beteiligten zellulären Mechanismen, welche zur Aufrechterhaltung der physiologischen Architektur der RS, sowie deren Wiederherstellung im

Krankheitsfall dienen, sind folglich essentiell für die Funktion des Nervensystems von Säugetieren.

1.9 Ziel dieser Arbeit

Störungen der Architektur von Ranvier'schen Schnürringen spielen eine wichtige Rolle in der Pathogenese einer Vielzahl neurologischer Erkrankungen. Besonders in den beschriebenen CMT1A, -B und -X-Unterformen besteht ein Zusammenhang zwischen aktivierten pathogenen Makrophagen und gestörter RS-Organisation, wobei deren genaue Beziehung zueinander bisher wenig charakterisiert wurde. Des Weiteren sind mögliche Rollen residenter Makrophagen und deren räumliche Verteilung im PNS, im Gegensatz zu Mikrogliazellen, deren zentralnervösem Äquivalent, nur ungenügend untersucht.

Die Frage nach der räumlichen Verteilung residenter Makrophagen im PNS einerseits und deren mögliche Interaktion mit RS im Falle der CMT1-Erkrankungen andererseits ist Gegenstand dieser Arbeit. Anhand konventioneller immunhistochemischer und elektronenmikroskopischer Analysen peripherer Nerven der entsprechenden Modelltiere (PMP22tg, P0het, Cx32def und wildtypische Kontrollmäusen) soll eine morphologische Charakterisierung der räumlichen Assoziation von Makrophagen mit RS vorgenommen werden.

2 Material und Methoden

2.1 Technische Geräte, Puffer und Lösungen, Antikörper, PCR-Bedingungen und Primersequenzen

Eine detaillierte Auflistung der verwendeten technischen Geräte (Anhang 7.1), Puffer und Lösungen (Anhang 7.2), Antikörper (Anhang 7.3) für immunhistochemische Färbungen und Immunelektronenmikroskopie, sowie PCR-Bedingungen inklusive Primersequenzen (Anhang 7.4) für die Genotypisierung der Mausmodelle befindet sich im Anhang.

2.2 Mausmodelle und Genotypisierung

Die verwendeten Modelltiere, PMP22-überexprimierende Mäuse (PMP22tg) der C61-Linie (Huxley et al., 1998), Mäuse heterozygot defizient für P0 (P0het) (Giese et al., 1992) und Cx32-defiziente Mäuse (Cx32def) (Nelles et al., 1996), wurden allesamt auf dem genetischen C57/BL6-Hintergrund gezüchtet, wobei die analysierten korrespondierenden wildtypischen Geschwistermäuse (Wt) denselben Zuchtlinien entstammen.

Die Bestimmung der entsprechenden Genotypen der Mäuse erfolgte mithilfe konventioneller PCR (Bedingungen inkl. Primersequenzen siehe Anhang 8.4), im Anschluss an die Aufreinigung genomischer DNA aus Ohrbiopsien, unter der Verwendung des DNeasy blood & tissue kit (Qiagen) gemäß der Herstellerangaben. Alle verwendeten Modelltiere entstammen der eigenen Zucht der Arbeitsgruppe Experimentelle Entwicklungsneurobiologie und wurden in der Tierhaltung der Neurologischen Klinik und Poliklinik der Universität Würzburg in einem 12h/12h Tag/Nacht Rhythmus unter Verwendung von individuell belüfteten Käfigen spezifiziert pathogenfrei (SPF-Haltung) gehalten.

Die Züchtung und Haltung, sowie die tierexperimentellen Analysen erfüllen allesamt die gesetzlichen Tierschutzaufgaben und wurden durch die Regierung von Unterfranken genehmigt.

2.3 Gewebepräparation und Fixierungsmethoden

Für die Durchführung immunhistochemischer Färbungen wurden die zuvor, gemäß den Richtlinien des Landesamtes für Gesundheit und Soziales Berlin, durch CO₂-bedingte Asphyxie getöteten Mäuse, transkardial mit Heparin-versetzter, phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) für 2-5 Minuten perfundiert, um im Anschluss mit der Präparation der entsprechenden peripheren Nerven (N. femoralis für Querschnitte und sein vorwiegend motorische Anteile beinhaltender Quadrizeps-Muskelast für Längsschnitte) fortzufahren. Selbige wurden nach Entnahme unmittelbar in O.C.T.-Medium (Sakura) eingebettet und in, durch flüssigen Stickstoff gekühltem, Methylbutan tiefgefroren. Die gefrorenen Nervenblöcke wurden in einem Kryostat (Leica) zu 10µm-dicken Quer- bzw. Längsschnitten weiterverarbeitet und bei -20°C aufbewahrt.

Zur Herstellung von Einzelfaserzupfpräparaten wurden die Mäuse im Anschluss an eine 2-5 minütige transkardiale Perfusion mit PBS/Heparin-Lösung für weitere 10 Minuten mit 2 % Paraformaldehyd (PFA) in PBS perfundiert. Ischiasnerven wurden entnommen, das Perineurium entfernt und einzelne Fasern mithilfe einer Pinzette auf einem Glasobjektträger separiert und luftgetrocknet.

Für die elektronen- und immunelektronenmikroskopischen Analysen wurden die Mäuse 2-5 Minuten mit PBS/Heparin und anschließend für weitere 15 Minuten mit 4 % PFA und 2 % Glutaraldehyd (GA) in 0,1M Cacodylatpuffer transkardial perfundiert.

2.4 Immunhistochemie

Im Zuge der immunhistochemischen Analysen wurden sowohl die Femoralisquer- und Quadrizepslängsschnitte, als auch die Einzelfaserzupfpräparate bei -20°C für 10 Minuten in Aceton postfixiert und nach einem sich anschließenden Waschschrift in PBS für 60 Minuten bei Raumtemperatur (RT) mit 5 % bovinem Serumalbumin (BSA) in PBS inkubiert, um unspezifische Antikörperbindungsstellen zu blockieren. Die Zusammensetzung der einzelnen Blocklösungen, sowie Antikörperverdünnungslösungen beinhaltet, je nach

Primärantikörper, zusätzlich 4 % fetales Kälberserum (FKS), 4 % normales Ziegerserum (NGS) und 0,3 % Triton X-100 (detaillierte Auflistung siehe Anhang 8.3). Im Anschluss folgte die Inkubation mit den jeweiligen Primärantikörpern in 1 % BSA in PBS bei 4°C über Nacht. Nach einem dreiteiligen 15-minütigen Waschschrift mit PBS folgte eine 60-minütige Inkubation mit den korrespondierenden Sekundärantikörpern in 1 % BSA in PBS, wobei die Zellkerne mit DAPI (1:500 000; Sigma-Aldrich) gefärbt wurden. Nach einem abschließenden Waschschrift mit PBS wurden die Präparate allesamt entweder in Aqua-Poly/Mount (Polysciences) oder DABCO eingedeckelt, wobei letztere noch mit Vitro-Clud (Langenbrinck) umrandet wurden. Die Spezifität aller immunhistochemischer Färbungen wurde mittels Negativkontrollen durch Inkubation der Gewebeproben mit Antikörperverdünnungslösungen ohne Primärantikörper sichergestellt.

Die Färbung und Quantifizierung endoneuraler Makrophagen erfolgte, analog zu früheren Beschreibungen, mit einem Ratten anti-Maus F4/80-Primärantikörper (1:300; Serotec), welcher mit einem Cy3-konjugiertem Ziege anti-Ratten IgG-Sekundärantikörper (1:300; Dianova) detektiert wurde (Carenini et al., 2001; Groh et al., 2012; Groh et al., 2015).

Zur Darstellung und Quantifizierung der RS wurden als nodaler Marker ein Kaninchen anti-Maus Nav1.6-Antikörper (1:1000; Millipore), als paranodaler Marker ein Maus anti-Ratte Caspr-Antikörper (1:1000; NIH Neuro Mab) und als juxtapanodaler Marker ein Kaninchen anti-Ratte Caspr2-Antikörper (1:500; Millipore) verwendet (modifiziert nach (Ulzheimer et al., 2004; Kohl et al., 2010a; Groh et al., 2012)). Die Visualisierung der verwendeten Primärantikörper erfolgte mit korrespondierenden an Cyanine gekoppelten Sekundärantikörpern (detaillierte Auflistung siehe Anhang 8.3).

Die Beurteilung der räumlichen Beziehung zwischen F4/80-immunreaktiven endoneuralen Makrophagen und Nav1.6-immunreaktiven RS erfolgte anhand analog ablaufender Doppelfärbungen mit oben beschriebenen Primär- und korrespondierenden Sekundärantikörpern (detaillierte Auflistung siehe Anhang 8.3).

Zur simultanen Darstellung von Caspr-, Caspr2- und F4/80-immunreaktiver Profile wurde eine Kombination aus einer Avidin-Biotin-Komplex-Färbung und einer konventionellen Immunfluoreszenzfärbung etabliert. Hierzu wurden die Präparate wie oben beschrieben im Anschluss an eine 10-minütige Acetonfixierung mit 5 % BSA in PBS bei RT für 60 Minuten geblockt, um im darauffolgenden Schritt mit einem Ratte anti-Maus F4/80-Primärantikörper (1:300; Serotec) für weitere 60 Minuten inkubiert zu werden. Im Anschluss erfolgte nach einem Waschschrift in PBS eine 60-minütige Inkubation mit einem biotinyliertem anti-Ratte IgG-Sekundärantikörper (1:100; Serotec). Nach einem dreiteiligen Waschschrift mit PBS wurden die Gewebeproben für weitere 30 Minuten mit einem Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex inkubiert (ABC-Kit 1:1000; VECTOR). Zur Visualisierung des Komplexes wurde nach erneutem Waschen in PBS eine, durch die Zugabe von Wasserstoffperoxid (H_2O_2), aktivierte Reaktion der, an das Avidin gekoppelten Meerrettichperoxidase mit Diaminobenzidin (DAB) unter lichtmikroskopischer Sichtkontrolle für ca. 5 Minuten unterhalten, bevor sie durch einen Waschschrift in destilliertem Wasser gestoppt wurde (Carenini et al., 2001). Im Anschluss wurde mit der konventionellen Immunhistochemie wie oben beschrieben fortgefahren, wobei nach der 60-minütigen Inkubation der Präparate in 5 %BSA, 4 %FCS, 4 %NGS und 0,3 % Triton X-100 in PBS, eine zusätzliche Inkubation in anti-humanen antigenbindenden Fragmenten (F_{ab}) (1:150; Jackson Immunoresearch) in Antikörperverdünnungslösung bei RT für 60 Minuten erfolgte. Nach einer erneuten 10-minütigen Acetonfixierung bei $-20^{\circ}C$, gefolgt von einem dreiteiligen Waschschrift in PBS, folgte die Inkubation mit den Primärantikörpern (anti-Caspr und anti-Caspr2) bei $4^{\circ}C$ über Nacht, wobei die folgenden abschließenden Detektionsschritte analog zur oben beschriebenen Immunhistochemie abliefen.

Die digitalen licht- und fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurden mit einem Axiophot 2 Mikroskop (Zeiss), welches mit einer CCD Kamera (Visitron Systems) ausgestattet ist, generiert und anschließend mit Photoshop CS3 (Adobe) weiterbearbeitet. Flächenmessungen und Quantifizierungen wurden mittels ImageJ (NIH) durchgeführt.

2.5 Morphologische Analysen

Bei der Quantifizierung von endoneuralen Makrophagen und Nav1.6-immunreaktiver RS, wurden jeweils 8-10 konsekutive Femoralisquerschnitte pro Tier ausgewertet, wobei sowohl die absolute Gesamtanzahl pro Querschnitt des Quadrizepsmuskelastes des N.femoralis (Carenini et al., 2001; Groh et al., 2010; Kohl et al., 2010a; Kohl et al., 2010b; Groh et al., 2012; Groh et al., 2015), als auch die mittels Flächenanalysen pro mm²-Gesamtnervfläche ermittelten Werte abgebildet wurden (Schmid et al., 2000). Analog erfolgte die Quantifizierung unter Verwendung der Quadrizepslängsschnitte, wobei in diesem Fall die ermittelten Werte pro mm²-Gesamtnervfläche angegeben wurden und auf einer Analyse von 0,8 bis 1 mm² Nervfläche basierten.

Um die räumliche Assoziation von Makrophagen mit RS zu beurteilen, wurden die oben genannten Doppel- und Dreifachfärbungen licht- und fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet, wobei die Beurteilung mithilfe eines 100-fach Zeiss-Objektives vorgenommen wurde und sowohl Immunreaktivität als auch morphologische Kriterien mit einbezogen wurden. Im Zuge dessen wurden F4/80-immunreaktive Profile nur dann als endoneurale Makrophagen gewertet, wenn sie einen mit DAPI gefärbten Zellkern enthielten, bzw. der im Elektronenmikroskop typischen Makrophagenmorphologie (v.a. fingerförmige Zellfortsätze, ggf. auch phagozytierter Zelldebris) entsprachen. Analog gestaltete sich die Identifizierung der Nav1.6-immunreaktiven Profile als RS. Hierbei war, v.a. zur Abgrenzung zu nichtmyelinisierten Remakfaserbündeln, eine in den Querschnitten kreisförmige und in den Längsschnitten, quer zum Faserverlauf sichtbare, linienhafte Immunreaktivität als Identifikationskriterium obligat. Die Beurteilung der räumlichen Assoziation zwischen Makrophagen und RS wurde mithilfe von Flächenanalysen bewerkstelligt. Bezüglich der Femoralisquerschnitte wurden 200 µm² als durchschnittliche Assoziationsfläche (vgl. Abb. 1) pro RS ermittelt (basierend auf Flächenanalysen von mindestens 100 Nav1.6-immunreaktiver Profile innerhalb der quergeschnittenen myelinisierten Nervenfasern des Quadrizepsmuskelastes des N.femoralis).

In den Längsschnitten wurde aufgrund der größeren longitudinalen Längenausdehnung der RS (inklusive para- und juxtapanodaler Bereiche) eine Fläche von 500 μm^2 als Assoziationsfläche ermittelt (basierend auf Flächenanalysen von mindestens 100 Caspr/Caspr2-immunreaktiver Profile).

Um eine quantitative Aussage bezüglich der präferentiellen räumlichen Assoziation von Makrophagen mit RS treffen zu können, wurden die als assoziiert gewerteten Makrophagen pro mm^2 -Assoziationsfläche mit der Gesamtmakrophagenanzahl pro mm^2 -Nicht-Assoziationsfläche verglichen. Hierbei setzt sich die Nicht-Assoziationsfläche aus dem Anteil der gesamten Nervfläche, welcher nicht von myelinisierten Nervenfasern besetzt ist, abzüglich der Assoziationsfläche zusammen (vgl. Abb. 6 A). Zur Ermittlung der nicht von myelinisierten Fasern eingenommenen Nervfläche wurden Femoralisquerschnitte der jeweiligen Genotypen elektronenmikroskopisch analysiert. Anhand der Flächenanalyse von mind. 300 myelinisierten Nervenfasern pro Genotyp wurde der durchschnittliche Flächenanteil der Gesamtnervfläche pro Femoralisquerschnitt, welcher von myelinisierten Nervenfasern eingenommen wird, ermittelt (vgl. Abb. 6 A und 6 B). Basierend auf der Annahme von durchschnittlichen 650 myelinisierten Nervenfasern pro N. femoralis konnte folglich die nicht von myelinisierten Fasern eingenommene und somit den Makrophagen theoretisch zur freien Verfügung stehende Fläche ermittelt werden. Aufgrund der äußerst geringen Flächenanteile von Blutgefäßen, Remakfasern sowie endoneuralen Fibroblasten, wurden selbige vernachlässigt.

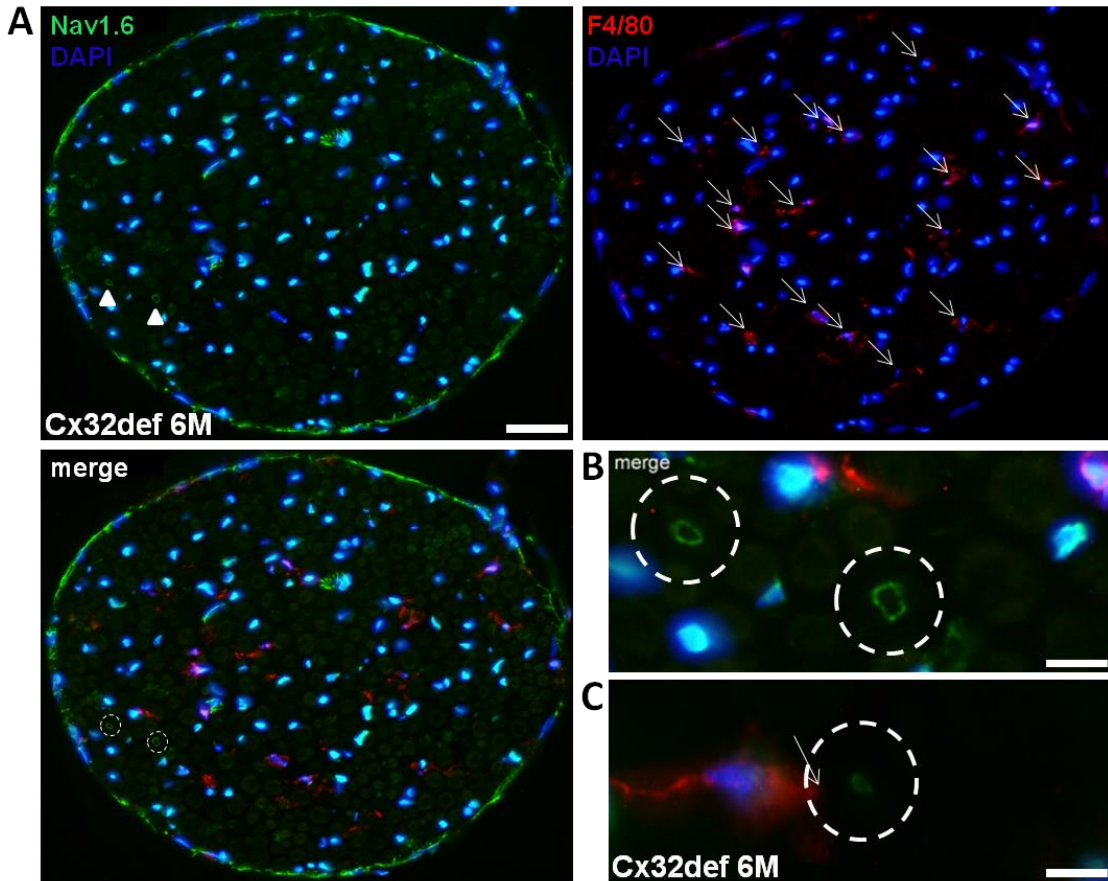


Abbildung 1: Auswertungsbeispiel der räumlichen Assoziation von Makrophagen mit Ranvier'schen Schnürringen. A. Simultane immunhistochemische Darstellung von grünfluoreszenten Nav1.6-immunreaktiven RS (weiße Pfeilspitzen) und rotfluoreszenten F4/80-immunreaktiven Makrophagen (weiße Pfeile) auf Femoralisquerschnitten einer 6 Monate (6M) alten Cx32def. Maus. Maßstabsbalken, 30µm. B. Vergrößerung der zwei in A markierten RS inkl. Darstellung ihrer jeweils 200 µm² großen Assoziationsflächen (weiße, gestrichelte Kreise) ohne Makrophagenassoziation. Maßstabsbalken, 10µm. C. Vergrößerter Ausschnitt eines rotfluoreszenten F4/80-immunreaktiven Makrophagen sowie dessen räumliche Assoziation mit der Assoziationsfläche (weißer, gestrichelter Kreis) eines grünfluoreszenten Nav1.6-immunreaktiven RS (weißer Pfeil) auf einem Femoralisquerschnitt einer 6 Monate (6M) alten Cx32def. Maus. Maßstabsbalken, 10µm.

2.6 Elektronenmikroskopie

Nach Entnahme des Nervengewebes (N.femoralis; Quadrizepsmuskelast; ventrale Spinalwurzel) wurden diese über Nacht in 4 % PFA und 2 % Glutaraldehyd (GA) in 0,1M Cacodylatfixationspuffer bei 4°C postfixiert, um im Anschluss mit 2 % Osmiumtetroxid (OsO₄) in 0,1M Cacodylatpuffer osmifiziert zu werden. Nach der sich anschließenden Dehydratation in einer aufsteigenden Acetonreihe wurden die Gewebeproben in Spurr's Medium eingebettet. Ultradünne (70 nm) Quer- und Längsschnitte wurden auf Kupfergrids platziert, mit Bleizitrat gegengefärbt und mittels einer, an ein Leo 906 E Elektronenmikroskop (Zeiss) gekoppelten, ProScan Slow Scan CCD (ProScan) Kamera und der korrespondierenden Bildgebungssoftware iTEM (Soft Imaging System) analysiert.

2.7 Immunelektronenmikroskopie

Für immunelektronenmikroskopische Analysen wurden periphere Femoralnerven, deren Quadrizepsmuskeläste und ventralen Spinalwurzeln von perfundierten und fixierten Mäusen entnommen und bei 4°C über Nacht postfixiert (siehe 2.6 Elektronenmikroskopie). Im Anschluss an das Einbetten der Gewebeproben in 6 % Agarose wurden 50 µm dicke Vibratomschnitte angefertigt, mit 1 % BSA in PBS über 120 Minuten geblockt und anschließend in 0.1M Natriumjodat (NaIO₃) in PBS und darauffolgend in 5 % Dimethylsulfoxid (DMSO) in PBS, jeweils für 15 Minuten inkubiert (Martini and Schachner, 1986). Im nächsten Schritt wurden die Vibratomschnitte mit Ratten anti-Maus CD68-Primärantikörper (1:300; Serotec) in 1 % BSA in PBS bei 4°C über Nacht inkubiert. Nach einem dreiteiligen Waschschrift mit PBS wurden die Gewebeproben mit dem korrespondierenden biotinylierten anti-Ratten Sekundärantikörper bei RT für 60 Minuten inkubiert, um nach einem erneuten Waschschrift mit PBS mit einem Streptavidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (ABC-Kit 1:1000; VECTOR) bei RT für weitere 30 Minuten inkubiert zu werden. Die Visualisierung des Avidin-Biotin-Komplexes erfolgte wie oben beschrieben (siehe 2.4 Immunhistochemie). Im Anschluss an die DAB-Färbung wurden die Präparate analog zur konventionellen Elektronenmikroskopie osmifiziert und

weiter verarbeitet (siehe 2.6 Elektronenmikroskopie), wobei die CD-68-immunreaktiven Makrophagen durch ein elektronendichtes DAB-Präzipitat im Elektronenmikroskop sichtbar gemacht wurden und somit eindeutig identifiziert werden konnten.

2.8 Statistische Methoden

Alle morphologischen Analysen wurden in Unwissenheit des jeweiligen Genotypes der Mausmodelle verblindet durchgeführt.

Normalverteilung der ermittelten Datensätze wurde anhand des Shapiro-Wilk Tests, die Varianzgleichheit anhand des Levene Tests überprüft. Der Vergleich zweier Gruppen normalverteilter Daten (jeweils Wt mit einzelnen Myelinmutanten) wurde mithilfe des ungepaarten, zweiseitigen t-Tests durchgeführt. Das Niveau der statistischen Signifikanz (*, # $P < 0,05$; **, ## $P < 0,01$; ***, ### $P < 0,001$) wurde in den graphischen Darstellungen sowie den zugehörigen Abbildungsbeschreibungen angegeben.

Alle Daten wurden als Mittelwerte (M) + Standardabweichung (SD) dargestellt. Die Statistische Analyse wurde mit MS Excel (Microsoft GmbH) und SYSTAT (SPSS Inc.) durchgeführt. Alle Graphen wurden mit Excel erstellt und MS PowerPoint (Microsoft GmbH) prozessiert.

3 Ergebnisse

3.1 Erhöhte Anzahlen von Makrophagen in peripheren Nerven von 6 Monate alten CMT1-Modelltieren

Zur Charakterisierung der räumlichen Beziehung zwischen aktivierten pathogenen Makrophagen und gestörter RS-Organisation in der Pathogenese der beschriebenen CMT1-Unterformen wurden als erster Schritt immunhistochemische Färbungen angefertigt.

Zur Evaluierung der absoluten Anzahlen von endoneuralen F4/80-immunreaktiven Makrophagen, wurden sowohl Quer- als auch Längsschnitte des Nervus femoralis bzw. dessen Quadrizeps-Muskelastes von 6 Monate alten Mäusen der jeweiligen Genotypen analysiert. Im Vergleich zu ihren gleichaltrigen wildtypischen Geschwistermäusen, wiesen periphere Nerven der drei untersuchten CMT1-Genotypen (P0het, Cx32def und PMP22tg) statistisch signifikant erhöhte Anzahlen von F4/80-immunreaktiven Makrophagen auf. Sowohl die absoluten Makrophagenanzahlen pro Quadrizepsquerschnitt, als auch die, anhand von Flächenanalysen ermittelten, Makrophagenanzahlen pro mm²-Nervfläche waren in den genannten Genotypen durchschnittlich um das 3 bis 4-fache erhöht (vgl. Abb. 2).

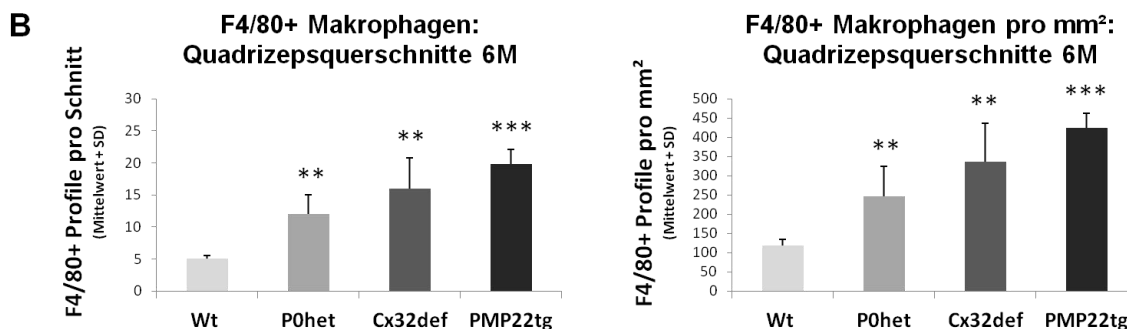
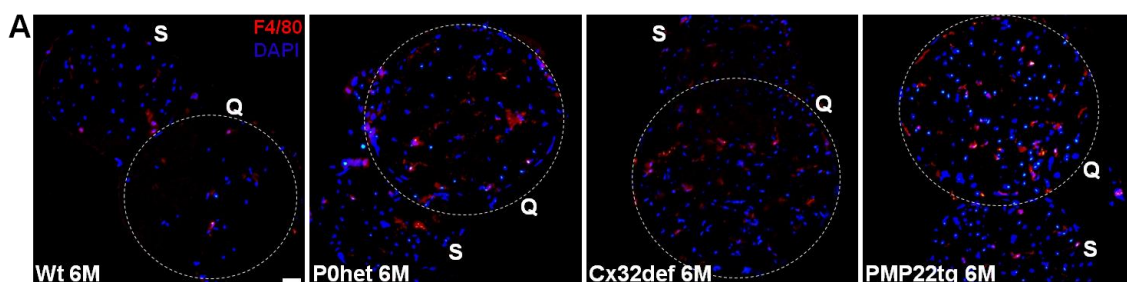


Abbildung 2: Erhöhte Makrophagenanzahlen im Quadrizeps-Muskelast von 6 Monate alten P0het, Cx32def und PMP22tg Mäusen. A. Repräsentative immunhistochemische Darstellung von rotfluoreszenten F4/80-immunreaktiven Makrophagen. Femoralisquerschnitte von 6 Monate (6M) alten Mäusen. Die gestrichelten Kreise heben den Quadrizepsmuskelast (Q) vom N.saphenus (S) ab. Maßstabsbalken, 20µm. B. Die Quantifizierung der F4/80-immunreaktiven Profile zeigt signifikant erhöhte Makrophagenanzahlen in den CMT1-Modelltieren, sowohl pro Querschnitt als auch pro mm²-Nervfläche. Anzahl der Modelltiere pro Genotyp n = 5; ungepaart, zweiseitiger t-Test; statistische Signifikanz * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001.

Vergleichbare Ergebnisse erbrachte die Analyse von DAB-gefärbten Quadrizepslängsschnitten (vgl. Abb. 3).

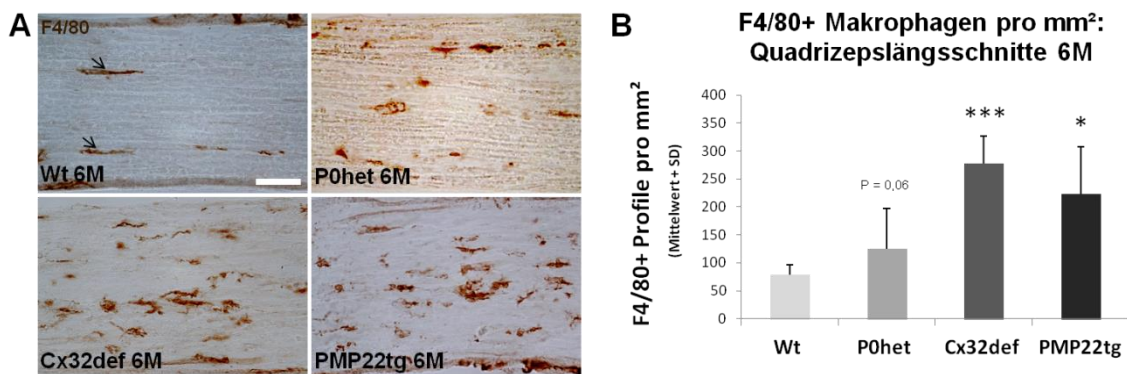


Abbildung 3: Erhöhte Makrophagenanzahlen im Quadrizeps-Muskelast von 6 Monate alten P0het, Cx32def und PMP22tg Mäusen. A. Repräsentative immunhistochemische Darstellung von DAB-gefärbten F4/80-immunreaktiven Makrophagen (siehe schwarze Pfeile in Wt). Quadrizepslängsschnitte von 6 Monate (6M) alten Mäusen. Maßstabsbalken, 20µm. B. Die Quantifizierung der F4/80-immunreaktiven Profile zeigt erhöhte Makrophagenanzahlen pro mm²-Nervfläche in den CMT1-Modelltieren. Anzahl der Modelltiere pro Genotyp n = 3-5; ungepaart, zweiseitiger t-Test; statistische Signifikanz * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001.

3.2 Normale Anzahl von Ranvier'schen Schnürringen in peripheren Nerven von 6 Monate alten CMT1-Modelltieren

Trotz der beschriebenen juxtaparanodalen Architekturstörungen der RS in peripheren Nerven von CMT1-Modelltieren, scheint die nodale Organisation, insbesondere die funktionell bedeutsame Expression von spannungsabhängigen Natriumkanälen (Nav1.6), nicht betroffen zu sein (Devaux and Scherer, 2005; Li et al., 2005; Kohl et al., 2010a; Groh et al., 2012).

Folglich wurden immunhistochemische Färbungen der nodalen Nav1.6 verwendet, um die Anzahl der RS in den peripheren Nerven der Modelltiere zu analysieren (vgl. Abb. 4 A und 4 B). Hierbei zeigten sich für die jeweiligen CMT1-Genotypen keine Abweichungen im Vergleich zu wildtypischen Kontrollfärbungen. Sowohl die absoluten RS-Anzahlen als auch deren ermittelten Anzahlen pro mm²-Nervfläche des Quadrizeps-Muskelastes wiesen keine statistisch relevanten Abweichungen vom Normalzustand auf (vgl. Abb. 4 C).

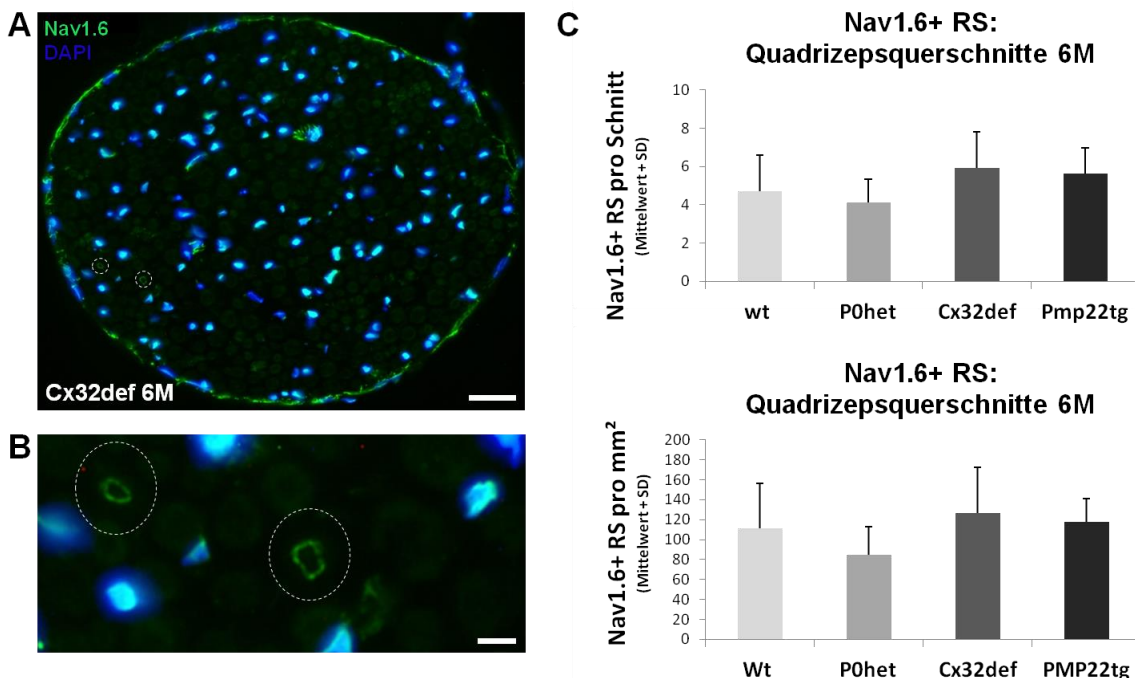


Abbildung 4: Normale RS-Anzahlen im Quadrizeps-Muskelast von 6 Monate alten P0het, Cx32def und PMP22tg Mäusen. A. Repräsentative immunhistochemische Darstellung von grünfluoreszenten Nav1.6-

immunreaktiven RS (hervorgehoben durch gestrichelte Kreise). Quadrizepsquerschnitt einer 6M alten Cx32def Maus. Maßstabsbalken, 20µm. B. Vergrößerung der in Abb.4 A beschriebenen grünfluoreszenten Nav1.6-immunreaktiven RS. Die gestrichelten Kreise heben die 200µm² große Assoziationsfläche (AF) der einzelnen RS hervor. Maßstabsbalken, 7,5µm. C. Die Quantifizierung der als RS gewerteten Nav1.6-immunreaktiven Profile pro Querschnitt, bzw. pro mm²-Nervfläche zeigt keine statistisch relevanten Unterschiede in den analysierten Genotypen. Anzahl der Modelltiere pro Genotyp n = 5; ungepaart, zweiseitiger t-Test.

Vergleichbare Ergebnisse erbrachte die Analyse von Quadrizepslängsschnitten, wobei hier einerseits der juxtapanodale Marker Caspr2 in Kombination mit dem paranodalen Marker Caspr und andererseits die nodale Nav1.6-Expression zur Identifizierung der RS genutzt wurde.

3.3 Räumliche Assoziation von Makrophagen mit Ranvier'schen Schnürringen

Um die räumliche Assoziation endoneuraler F4/80-immunreaktiver Makrophagen mit RS zu charakterisieren, wurden im nächsten Schritt oben genannte immunhistochemischen Doppel- und Dreifachfärbungen ausgewertet (vgl. Abb. 5 A und 5 B sowie Abb. 6 C und 6 D).

15 bis 20 % aller F4/80-immunreaktiven endoneuralen Makrophagen in Quadrizeps-Muskelästen von 6M alten Wt Mäusen, befanden sich in räumlicher Nähe zu RS (vgl. Abb.5 C und 5 D). Sowohl in Quer-, als auch Längsschnitten des Quadrizeps-Muskelastes konnten diese Ergebnisse reproduziert werden.

Im Gegensatz dazu wiesen die untersuchten Mäuse der verschiedenen CMT1-Genotypen statistisch signifikant niedrigere Anteile endoneuraler Makrophagen, welche mit RS räumlich assoziiert waren, auf.

In den CMT1-Modelltieren ist hierbei die Kombination aus signifikant erhöhten Anzahlen endoneuraler Makrophagen und signifikant erniedrigten Anteilen selbiger, welche sich im räumlichen Umfeld von RS befinden bei gleichbleibenden normalen RS-Anzahlen, hervorzuheben.

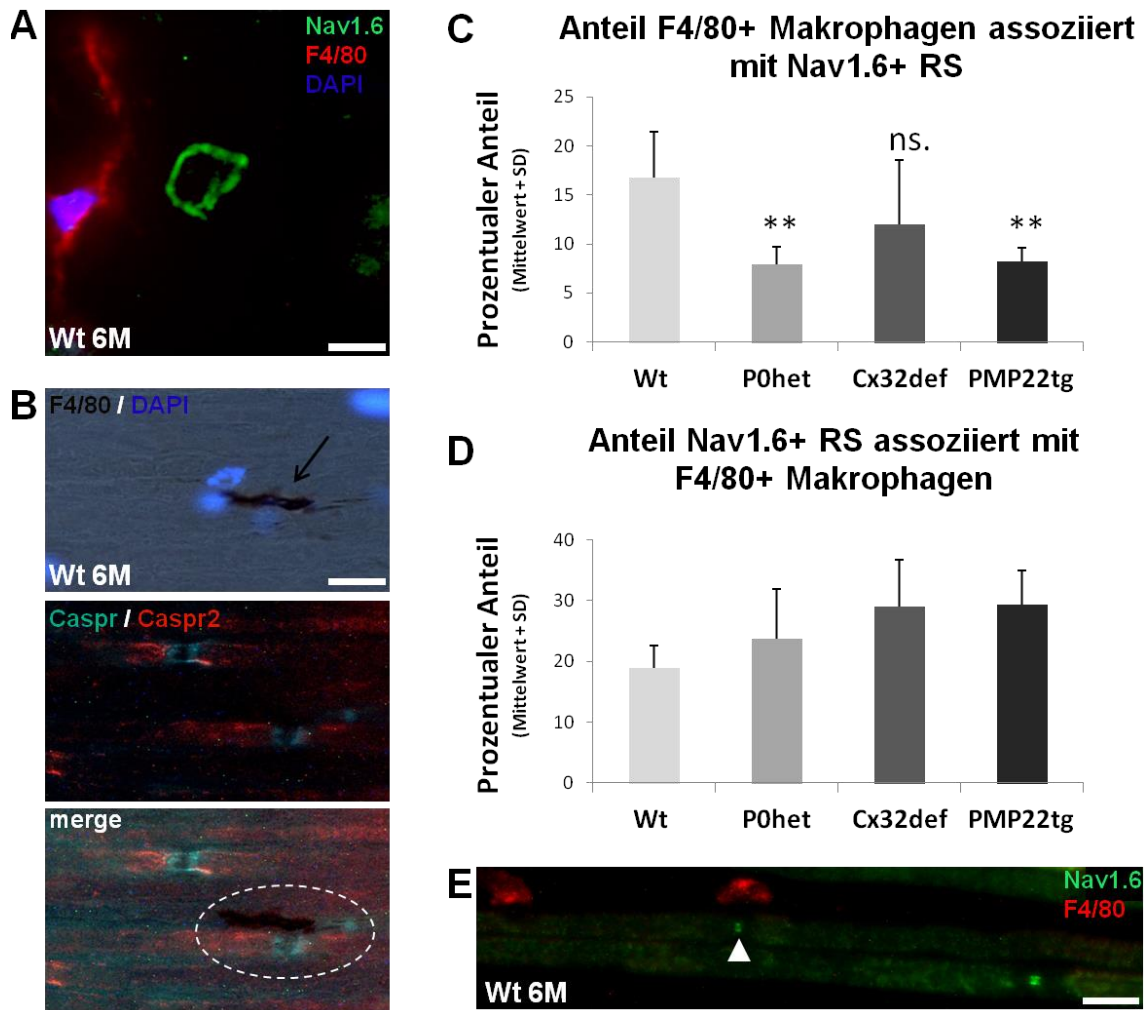


Abbildung 5: Räumliche Assoziation von Makrophagen mit Ranvier'schen Schnürringen. A. Repräsentative immunhistochemische Darstellung eines rotfluoreszenten F4/80-immunreaktiven Makrophagen in räumlicher Nähe zu einem grünfluoreszenten Nav1.6-immunreaktiven RS. Quadrizepsquerschnitt einer 6M alten Wt Maus. Maßstabsbalken, 5µm. B. Repräsentative immunhistochemische Darstellung eines DAB-gefärbten F4/80-immunreaktiven Makrophagen (siehe schwarzer Pfeil) in räumlicher Nähe (durch gestrichelten Kreis hervorgehoben) zu einem doppelgefärbten Caspr- bzw. Caspr2-immunreaktiven RS. Quadrizepslängsschnitt einer 6M alten Wt Maus. Maßstabsbalken, 5µm. C. Quantifizierung der als mit Nav1.6-immunreaktiven RS räumlich assoziiert gewerteten F4/80-immunreaktiven Makrophagen. Anzahl der Modelltiere pro Genotyp n = 5; ungepaart, zweiseitiger t-Test; statistische Signifikanz * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001. D. Quantifizierung der mit F4/80-immunreaktiven Makrophagen räumlich assoziierten Nav1.6-immunreaktiven RS. Anzahl der Modelltiere pro Genotyp n = 5; ungepaart, zweiseitiger t-Test. E. Repräsentative immunhistochemische Darstellung eines rotfluoreszenten F4/80-immunreaktiven Makrophagen in räumlicher Nähe zu einem

grünfluoreszenten Nav1.6-immunreaktiven RS (siehe weiße Pfeilspitze). Einzelfaserzupfpräparat eines Quadrizeps-Muskelastes einer 6M alten Wt Maus. Maßstabsbalken, 10µm.

Die Analyse der Anteile an Nav1.6-immunreaktiven RS, welche mit Makrophagen räumlich assoziiert waren, ergab in den CMT1-Modelltieren tendenziell höhere Werte, wobei hierbei keine statistische Relevanz nachweisbar ist (vgl. Abb. 5 D).

Vergleichbare Beobachtungen der räumlichen Assoziation von Makrophagen mit RS, konnten abgesehen von den Quadrizepsquer- und -längsschnitten, exemplarisch auch anhand von Einzelfaserzupfpräparaten gemacht werden (vgl. Abb. 5 E).

3.4 Präferentielle Lokalisation von Makrophagen im räumlichen Umfeld von Ranvier'schen Schnürringen

Anhand von elektronenmikroskopischen Flächenanalysen wurde im folgenden Schritt die präferentielle Lokalisation von Makrophagen im räumlichen Umfeld von RS quantitativ dargestellt.

Ein Anteil von etwa 30-40 % der Gesamtnervfläche des Quadrizeps-Muskelastes der jeweiligen Genotypen stellte sich hierbei als nicht von myelinisierten Nervenfasern besetzt dar (vgl. Abb. 6 A). Unter Vernachlässigung der von Blutgefäßen, Fibroblasten und Remakfasern eingenommen Fläche, steht den endoneuralen Makrophagen folglich eben dieser genannte Flächenanteil theoretisch zur freien Verteilung zur Verfügung.

In Wt-Mäusen konnte für einen Anteil von 15-20 % der endoneuralen Makrophagen die Assoziation mit RS, welche lediglich einen Flächenanteil von etwa 5 % (Assoziationsfläche AF) (vgl. Abb. 6 B) ausmachen, gezeigt werden. Diese augenscheinlich präferentielle Lokalisation endoneuraler Makrophagen im räumlichen Umfeld von RS konnte im nächsten Schritt quantitativ erfasst werden.

Hierfür wurden die als assoziiert gewerteten Makrophagen pro mm²-Assoziationsfläche (AF) mit der Gesamtmakrophagenanzahl pro mm²-Nicht-Assoziationsfläche (NAF) verglichen (detaillierte Erläuterung siehe 2.5 Morphologische Analysen).

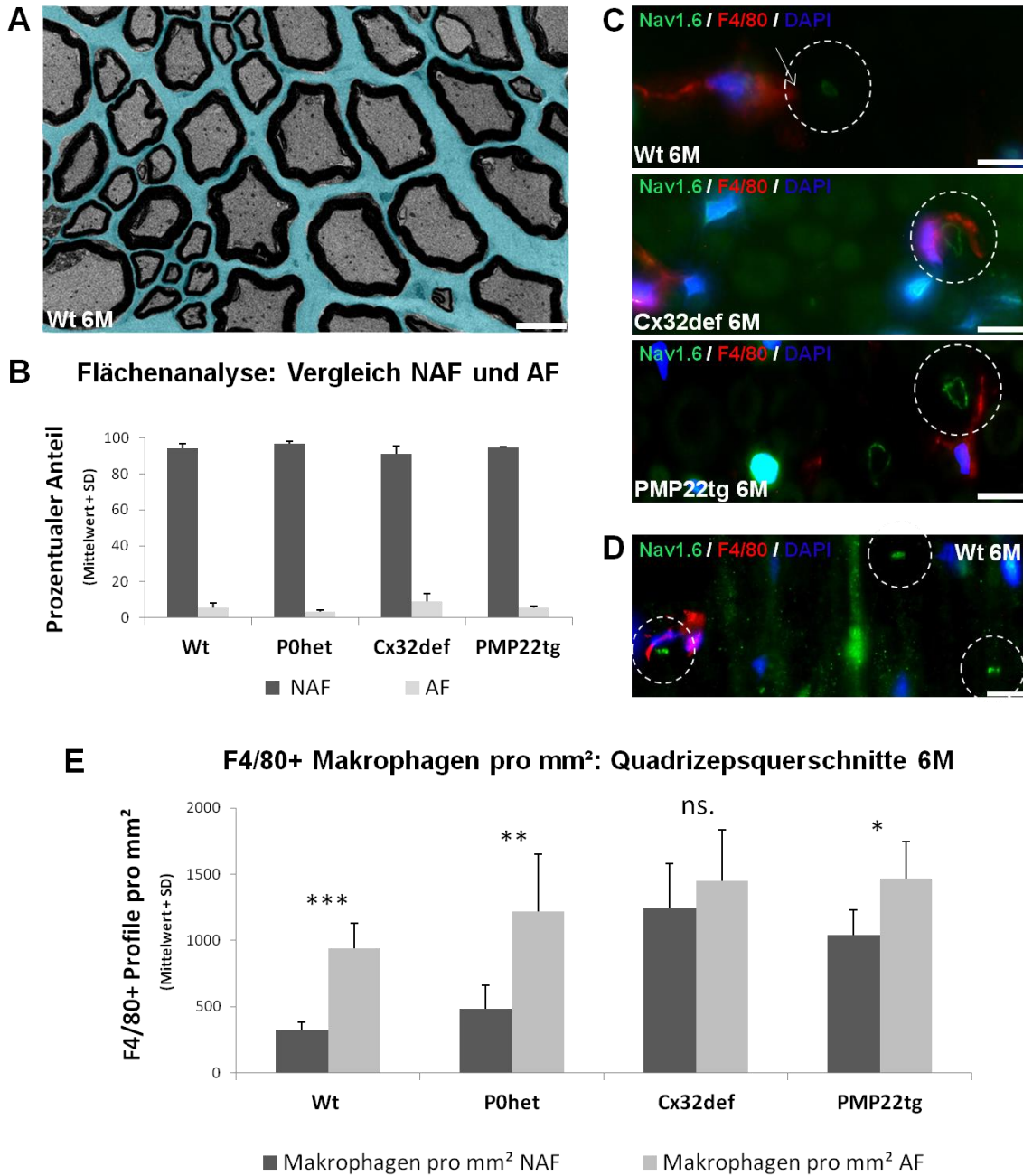


Abbildung 6: Präferentielle Assoziation von Makrophagen mit Ranvier'schen Schnürringen. A. Für die Flächenanalysen verwendete repräsentative elektronenmikroskopische Darstellung verschieden großer myelinisierter Nervenfasern. Nicht von myelinisierten Nervenfasern besetzte Fläche farbig (hellblau) hervorgehoben. Quadrizepsquerschnitt einer 6M alten Wt Maus. Maßstabsbalken, 5µm. B. Der etwa 30-40%ige Flächenanteil der Gesamtnervfläche, welcher nicht von myelinisierten Fasern eingenommen wird, setzt sich gemäß der Quantifizierung zu etwa 95 % aus Nicht-Assoziationsfläche (NAF) und zu 5 % aus Assoziationsfläche (AF) zusammen C. Repräsentative immunhistochemische Darstellung rotfluoreszenter F4/80-immunreaktiver Makrophagen in räumlicher Assoziation mit grünfluoreszenten Nav1.6-immunreaktiver RS. Gestrichelte Kreise heben die AF der einzelnen RS hervor. Quadrizepsquerschnitte von 6M alten Wt, Cx32def und PMP22tg Mäusen. Maßstabsbalken, 10µm. D. Repräsentative immunhistochemische Darstellung eines rotfluoreszenten F4/80-immunreaktiven Makrophagen in räumlicher Assoziation mit einem grünfluoreszenten Nav1.6-immunreaktiver RS. Gestrichelte Kreise heben die AF der einzelnen RS hervor. Quadrizepslängsschnitt einer 6M alten Wt Maus. Maßstabsbalken, 10µm. E. Quantitativer Vergleich aller F4/80-immunreaktiver Makrophagen pro mm²-NAF mit den mit Nav1.6-immunreaktiven RS assoziierten F4/80-immunreaktiven Makrophagen pro mm²-AF. Anzahl der Modelltiere pro Genotyp n = 5; ungepaart, zweiseitiger t-Test; statistische Signifikanz * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001.

Statistisch signifikant höhere Makrophagenanzahlen pro mm²-AF bestätigen deren präferentielle Lokalisation im räumlichen Umfeld von RS in 6M alten Wt-Mäusen. Im Gegensatz dazu konnte in den peripheren Nerven der untersuchten Cx32def Mäusen kein statistisch relevanter Unterschied im Vergleich beider oben genannter Gruppen festgestellt werden.

Des Weiteren wurden trotz der zuvor gezeigten statistisch signifikant erhöhten Gesamtmakrophagenanzahlen, auf der Basis des Vergleiches der Makrophagen pro mm²-AF, keine statistisch relevanten Unterschiede zwischen den CMT1-Modelltieren und ihren gleichaltrigen wildtypischen Geschwistermäusen festgestellt.

Ähnliche Ergebnisse erbrachte die Analyse von Quadrizepslängsschnitten der jeweiligen Genotypen.

Um die immunhistochemischen Daten auf ultrastruktureller Ebene zu bestätigen wurden exemplarisch elektronenmikroskopische Präparate von Quadrizepsquer- und -längsschnitten 6M alter Wt-Mäuse analysiert. Anhand morphologischer Kriterien, wie dem Vorhandensein eines elongierten Zellkörpers, fingerförmiger Fortsätze, vakuolisierten Zytoplasmas, sowie dem Fehlen einer Basallamina, wurden hierbei die endoneuralen Makrophagen sicher identifiziert. Exemplarische Analysen von immunelektronenmikroskopischen Präparaten, in welchen die endoneuralen Makrophagen anhand ihrer CD68-Immunreaktivität dargestellt wurden, rechtfertigen eine solche Identifikation auf morphologischer Basis (Abb. nicht gezeigt). Die RS konnten anhand ihrer charakteristischen Morphologie (siehe 1.2 Aufbau und Funktion von Ranvier'schen Schnürringen) eindeutig identifiziert werden. Wie in Abb. 7 ersichtlich konnte auch hierbei die räumliche Assoziation von Makrophagen mit RS beobachtet werden. Bei einer Mehrheit der analysierten RS konnte eine elektronendichte, in Kollagenfasern eingebettete, extrazelluläre Matrix (EZM) beobachtet werden, welche die RS im Querschnitt ringförmig umgab. Direkte Zell-Zell-Kontakte der Makrophagenfortsätze mit den assoziierten RS wurden nicht beobachtet (vgl. Abb. 7). Analog hierzu konnte auch in den immunhistochemischen Analysen keine Überlagerung des F4-80-immunreaktiven Signals mit dem Nav1.6-immunreaktiven Signal beobachtet werde (vgl. Abb. 6).

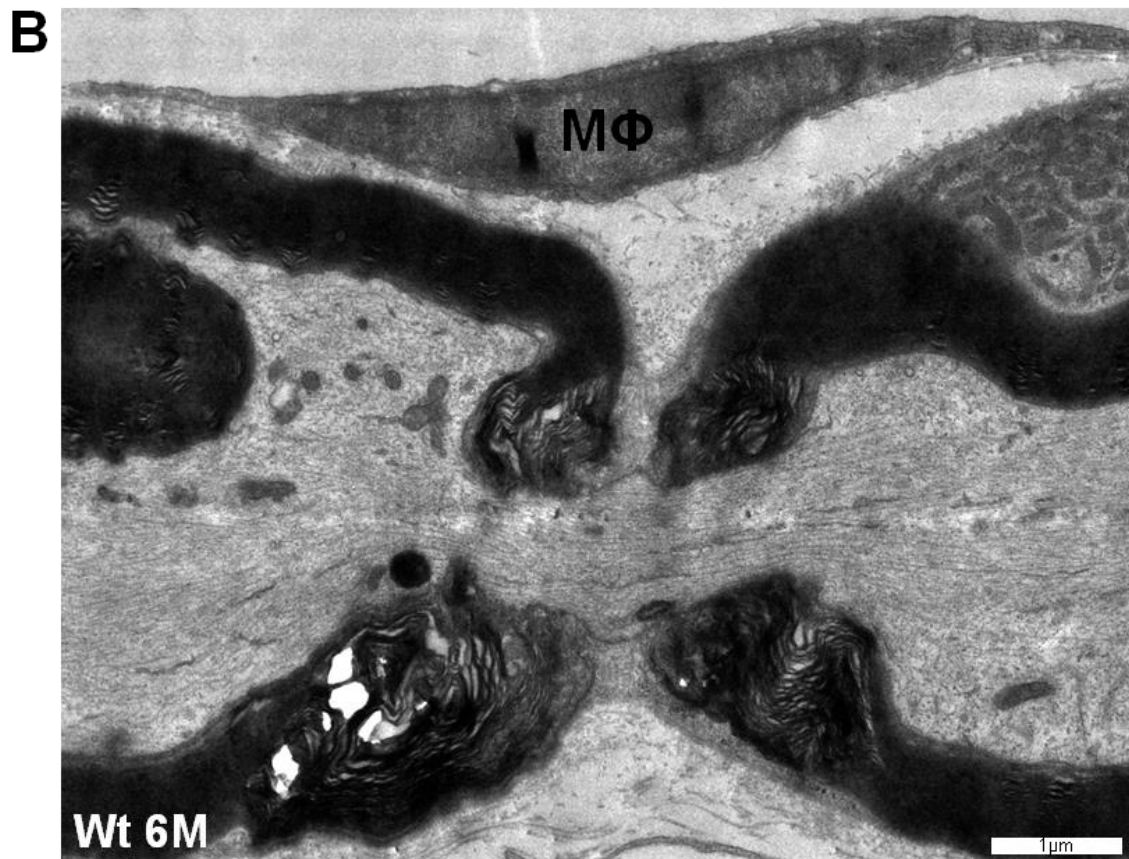
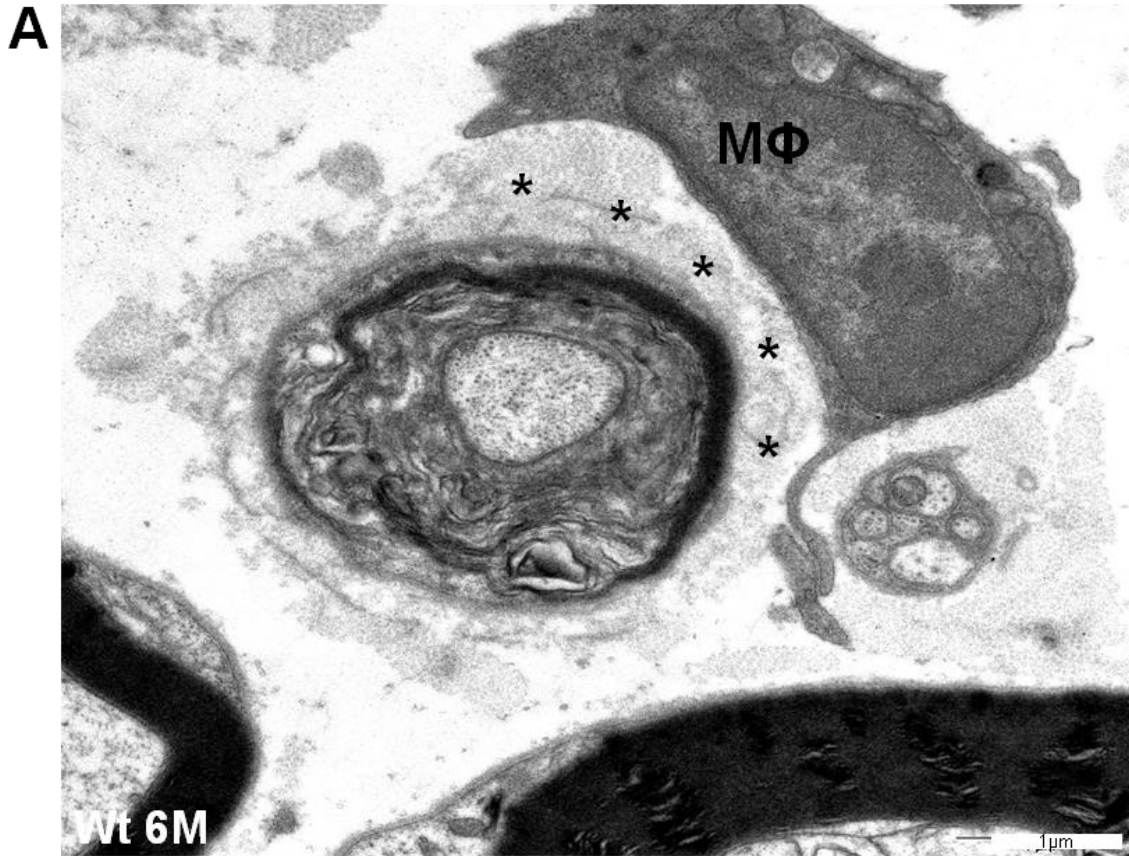


Abbildung 7: Räumliche Assoziation von Makrophagen mit Ranvier'schen Schnürringen. A. Repräsentative elektronenmikroskopische Aufnahme der räumlichen Beziehung eines Makrophagen (MΦ) und dem paranodalen Bereich (erkenntlich anhand des geringen Axondurchmessers in Kombination mit den sichtbaren paranodalen Schleifen und der dünnen Schicht kompakten Myelins) eines RS. Die eingefügten schwarzen Sterne markieren einen Teil der extrazellulären, elektronendichten Matrix, welche - eingebettet in Kollagenfasern- den RS umgibt. Quadrizepsquerschnitt einer 6M alten Wt Maus. Maßstabsbalken 1µm. B. Repräsentative elektronenmikroskopische Aufnahme eines longitudinal angeschnittenen RS mit räumlich assoziiertem Makrophagen (MΦ). Quadrizepslängsschnitt einer 6M alten Wt Maus. Maßstabsbalken 1µm.

Vereinzelt konnten vergleichbare Beobachtungen auch anhand der exemplarischen elektronenmikroskopischen Analysen von Quadrizepslängsschnitten 6M alter Cx32def Mäuse gemacht werden.

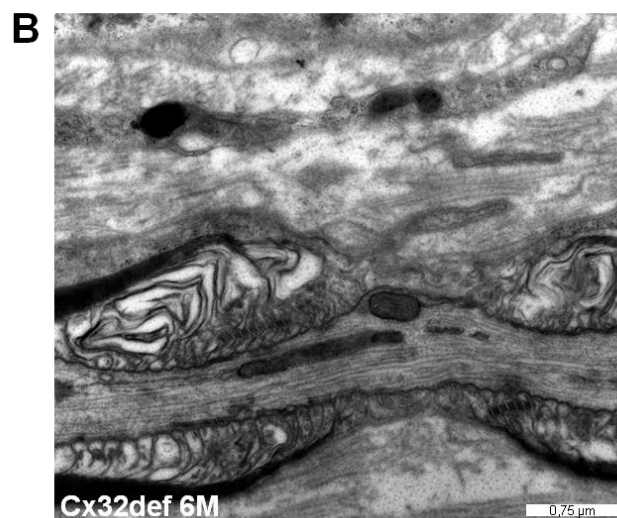
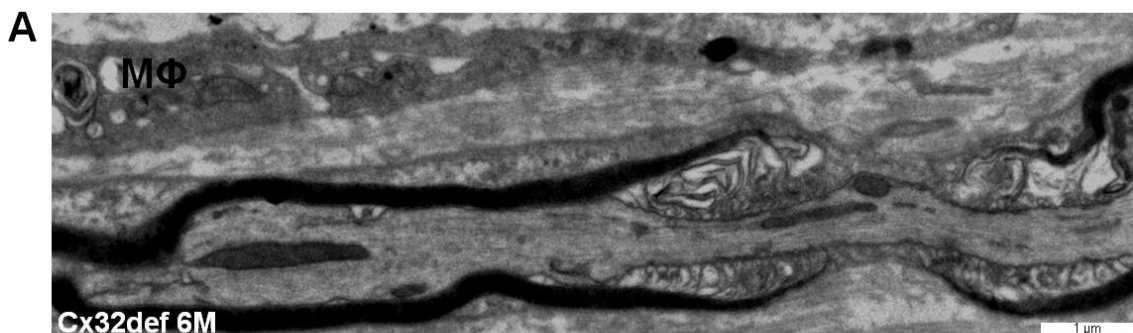


Abbildung 8: Räumliche Assoziation von Makrophagen mit Ranvier'schen Schnürringen. A. Repräsentative elektronenmikroskopische Aufnahme der räumlichen Beziehung eines mit Myelin beladenen Makrophagen (MΦ) mit einem longitudinal angeschnittenen RS. Quadrizepslängsschnitt einer 6M alten Cx32def Maus. Maßstabsbalken 1µm. B. Vergrößerte Aufnahme des in A. gezeigten RS mit räumlich assoziiertem Makrophagenfortsatz. Quadrizepslängsschnitt einer 6M alten Cx32def Maus. Maßstabsbalken 0,75µm.

Hierbei zeigten sich jedoch vor allem aktivierte, mit Myelin beladene Makrophagen, sog. Schaumzellen, weniger mit RS als mit den Internodien demyelinisierter Axonen assoziiert.

3.5 Exemplarische Darstellung von Makrophagen und Fibroblasten im räumlichen Umfeld von RS

Endoneurale Fibroblasten, als weitere zelluläre Bestandteile peripherer Nerven, sind neben der Kollagensynthese auch an der Produktion verschiedener Matrixproteinen beteiligt (Richard et al., 2012; Richard et al., 2014). Neuron-Glia-Antigen 2 (NG2), ein von endoneuralen Fibroblasten synthetisiertes Proteoglykan, besetzt beispielsweise nach dessen Freisetzung die RS um wohlmöglich dessen molekulare Organisation und Stabilität zu schützen (Martin et al., 2001).

Interessanterweise konnten anhand der oben gezeigten elektronenmikroskopischen Analysen ebenfalls elektronendichte, in Kollagenfasern eingebettete extrazelluläre Matrixbestandteile beobachtet werden, welche die RS zirkulär umgeben (vgl. Abb. 7 A und Abb. 9). Des Weiteren konnten hierbei exemplarisch endoneurale Fibroblasten als deren mögliche Quelle ausgemacht werden (Abb. 9).

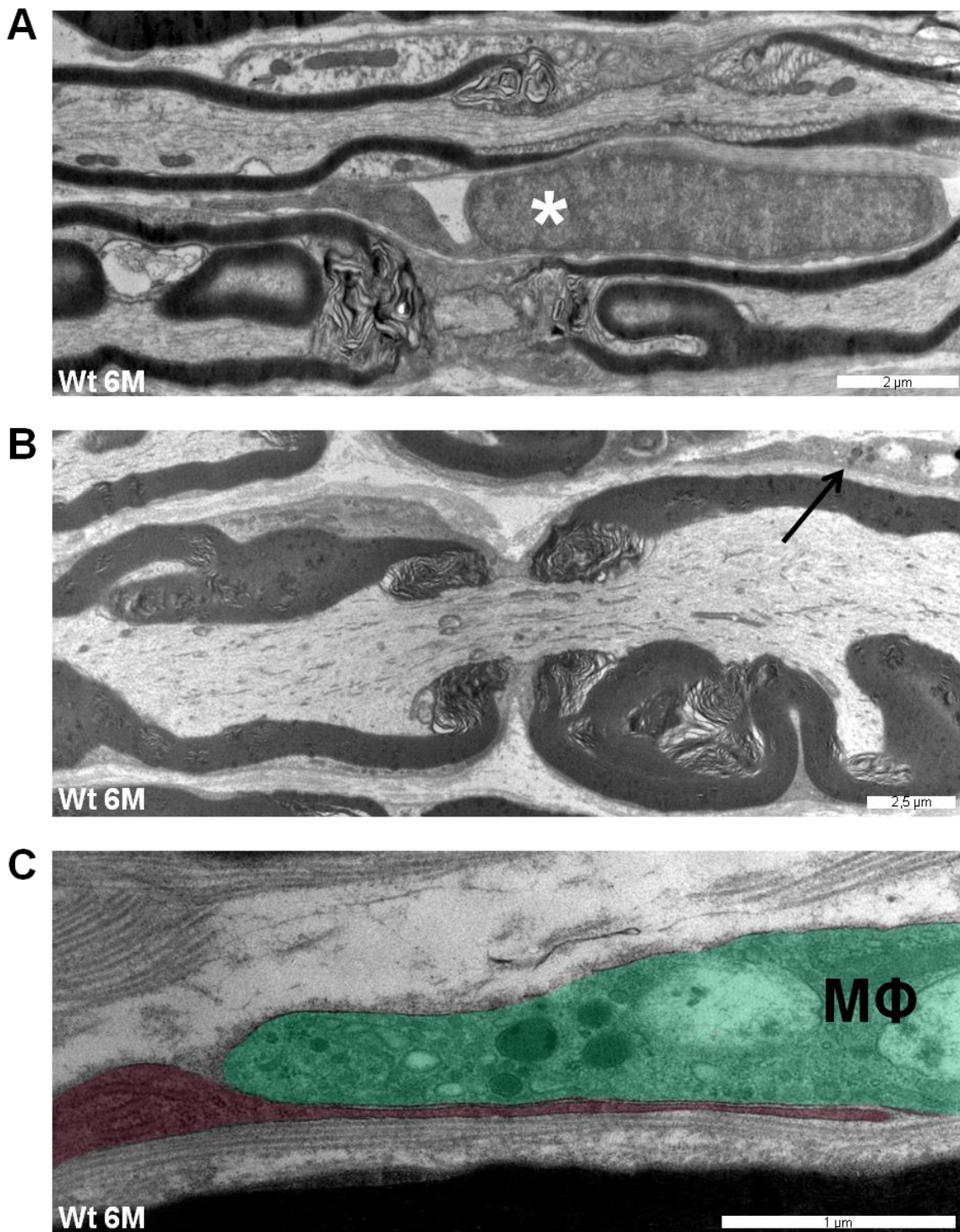


Abbildung 9: Räumliche Assoziation von Fibroblasten und Makrophagen mit Ranvier'schen Schnürringen. A. Repräsentative elektronenmikroskopische Aufnahme eines potentiell EZM-produzierenden Fibroblasten (weißer Stern) in räumlicher Beziehung zu longitudinal angeschnittenen RS. Quadrizepslängsschnitt einer 6M alten Wt Maus. Maßstabsbalken 2 μ m. B. Repräsentative elektronenmikroskopische Aufnahme eines möglichen Makrophagen (schwarzer Pfeil) in räumlicher

Nähe zu einem longitudinal angeschnittenen RS. Quadrizepslängsschnitt einer 6M alten Wt Maus. Maßstabsbalken 2,5µm. C. Vergrößerte Aufnahme der in B. gezeigten Situation. In grün dargestellter mit Myelin beladener Makrophage (MΦ) in Interaktion mit einem in rot dargestellten potentiell EZM produzierenden Fibroblasten. Quadrizepslängsschnitt einer 6M alten Wt Maus. Maßstabsbalken 1µm.

In diesem Zusammenhang sei auch auf die funktionell bisher nur teilweise geklärte Interaktion von endoneuralen Fibroblasten und Makrophagen hingewiesen (Groh et al., 2012; Klein and Martini, 2015; Groh et al., 2016), welche im Kontext der Assoziation mit RS ebenfalls beobachtet werden konnte (vgl. Abb. 9 B und 9 C , sowie Abb. 10).

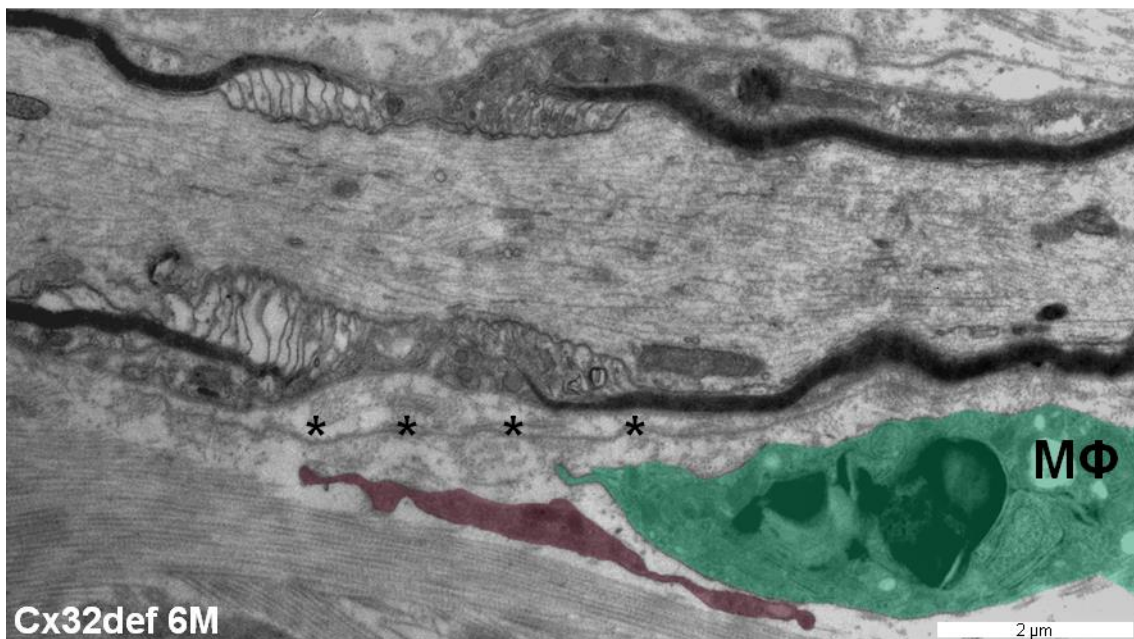


Abbildung 10: Assoziation eines Makrophagen mit einem Fibroblasten im räumlichen Umfeld eines Ranvier'schen Schnürrings. Repräsentative elektronenmikroskopische Aufnahme eines potentiell EZM-produzierenden rot dargestellten Fibroblasten in Interaktion mit einem grün dargestellten Makrophagen (MΦ) in räumlicher Nähe zu einem longitudinal angeschnittenen RS. Schwarze Sterne heben die, den RS umgebende, EZM hervor. Quadrizepslängsschnitt einer 6M alten Cx32def Maus. Maßstabsbalken 2µm.

4 Diskussion

Der Zusammenhang zwischen aktivierten pathogenen Makrophagen und gestörter RS-Organisation in der Pathogenese der beschriebenen CMT1A, -B und -X Modelle konnte anhand früherer Studien bereits aufgezeigt werden (Kohl et al., 2010a; Groh et al., 2012). Insbesondere deren genaue räumliche Beziehung zueinander bis hin zu einer möglichen Interaktion beider Strukturen wurde jedoch bisher nicht charakterisiert.

Des Weiteren sind mögliche physiologische Rollen residenter endoneuraler Makrophagen und deren räumliche Verteilung im PNS im Gegensatz zu Mikrogliazellen (Baalman et al., 2015), deren zentralnervösem Äquivalent, nur unzureichend untersucht.

Hieraus ergeben sich einerseits die Fragen nach der räumlichen Verteilung residenter Makrophagen im gesunden PNS, sowie andererseits deren mögliche Interaktion mit RS im Falle der CMT1-Erkrankungen.

4.1 Erhöhte Anzahl von Makrophagen in peripheren Nerven von 6 Monate alten CMT1-Modelltieren

Insbesondere Myelin-phagozytierende Makrophagen als Teil des angeborenen Immunsystems spielen eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der beschriebenen CMT1-Erkrankungen. Analog zu bereits veröffentlichten Studien (Carenini et al., 2001; Kobsar et al., 2002; Kobsar et al., 2005; Kobsar et al., 2006; Groh et al., 2010; Muller et al., 2010) konnte anhand immun-histochemischer Analysen ein erhöhte Anzahl von Makrophagen in peripheren Nerven 6 Monate alter CMT1-Modelltiere nachgewiesen werden. Die statistisch signifikante Erhöhung der Makrophagenanzahlen um das 3-4-fache konnte für alle drei untersuchten CMT1-Modelle aufgezeigt werden, was deren, in anderen Studien bereits mehrfach gezeigte, pathogenetische Relevanz unterstreicht (Klein and Martini, 2015).

Anhand der Analyse von Nervbiopsien erkrankter Patienten sind Makrophagen auch in den humanen CMT1-Unterformen nachweisbar (Groh et al., 2012).

Folglich stellen sowohl Makrophagen selbst, als auch die zu ihrer Aktivierung führenden Signalwege und deren Mediatoren vielversprechende Ansatzpunkte für neue therapeutische Strategien dar (Klein et al., 2015b).

4.2 Normale Anzahl von Ranvier'schen Schnürringen in peripheren Nerven von 6 Monate alten CMT1-Modelltieren

Abgesehen von den durch aktivierte Makrophagen vermehrt hervorgerufenen pathomorphologischen Veränderungen, wie das simultane Auftreten von De-, Hypo- und Remyelinisierung, sind Alterationen der axonalen Domänengliederung myelinisierter Nervenfasern Teil der CMT1-Pathogenese. Insbesondere im Hinblick auf die veränderten neurophysiologischen Eigenschaften (beispielsweise reduzierte Muskelsummenpotentiale) erkrankter Modelltiere spielen Architekturstörungen der RS möglicherweise eine wesentliche Rolle.

Im Gegensatz zu der in verschiedenen demyelinisierenden CMT1-Verlaufsformen beschriebenen juxtapanodalen Fehlverteilung von Kaliumkanälen, scheinen sowohl die internodale Länge, als auch die nodale Nav1.6-Expression wenig beeinflusst (Ulzheimer et al., 2004; Li et al., 2005; Kohl et al., 2010a; Groh et al., 2012).

Ausgehend von dieser Grundlage ergab die immunhistochemische Analyse der RS-Anzahlen auf der Basis ihrer charakteristischen Nav1.6-Expression keine Abweichung vom Normalzustand. Weder die absoluten RS-Anzahlen pro Quadrizepsquerschnitt, noch die ermittelten Anzahlen pro mm²-Nervfläche wiesen in den CMT1-Modelltieren im Vergleich zu ihren wildtypischen Geschwistermäusen signifikante Unterschiede auf.

Hierdurch wird eine Abgrenzung der eher mild verlaufenden demyelinisierenden CMT1-Erkrankungen mit normaler nodaler Nav1.6-Expression von durch vermehrten axonalen Schaden gekennzeichneten, dysmyelinisierenden Neuropathien deutlich. Letztere weisen in diesem Sinne wesentlich ausgeprägtere Myelinschäden, sowie Architekturstörungen der RS

einschließlich der nodalen Natriumkanal-Expression auf (Ulzheimer et al., 2004; Moldovan et al., 2011).

In diesem Zusammenhang scheint das Ausmaß des Myelinschadens direkt proportional mit dem Ausmaß der Störung der axonalen Domänengliederung einherzugehen (Arroyo et al., 2004). Insbesondere der direkte Zusammenhang zwischen Demyelinisierung und der juxtaparanodalen Fehlverteilung von Kaliumkanälen wurde anhand von EAE-Studien (Modelle für demyelinisierende Erkrankungen des ZNS) bereits beschrieben (Jukkola et al., 2012).

Im Falle der CMT1-Erkrankungen ist das Ausmaß des Myelinschadens wiederum von der Aktivierung pathogener Makrophagen abhängig (Klein and Martini, 2015), was einen möglichen Zusammenhang zwischen aktivierten Makrophagen und pathologischen Veränderungen am RS bedeuten könnte.

4.3 Präferentielle Lokalisation von Makrophagen im räumlichen Umfeld von Ranvier'schen Schnürringen in WT-Mäusen

Im Gegensatz zur Rolle aktivierter endoneuraler Makrophagen im Falle eines akuten oder chronischen Nervenschadens ist die physiologische Rolle residenter, endoneuraler Makrophagen im PNS bisher nur unzureichend charakterisiert (Klein and Martini, 2015). In diesem Zusammenhang scheint die hier aufgezeigte, physiologische Assoziation mit RS in wildtypischen Modelltieren von großer funktioneller Relevanz. Immunhistochemische Analysen des Quadrizeps-Muskelastes 6M alter Wt-Mäuse konnten für einen Anteil von 15-20 % der residenten endoneuralen Makrophagen eine räumliche Assoziation mit RS aufzeigen. Mithilfe elektronenmikroskopischer Flächenanalysen konnte dieser Zusammenhang des Weiteren quantitativ erfasst werden. Statistisch signifikant höhere Makrophagenanzahlen pro mm²-AF im Vergleich zu Makrophagen pro mm²-NAF heben deren präferentiellen Aufenthaltsort im räumlichen Umfeld von RS hervor.

Anhand des Vergleiches mit Mikrogliazellen, den residenten phagozytierenden Immunzellen des ZNS, sind für die endoneuralen residenten Makrophagen des PNS im räumlichen Umfeld von RS eine Reihe von Bedeutungen möglich

(Gertig and Hanisch, 2014). Neben der trophischen Unterstützung der assoziierten Nervenfasern, erscheint ein möglicher Einfluss auf die Entwicklung und Aufrechterhaltung der Domänengliederung myelinisierter Nervenfasern denkbar (Hanisch and Kettenmann, 2007; Ueno et al., 2013; Baalman et al., 2015).

Insbesondere aufgrund der komplexen molekularen Zusammensetzung und der damit verbundenen Bedeutung der RS für die saltatorische Erregungsausbreitung könnte eine mögliche Regulation der Impulsausbreitung eine weitere Funktion der mit RS räumlich assoziierten Makrophagen darstellen.

Analysen von Mikrogliazellen, welche eine Reihe von Ionenkanälen und Neurorezeptoren exprimieren und dadurch elektrophysiologische Eigenschaften besitzen, zeigen deren Einfluss auf die neuronale Erregbarkeit und Stabilität im ZNS (Kettenmann et al., 1993; Pannell et al., 2016; Wang et al., 2016; Wogram et al., 2016). Beispielsweise durch die Pufferung von Kationenströmen könnten die mit RS räumlich assoziierten endoneuralen Makrophagen die neuronale Erregungsausbreitung peripherer Nerven beeinflussen (Newell and Schlichter, 2005). So findet man beispielsweise in Wt-Mäusen, welche durch die Behandlung mit einem hochdosierten CSF-1-Rezeptorinhibitor keine bzw. eine stark reduzierte Anzahl an endoneuralen Makrophagen aufweisen, eine reduzierte Nervenleitgeschwindigkeit, sowie reduzierte Muskelsummenpotentiale (unveröffentlichte Beobachtungen Patzko A., Klein D). Folglich könnten endoneurale Makrophagen eine, mit Mikrogliazellen des ZNS vergleichbare, physiologisch relevante Rolle für die elektrophysiologischen Eigenschaften peripherer Nerven spielen. Die Möglichkeit eines neurotoxischen Effektes des CSF-1-Rezeptor-Inhibitors scheint aufgrund der Reversibilität oben genannter Beobachtungen nach Absetzen des Medikaments, sowie dem Fehlen von axonalen Schäden anhand immunhistochemischer Analysen, unwahrscheinlich (unveröffentlichte Beobachtung Patzko A., Klein D).

Interessanterweise konnte für eine Subpopulation von Mikrogliazellen eine Assoziation mit AIS („axonal initial segment“), den Impulsgeneratoren zentraler Axone, nachgewiesen werden (Baalman et al., 2015). Hierbei sei besonders die

ähnliche molekulare Organisation der AIS im Vergleich zu RS, was beispielsweise die Expression von Ionenkanälen, aber auch von Adhäsionsmolekülen wie NF186, NrCAM oder Caspr2 betrifft, erwähnt (Buttermore et al., 2013). Insbesondere extrazelluläre Matrixbestandteile, welche ebenfalls zentraler Bestandteil der AIS aber auch der RS sind, beziehungsweise Fibroblasten als deren mögliche zelluläre Quelle (vgl. Abb. 9 und Abb. 10), erscheinen in diesem Zusammenhang als denkbare Initiatoren der Mikroglia- bzw. Makrophagenassoziation (Baalman et al., 2015).

Direkte Zell-Zell-Interaktionen zwischen Makrophagen und RS konnten sowohl auf der Basis von immunhistochemischen Analysen - verdeutlicht durch eine fehlende Überlagerung der Immunreaktivität beider Komponenten (vgl. Abb. 5 und Abb. 6) - als auch elektronenmikroskopischer Analysen (vgl. Abb. 7, 8, 9, 10) nicht beobachtet werden. Interessanterweise konnten stattdessen erstmals in Kollagenfasern eingebettete, extrazelluläre Matrixbestandteile unbekannter Zusammensetzung, welche die RS ringförmig umgeben, nachgewiesen werden (vgl. Abb. 7 und Abb. 10). Folglich erscheint ein möglicher Zusammenhang der assoziierten Makrophagen mit den, die RS umgebenden und möglicherweise deren Integrität schützenden, extrazellulären Matrixbestandteilen denkbar (vgl. Abb. 11). Hierbei sind weitere Untersuchungen notwendig um die EZM-Bestandteile in Ihrer Zusammensetzung zu bestimmen und als Initiatoren der Makrophagenassoziation auszumachen (Baalman et al., 2015).

Die bisher nur teilweise geklärte Interaktion zwischen endoneuralen Fibroblasten und Makrophagen in Wt-Mäusen (Groh et al., 2012; Klein and Martini, 2015; Groh et al., 2016), welche im Kontext der Assoziation mit RS ebenfalls beobachtet werden konnte (vgl. Abb. 9 B und 9C sowie Abb. 10), stellt hierbei einen weiteren Diskussionspunkt dar (vgl. Abb. 11).

Einerseits scheint eine Makrophagen-RS-Assoziation aufgrund der Makrophagen-Interaktion mit EZM-produzierenden Fibroblasten denkbar. Andererseits ist eine durch die EZM vermittelte räumliche Assoziation von Makrophagen mit RS denkbar. Hierbei scheint eine mögliche funktionelle Rolle der assoziierten Makrophagen am Aufbau und Umsatz der EZM möglich.

Weitere morphologische Analysen sind in diesem Fall notwendig um den genauen Zusammenhang zwischen Fibroblasten und RS bzw. die sie umgebende EZM einerseits, sowie den assoziierten Makrophagen andererseits zu charakterisieren und funktionell zu bewerten.

4.4 Ranvier'schen Schnürringe sind nicht präferentieller Angriffspunkt aktivierter pathogener Makrophagen in der CMT1-Pathogenese

Eine mögliche Ursache der juxtaparanodalen Architekturstörung in der Pathogenese erblicher Neuropathien stellt die räumliche Interaktion pathogener Makrophagen mit RS dar.

Immunhistochemische Analysen von peripheren Nerven der verschiedenen CMT1-Modelltiere zeigen, dass bei einem Anteil von ca. 20 % der RS weiterhin Makrophagen im räumlichen Umfeld nachweisbar sind, was im Vergleich mit wildtypischen Kontrolltieren keinen statistisch relevanten Unterschied ausmacht (vgl. Abb. 6).

Interessanterweise ist in den CMT1-Modelltieren jedoch ein statistisch signifikant niedrigerer Anteil an F4/80-immunreaktiven Makrophagen mit RS räumlich assoziiert. Im Vergleich zu ihren wildtypischen Kontrolltieren, in welchen ein Anteil von 15-20 % aller endoneuraler Makrophagen im räumlichen Umfeld von RS aufzufinden ist, weisen die CMT1-Modelltiere signifikant niedrigere Assoziationsraten von durchschnittlich nur 5-10 % auf.

Trotz der statistisch signifikant höheren Gesamtmakrophagenanzahl in den peripheren Nerven der erkrankten Mäuse, weist die ermittelte Makrophagenanzahl pro mm²-AF in den CMT1-Modelltieren im Vergleich zu ihren wildtypischen Kontrolltieren keinen statistisch relevanten Unterschied auf. Hierbei sind die ermittelten Makrophagenanzahlen pro mm²-AF als Maß für deren präferentielle Lokalisation im Umfeld von RS zu werten.

Folglich scheinen sich die, während der CMT1-Pathogenese zusätzlich vorhandenen endoneuralen Makrophagen vor allem im räumlichen Umfeld der Internodien und nicht der RS der betroffenen Nervenfasern zu gruppieren.

Das auf morphologischen Studien an verstorbenen AMAN-Patienten basierende Bild eines Antikörper-vermittelten direkten Immunangriffes von Makrophagen auf RS, welche diese bisweilen als Eintrittspforte zum periaxonalen Raum nutzen, konnte für die demyelinisierenden CMT1-Modelle nicht bestätigt werden (Griffin et al., 1996; Hafer-Macko et al., 1996). Interessanterweise konnten in P0het-Mäusen im Gegensatz zu peripheren Nerven von GBS-Patienten keine nodalen Komplementablagerungen beobachtet werden (McGonigal et al., 2010; Devaux et al., 2012; Willison and Goodyear, 2013; Klein et al., 2015a).

Somit scheint anders als in der Pathogenese des GBS ein Komplement-vermittelter Angriff von aktivierten Makrophagen auf RS während der CMT1-Pathogenese unwahrscheinlich.

Verdeutlicht wird dies des Weiteren anhand der Analyse von 6M alten Cx32def-Mäusen. Hierbei kann aufgrund des fehlenden statistischen Unterschiedes zwischen Makrophagen pro mm²-AF und pro mm²-NAF generell nicht von einer präferentiellen Lokalisation der Makrophagen im räumlichen Umfeld von RS ausgegangen werden (vgl. Abb. 6 E). Unterstrichen wird dies durch die elektronenmikroskopische Beobachtung, dass in den Cx32def-Mäusen zwar weiterhin Makrophagen in räumlicher Nähe zu RS nachweisbar sind (vgl. Abb. 8 und 10), jedoch vor allem mit Myelin beladene, aktivierte Makrophagen, sog. Schaumzellen, häufiger mit den Internodien demyelinisierter Nervenfasern assoziiert sind (keine Abb. gezeigt).

Weitere Erkenntnisse erbrachten die morphologischen Analysen peripherer Nerven von Cx32-heterozygot defizienten Mäusen, welche sowohl Cx32-positive („gesunde“), als auch Cx32-negative („erkrankte“) Nervenfasern aufweisen. Hierbei konnte eine präferentielle Makrophagenassoziation mit dedifferenzierten Cx32-negativen Nervenfasern beobachtet werden. Interessanterweise waren sowohl das Ausmaß der Dedifferenzierung der betroffenen Schwann-Zellen, als auch der damit einhergehende Myelinschaden erneut von durch CSF-1 aktivierten pathogenen Makrophagen abhängig. Somit stellen die mutierten Schwann-Zellen den direkten Angriffspunkt von

endoneuralen, phagozytierenden Makrophagen dar. Diese wiederum bewirken im Anschluss an ihre Aktivierung die Dedifferenzierung und die darauf folgende Demyelinisierung der betroffenen Schwann-Zellen (Klein et al., 2014; Groh et al., 2015).

Eine im weiteren Verlauf auftretende juxtapanodale Architekturstörung wäre in diesem Sinne als Folge der durch die pathogenen Makrophagen ausgelösten Dedifferenzierung bzw. Demyelinisierung zu werten.

Die räumliche Interaktion pathogener Makrophagen mit genetisch erkrankten Schwann-Zellen ist zusammenfassend zwar ein wesentlicher Schritt in der Pathogenese der CMT1X-Erkrankung, eine direkte Interaktion von aktivierten Makrophagen mit RS als primäre Ursache der juxtapanodalen Architekturstörung erscheint jedoch unwahrscheinlich. Unterstrichen wird dies durch die fehlende Beobachtung von direkten Zell-Zell-Interaktion zwischen RS und assoziierten Makrophagen, welche möglicherweise durch die vorhandene EZM verhindert wird (vgl. Abb. 6, 7, 8, 9, 10). Die Möglichkeit einer, auf Makrophagen zurückgehende, Zytokin vermittelte und nicht durch direkte Zell-Zell-Interaktion ausgelöste, juxtapanodalen Architekturstörung bleibt jedoch bestehen.

„Live-Imaging“-Methoden wären in diesem Zusammenhang von höchstem Interesse, um den dynamischen Prozess der Makrophageneinwanderung, -vermehrung, -aktivierung und -Zielerkennung weiter zu charakterisieren (Rosenberg et al., 2012; Vasudeva et al., 2014). Aufgrund der chronischen Pathogenese der CMT1-Erkrankungen, im Gegensatz zur akut ablaufenden Waller'schen Degeneration nach Nervenverletzungen, ist dies jedoch technisch aufwändig und schwer zu realisieren.

4.5 Zusammenfassender Ausblick

Anhand oben gezeigter Daten erscheint eine bifunktionale Rolle der endoneuralen Makrophagen in Abhängigkeit von ihrem Aktivierungsgrad bzw. molekularem Phänotyp denkbar.

Im Normalzustand scheinen etwa ein Fünftel der residenten, endoneuralen Makrophagen aufgrund ihrer räumlichen Assoziation mit RS, bzw. der sie umgebenden EZM, an der Aufrechterhaltung der Domänengliederung bzw. elektrophysiologischen Eigenschaften myelinisierter Nervenfasern beteiligt zu sein.

Unter pathologischen Bedingungen im Falle der untersuchten CMT1-Erkrankungen, ändert sich jedoch der Phänotyp der Makrophagen im Anschluss an ihre CSF-1 vermittelte Aktivierung. In Folge dessen sind die nun in vermehrter Anzahl auftretenden Makrophagen als schädliche zelluläre Bestandteile des angeborenen Immunsystems an der Dedifferenzierung, Demyelinisierung und axonalen Schädigung genetisch erkrankter myelinisierter Nervenfasern beteiligt. RS stellen auf der Basis oben gezeigter Daten hierbei nicht deren präferentiellen Angriffspunkt dar. Pathologische Veränderungen der molekularen Architektur selbiger könnten in diesem Sinne als sekundäre Folge der, durch die pathogenen Makrophagen ausgelösten, Dedifferenzierung bzw. Demyelinisierung der erkrankter Nervenfasern gewertet werden.

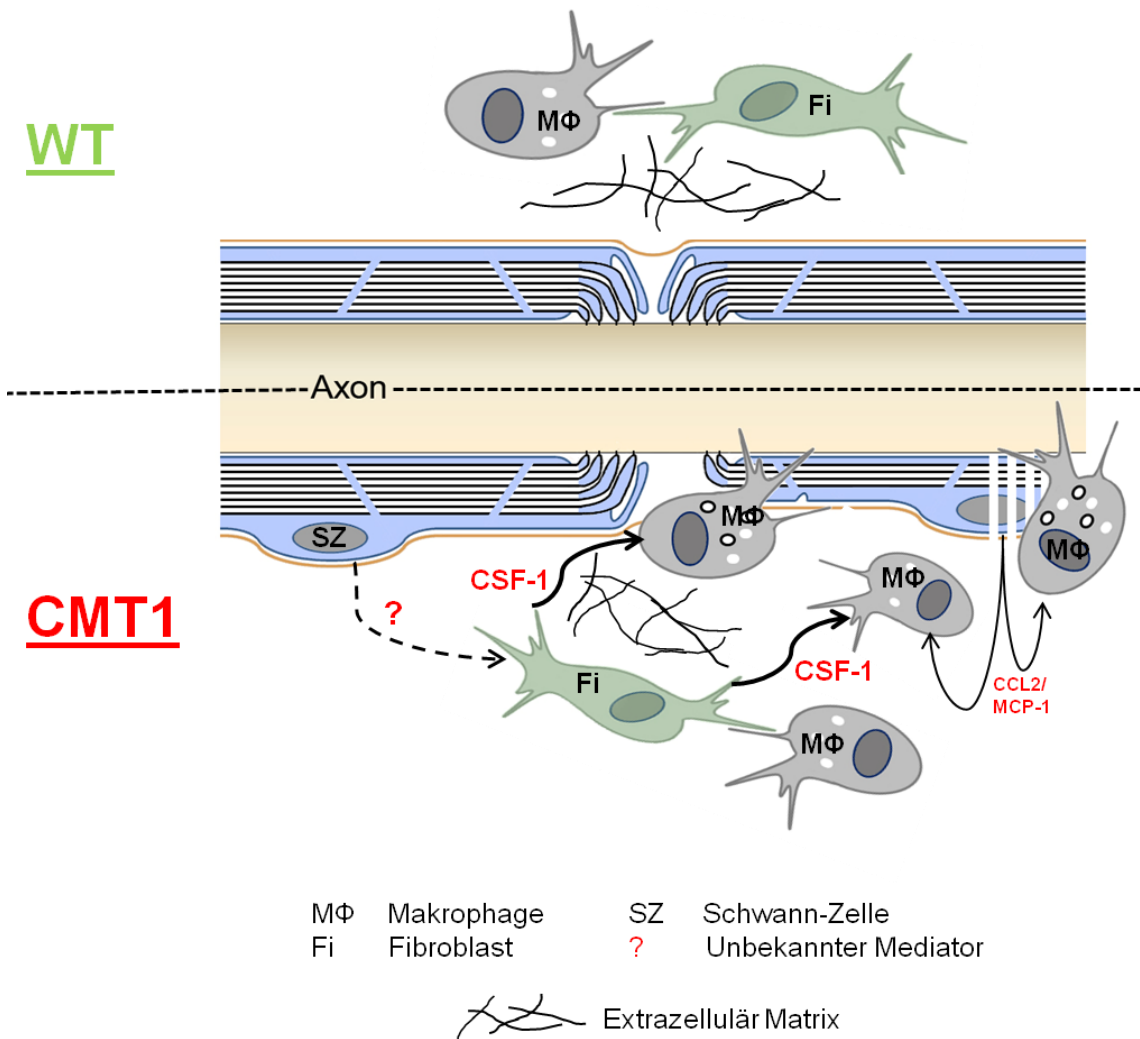


Abbildung 11: Schematische vergleichende Darstellung der räumlichen Beziehung zwischen endoneuralen Makrophagen, Fibroblasten und RS in Wt-Mäusen und CMT1-Modelltieren. Die obere Bildhälfte spiegelt die Wt-Situation wider. Dargestellt ist die Interaktion zwischen einem potentiell EZM produzierenden Fibroblasten und einem assoziierten Makrophagen im räumlichen Umfeld eines RS (vgl. Abb. 9). Hierbei ist eine mögliche Rolle der Makrophagen an der Aufrechterhaltung der Domänengliederung sowie der elektrophysiologischen Eigenschaften myelinisierter Nervenfasern denkbar. Der Fall der genetisch bedingten CMT1A, -B und -X Modelle spiegelt sich in der unteren Bildhälfte wider. Hierbei kommt es zu einer von endoneuralen Fibroblasten initiierten CSF-1-vermittelten Rekrutierung und Aktivierung zusätzlicher Makrophagen. Der nun veränderte Makrophagenphänotyp führt in Folge dessen zur Dedifferenzierung sowie Demyelinisierung der erkrankten Schwann-Zellen. Durch das von den mutierten Schwann-Zellen vermehrt produzierte CCL2/MCP-1 kommt es zur Navigation der Makrophagen an selbige. Interessanterweise erfolgt der direkte Angriff der Makrophagen auf die erkrankten Schwann-Zellen jedoch vor allem an deren Internodien, sodass eine im weiteren Verlauf

auftretende Veränderung der molekularen Architektur der RS höchstwahrscheinlich als sekundäre Folge der Schwann-Zell-Schädigung hervorgeht. Eine RS-Schädigung durch primären, direkten Angriff der pathogen-aktivierten Makrophagen erscheint unwahrscheinlich. Bisher unbekannt bleibt der zur Fibroblastenaktivierung führende Mediator bzw. Signalweg (rotes Fragezeichen).

5 Zusammenfassung

Die Charcot-Marie-Tooth Typ 1 Erkrankungen sind eine genetisch heterogene Gruppe, aktuell nicht kurativ therapierbarer, erblicher Neuropathien des Peripheren Nervensystems. Klinische Manifestationen reichen von Sensibilitätsstörungen, verminderten Muskeleigenreflexen, sowie fortschreitenden Lähmungen, bis hin zu Muskelatrophie und bedeuten für die betroffenen Patienten eine starke Einschränkung der Lebensqualität. Anhand früherer Studien wurde Makrophagen, als Teil des angeborenen Immunsystems, eine entscheidende Rolle in der Pathogenese dreier CMT1-Unterformen zugeschrieben. Abgesehen von den morphologischen Manifestationen der demyelinisierenden CMT1-Erkrankungen, wie simultanes Auftreten von Dedifferenzierung, sowie Hypo-, und Demyelinisierung erkrankter Schwann-Zellen, sind pathologische Veränderungen der Domänengliederung der Ranvier'schen Schnürringe betroffener Nervenfasern ebenfalls von der Aktivierung pathogener Makrophagen abhängig.

Auf der Basis verschiedener veröffentlichter Studien, welche sowohl demyelinisierende Erkrankungen des ZNS, aber auch primär durch axonale Schäden gekennzeichnete Erkrankungen des PNS beinhalten, besteht ein möglicher räumlicher Zusammenhang zwischen Architekturstörungen der RS und aktivierten pathogenen Mikrogliazellen bzw. Makrophagen.

In dieser Studie konnte, anhand morphologischer Analysen von peripherem Nervengewebe, in Wt-Mäusen erstmals eine unerwartete präferentielle Lokalisation von Makrophagen im räumlichen Umfeld von RS beobachtet werden. Hierbei scheint, trotz des Fehlens einer direkten Zell-Zell-Interaktion zwischen Makrophagen und RS, vor allem im Hinblick auf die ebenfalls im räumlichen Umfeld von RS nachweisbare EZM und Fibroblasten, eine funktionelle Relevanz der assoziierten Makrophagen für die Aufrechterhaltung der Domänengliederung bzw. elektrophysiologischen Eigenschaften myelinisierter peripherer Nervenfasern denkbar.

Im Gegensatz dazu wurde trotz der signifikanten Zunahme der Makrophagenanzahlen in den drei untersuchten CMT1-Mausmodellen keine erhöhte räumliche Assoziation mit den RS der mutierten Schwann-Zellen beobachtet. Vielmehr konnten anhand des Vergleiches mit wildtypischen Kontrollmäusen signifikant erniedrigte Assoziationsraten beider Strukturen in den CMT1-Modelltieren festgestellt werden. Folglich scheint die von der Einwanderung und Aktivierung pathogener Makrophagen abhängige Störung der Domänengliederung der RS der mutierten Schwann-Zellen, nicht durch eine direkte Interaktion bzw. räumliche Assoziation von Makrophagen mit RS ausgelöst zu werden.

6 Literaturverzeichnis

- Adlkofer K, Martini R, Aguzzi A, Zielasek J, Toyka KV, Suter U (1995) Hypermyelination and demyelinating peripheral neuropathy in Pmp22-deficient mice. *Nature genetics* 11:274-280.
- Anzini P, Neuberg DH, Schachner M, Nelles E, Willecke K, Zielasek J, Toyka KV, Suter U, Martini R (1997) Structural abnormalities and deficient maintenance of peripheral nerve myelin in mice lacking the gap junction protein connexin 32. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 17:4545-4551.
- Arroyo EJ, Scherer SS (2000) On the molecular architecture of myelinated fibers. *Histochemistry and cell biology* 113:1-18.
- Arroyo EJ, Sirkowski EE, Chitale R, Scherer SS (2004) Acute demyelination disrupts the molecular organization of peripheral nervous system nodes. *The Journal of comparative neurology* 479:424-434.
- Arroyo EJ, Xu T, Grinspan J, Lambert S, Levinson SR, Brophy PJ, Peles E, Scherer SS (2002) Genetic dysmyelination alters the molecular architecture of the nodal region. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22:1726-1737.
- Arvidson B (1977) Cellular uptake of exogenous horseradish peroxidase in mouse peripheral nerve. *Acta neuropathologica* 37:35-41.
- Baalman K, Marin MA, Ho TS, Godoy M, Cherian L, Robertson C, Rasband MN (2015) Axon initial segment-associated microglia. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 35:2283-2292.
- Balice-Gordon RJ, Bone LJ, Scherer SS (1998) Functional gap junctions in the schwann cell myelin sheath. *The Journal of cell biology* 142:1095-1104.
- Beirowski B, Babetto E, Golden JP, Chen YJ, Yang K, Gross RW, Patti GJ, Milbrandt J (2014) Metabolic regulator LKB1 is crucial for Schwann cell-mediated axon maintenance. *Nature neuroscience* 17:1351-1361.
- Bell MA, Weddell AG (1984) A descriptive study of the blood vessels of the sciatic nerve in the rat, man and other mammals. *Brain : a journal of neurology* 107 (Pt 3):871-898.
- Berger P, Niemann A, Suter U (2006) Schwann cells and the pathogenesis of inherited motor and sensory neuropathies (Charcot-Marie-Tooth disease). *Glia* 54:243-257.
- Bonetti B, Monaco S, Giannini C, Ferrari S, Zanusso G, Rizzuto N (1993) Human peripheral nerve macrophages in normal and pathological conditions. *Journal of the neurological sciences* 118:158-168.
- Boyle ME, Berglund EO, Murai KK, Weber L, Peles E, Ranscht B (2001) Contactin orchestrates assembly of the septate-like junctions at the paranode in myelinated peripheral nerve. *Neuron* 30:385-397.
- Buttermore ED, Thaxton CL, Bhat MA (2013) Organization and maintenance of molecular domains in myelinated axons. *Journal of neuroscience research* 91:603-622.
- Carenini S, Maurer M, Werner A, Blazyca H, Toyka KV, Schmid CD, Raivich G, Martini R (2001) The role of macrophages in demyelinating peripheral

- nervous system of mice heterozygously deficient in p0. *The Journal of cell biology* 152:301-308.
- Chavada G, Willison HJ (2012) Autoantibodies in immune-mediated neuropathies. *Current opinion in neurology* 25:550-555.
- Chen J, Trounstein M, Alt FW, Young F, Kurahara C, Loring JF, Huszar D (1993) Immunoglobulin gene rearrangement in B cell deficient mice generated by targeted deletion of the JH locus. *International immunology* 5:647-656.
- Devaux JJ, Scherer SS (2005) Altered ion channels in an animal model of Charcot-Marie-Tooth disease type IA. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25:1470-1480.
- Devaux JJ, Odaka M, Yuki N (2012) Nodal proteins are target antigens in Guillain-Barre syndrome. *Journal of the peripheral nervous system : JPNS* 17:62-71.
- Dyck PJ, Lambert EH (1968) Lower motor and primary sensory neuron diseases with peroneal muscular atrophy. II. Neurologic, genetic, and electrophysiologic findings in various neuronal degenerations. *Archives of neurology* 18:619-625.
- Dzhashiashvili Y, Zhang Y, Galinska J, Lam I, Grumet M, Salzer JL (2007) Nodes of Ranvier and axon initial segments are ankyrin G-dependent domains that assemble by distinct mechanisms. *The Journal of cell biology* 177:857-870.
- Eshed-Eisenbach Y, Peles E (2013) The making of a node: a co-production of neurons and glia. *Current opinion in neurobiology* 23:1049-1056.
- Eshed Y, Feinberg K, Carey DJ, Peles E (2007) Secreted gliomedin is a perinodal matrix component of peripheral nerves. *The Journal of cell biology* 177:551-562.
- Eshed Y, Feinberg K, Poliak S, Sabanay H, Sarig-Nadir O, Spiegel I, Bermingham JR, Jr., Peles E (2005) Gliomedin mediates Schwann cell-axon interaction and the molecular assembly of the nodes of Ranvier. *Neuron* 47:215-229.
- Ey B, Kobsar I, Blazyca H, Kroner A, Martini R (2007) Visualization of degenerating axons in a dysmyelinating mouse mutant with axonal loss. *Molecular and cellular neurosciences* 35:153-160.
- Fischer S, Weishaupt A, Troppmair J, Martini R (2008a) Increase of MCP-1 (CCL2) in myelin mutant Schwann cells is mediated by MEK-ERK signaling pathway. *Glia* 56:836-843.
- Fischer S, Kleinschnitz C, Muller M, Kobsar I, Ip CW, Rollins B, Martini R (2008b) Monocyte chemoattractant protein-1 is a pathogenic component in a model for a hereditary peripheral neuropathy. *Molecular and cellular neurosciences* 37:359-366.
- Fledrich R, Stassart RM, Sereda MW (2012) Murine therapeutic models for Charcot-Marie-Tooth (CMT) disease. *British medical bulletin* 102:89-113.
- Frei R, Motzing S, Kinkelin I, Schachner M, Koltzenburg M, Martini R (1999) Loss of distal axons and sensory Merkel cells and features indicative of muscle denervation in hindlimbs of P0-deficient mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 19:6058-6067.

- Fruttiger M, Montag D, Schachner M, Martini R (1995) Crucial role for the myelin-associated glycoprotein in the maintenance of axon-myelin integrity. *The European journal of neuroscience* 7:511-515.
- Gamble HJ, Eames RA (1964) An Electron Microscope Study of the Connective Tissues of Human Peripheral Nerve. *Journal of anatomy* 98:655-663.
- Gertig U, Hanisch UK (2014) Microglial diversity by responses and responders. *Frontiers in cellular neuroscience* 8:101.
- Giese KP, Martini R, Lemke G, Soriano P, Schachner M (1992) Mouse P0 gene disruption leads to hypomyelination, abnormal expression of recognition molecules, and degeneration of myelin and axons. *Cell* 71:565-576.
- Ginhoux F, Jung S (2014) Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. *Nature reviews Immunology* 14:392-404.
- Griffin JW, George R (1993) The resident macrophages in the peripheral nervous system are renewed from the bone marrow: new variations on an old theme. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 69:257-260.
- Griffin JW, Thompson WJ (2008) Biology and pathology of nonmyelinating Schwann cells. *Glia* 56:1518-1531.
- Griffin JW, George R, Ho T (1993) Macrophage systems in peripheral nerves. A review. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 52:553-560.
- Griffin JW, Li CY, Macko C, Ho TW, Hsieh ST, Xue P, Wang FA, Cornblath DR, McKhann GM, Asbury AK (1996) Early nodal changes in the acute motor axonal neuropathy pattern of the Guillain-Barre syndrome. *Journal of neurocytology* 25:33-51.
- Groh J, Basu R, Stanley ER, Martini R (2016) Cell-Surface and Secreted Isoforms of CSF-1 Exert Opposing Roles in Macrophage-Mediated Neural Damage in Cx32-Deficient Mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 36:1890-1901.
- Groh J, Weis J, Zieger H, Stanley ER, Heuer H, Martini R (2012) Colony-stimulating factor-1 mediates macrophage-related neural damage in a model for Charcot-Marie-Tooth disease type 1X. *Brain : a journal of neurology* 135:88-104.
- Groh J, Klein I, Hollmann C, Wettmarshausen J, Klein D, Martini R (2015) CSF-1-activated macrophages are target-directed and essential mediators of Schwann cell dedifferentiation and dysfunction in Cx32-deficient mice. *Glia* 63:977-986.
- Groh J, Heintl K, Kohl B, Wessig C, Greeske J, Fischer S, Martini R (2010) Attenuation of MCP-1/CCL2 expression ameliorates neuropathy in a mouse model for Charcot-Marie-Tooth 1X. *Human molecular genetics* 19:3530-3543.
- Hafer-Macko C, Hsieh ST, Li CY, Ho TW, Sheikh K, Cornblath DR, McKhann GM, Asbury AK, Griffin JW (1996) Acute motor axonal neuropathy: an antibody-mediated attack on axolemma. *Annals of neurology* 40:635-644.

- Hanisch UK, Kettenmann H (2007) Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nature neuroscience* 10:1387-1394.
- Howell OW, Rundle JL, Garg A, Komada M, Brophy PJ, Reynolds R (2010) Activated microglia mediate axoglial disruption that contributes to axonal injury in multiple sclerosis. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 69:1017-1033.
- Howell OW, Palser A, Polito A, Melrose S, Zonta B, Scheiermann C, Vora AJ, Brophy PJ, Reynolds R (2006) Disruption of neurofascin localization reveals early changes preceding demyelination and remyelination in multiple sclerosis. *Brain : a journal of neurology* 129:3173-3185.
- Huxley C, Passage E, Robertson AM, Youl B, Huston S, Manson A, Saberandjionedi D, Figarella-Branger D, Pellissier JF, Thomas PK, Fontes M (1998) Correlation between varying levels of PMP22 expression and the degree of demyelination and reduction in nerve conduction velocity in transgenic mice. *Human molecular genetics* 7:449-458.
- Jerath NU, Shy ME (2015) Hereditary motor and sensory neuropathies: Understanding molecular pathogenesis could lead to future treatment strategies. *Biochimica et biophysica acta* 1852:667-678.
- Jessen KR, Mirsky R (2005) The origin and development of glial cells in peripheral nerves. *Nature reviews Neuroscience* 6:671-682.
- Jessen KR, Brennan A, Morgan L, Mirsky R, Kent A, Hashimoto Y, Gavrilovic J (1994) The Schwann cell precursor and its fate: a study of cell death and differentiation during gliogenesis in rat embryonic nerves. *Neuron* 12:509-527.
- Joseph NM, Mukoyama YS, Mosher JT, Jaegle M, Crone SA, Dormand EL, Lee KF, Meijer D, Anderson DJ, Morrison SJ (2004) Neural crest stem cells undergo multilineage differentiation in developing peripheral nerves to generate endoneurial fibroblasts in addition to Schwann cells. *Development* 131:5599-5612.
- Jukkola PI, Lovett-Racke AE, Zamvil SS, Gu C (2012) K⁺ channel alterations in the progression of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Neurobiology of disease* 47:280-293.
- Kaemmer D, Bozkurt A, Otto J, Junge K, Klink C, Weis J, Sellhaus B, O'Dey DM, Pallua N, Jansen M, Schumpelick V, Klinge U (2010) Evaluation of tissue components in the peripheral nervous system using Sirius red staining and immunohistochemistry: a comparative study (human, pig, rat). *Journal of neuroscience methods* 190:112-116.
- Kawamura N, Yamasaki R, Yonekawa T, Matsushita T, Kusunoki S, Nagayama S, Fukuda Y, Ogata H, Matsuse D, Murai H, Kira J (2013) Anti-neurofascin antibody in patients with combined central and peripheral demyelination. *Neurology* 81:714-722.
- Kettenmann H, Banati R, Walz W (1993) Electrophysiological behavior of microglia. *Glia* 7:93-101.
- Klein D, Martini R (2015) Myelin and macrophages in the PNS: An intimate relationship in trauma and disease. *Brain research*.
- Klein D, Groh J, Wettmarshausen J, Martini R (2014) Nonuniform molecular features of myelinating Schwann cells in models for CMT1: distinct

- disease patterns are associated with NCAM and c-Jun upregulation. *Glia* 62:736-750.
- Klein D, Groh J, Weishaupt A, Martini R (2015a) Endogenous antibodies contribute to macrophage-mediated demyelination in a mouse model for CMT1B. *Journal of neuroinflammation* 12:49.
- Klein D, Patzko A, Schreiber D, van Hauwermeiren A, Baier M, Groh J, West BL, Martini R (2015b) Targeting the colony stimulating factor 1 receptor alleviates two forms of Charcot-Marie-Tooth disease in mice. *Brain : a journal of neurology* 138:3193-3205.
- Kleopa KA, Scherer SS (2006a) Molecular genetics of X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *Neuromolecular medicine* 8:107-122.
- Kleopa KA, Scherer SS (2006b) Molecular genetics of X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *Neuromolecular medicine* 8:107-122.
- Kobsar I, Maurer M, Ott T, Martini R (2002) Macrophage-related demyelination in peripheral nerves of mice deficient in the gap junction protein connexin 32. *Neuroscience letters* 320:17-20.
- Kobsar I, Hasenpusch-Theil K, Wessig C, Muller HW, Martini R (2005) Evidence for macrophage-mediated myelin disruption in an animal model for Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 1A. *Journal of neuroscience research* 81:857-864.
- Kobsar I, Oetke C, Kroner A, Wessig C, Crocker P, Martini R (2006) Attenuated demyelination in the absence of the macrophage-restricted adhesion molecule sialoadhesin (Siglec-1) in mice heterozygously deficient in P0. *Molecular and cellular neurosciences* 31:685-691.
- Kobsar I, Berghoff M, Samsam M, Wessig C, Maurer M, Toyka KV, Martini R (2003) Preserved myelin integrity and reduced axonopathy in connexin32-deficient mice lacking the recombination activating gene-1. *Brain : a journal of neurology* 126:804-813.
- Kohl B, Fischer S, Groh J, Wessig C, Martini R (2010a) MCP-1/CCL2 modifies axon properties in a PMP22-overexpressing mouse model for Charcot-Marie-tooth 1A neuropathy. *The American journal of pathology* 176:1390-1399.
- Kohl B, Groh J, Wessig C, Wiendl H, Kroner A, Martini R (2010b) Lack of evidence for a pathogenic role of T-lymphocytes in an animal model for Charcot-Marie-Tooth disease 1A. *Neurobiology of disease* 38:78-84.
- Koticha D, Maurel P, Zanazzi G, Kane-Goldsmith N, Basak S, Babiarz J, Salzer J, Grumet M (2006) Neurofascin interactions play a critical role in clustering sodium channels, ankyrin G and beta IV spectrin at peripheral nodes of Ranvier. *Developmental biology* 293:1-12.
- Kroner A, Greenhalgh AD, Zarruk JG, Passos Dos Santos R, Gaestel M, David S (2014) TNF and increased intracellular iron alter macrophage polarization to a detrimental M1 phenotype in the injured spinal cord. *Neuron* 83:1098-1116.
- Lambert S, Davis JQ, Bennett V (1997) Morphogenesis of the node of Ranvier: co-clusters of ankyrin and ankyrin-binding integral proteins define early developmental intermediates. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 17:7025-7036.

- Li J, Bai Y, Ghandour K, Qin P, Grandis M, Trostinskaia A, Ianakova E, Wu X, Schenone A, Vallat JM, Kupsky WJ, Hatfield J, Shy ME (2005) Skin biopsies in myelin-related neuropathies: bringing molecular pathology to the bedside. *Brain : a journal of neurology* 128:1168-1177.
- Li Y, Du XF, Liu CS, Wen ZL, Du JL (2012) Reciprocal regulation between resting microglial dynamics and neuronal activity in vivo. *Developmental cell* 23:1189-1202.
- Martin S, Levine AK, Chen ZJ, Ughrin Y, Levine JM (2001) Deposition of the NG2 proteoglycan at nodes of Ranvier in the peripheral nervous system. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 21:8119-8128.
- Martini R (1997) Animal models for inherited peripheral neuropathies. *Journal of anatomy* 191 (Pt 3):321-336.
- Martini R, Schachner M (1986) Immunoelectron microscopic localization of neural cell adhesion molecules (L1, N-CAM, and MAG) and their shared carbohydrate epitope and myelin basic protein in developing sciatic nerve. *The Journal of cell biology* 103:2439-2448.
- Martini R, Schachner M (1997) Molecular bases of myelin formation as revealed by investigations on mice deficient in glial cell surface molecules. *Glia* 19:298-310.
- Martini R, Willison H (2016) Neuroinflammation in the peripheral nerve: Cause, modulator, or bystander in peripheral neuropathies? *Glia* 64:475-486.
- Martini R, Fischer S, Lopez-Vales R, David S (2008) Interactions between Schwann cells and macrophages in injury and inherited demyelinating disease. *Glia* 56:1566-1577.
- Martini R, Zielasek J, Toyka KV, Giese KP, Schachner M (1995) Protein zero (P0)-deficient mice show myelin degeneration in peripheral nerves characteristic of inherited human neuropathies. *Nature genetics* 11:281-286.
- Maurer M, Muller M, Kobsar I, Leonhard C, Martini R, Kiefer R (2003) Origin of pathogenic macrophages and endoneurial fibroblast-like cells in an animal model of inherited neuropathy. *Molecular and cellular neurosciences* 23:351-359.
- McCorquodale D, Pucillo EM, Johnson NE (2016) Management of Charcot-Marie-Tooth disease: improving long-term care with a multidisciplinary approach. *Journal of multidisciplinary healthcare* 9:7-19.
- McGonigal R, Rowan EG, Greenshields KN, Halstead SK, Humphreys PD, Rother RP, Furukawa K, Willison HJ (2010) Anti-GD1a antibodies activate complement and calpain to injure distal motor nodes of Ranvier in mice. *Brain : a journal of neurology* 133:1944-1960.
- Mierzwa A, Shroff S, Rosenbluth J (2010) Permeability of the paranodal junction of myelinated nerve fibers. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30:15962-15968.
- Moldovan M, Alvarez S, Pinchenko V, Klein D, Nielsen FC, Wood JN, Martini R, Krarup C (2011) Na(v)1.8 channelopathy in mutant mice deficient for myelin protein zero is detrimental to motor axons. *Brain : a journal of neurology* 134:585-601.

- Monk KR, Feltri ML, Taveggia C (2015) New insights on Schwann cell development. *Glia* 63:1376-1393.
- Mueller M, Wacker K, Ringelstein EB, Hickey WF, Imai Y, Kiefer R (2001) Rapid response of identified resident endoneurial macrophages to nerve injury. *The American journal of pathology* 159:2187-2197.
- Mueller M, Leonhard C, Wacker K, Ringelstein EB, Okabe M, Hickey WF, Kiefer R (2003) Macrophage response to peripheral nerve injury: the quantitative contribution of resident and hematogenous macrophages. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 83:175-185.
- Muller HW et al. (1997) Advances in Charcot-Marie-Tooth disease research: cellular function of CMT-related proteins, transgenic animal models, and pathomechanisms. *The European CMT Consortium. Neurobiology of disease* 4:215-220.
- Muller M, Wacker K, Getts D, Ringelstein EB, Kiefer R (2008) Further evidence for a crucial role of resident endoneurial macrophages in peripheral nerve disorders: lessons from acrylamide-induced neuropathy. *Glia* 56:1005-1016.
- Muller M, Leonhard C, Krauthausen M, Wacker K, Kiefer R (2010) On the longevity of resident endoneurial macrophages in the peripheral nervous system: a study of physiological macrophage turnover in bone marrow chimeric mice. *Journal of the peripheral nervous system : JPNS* 15:357-365.
- Nelles E, Butzler C, Jung D, Temme A, Gabriel HD, Dahl U, Traub O, Stumpel F, Jungermann K, Zielasek J, Toyka KV, Dermietzel R, Willecke K (1996) Defective propagation of signals generated by sympathetic nerve stimulation in the liver of connexin32-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93:9565-9570.
- Newell EW, Schlichter LC (2005) Integration of K⁺ and Cl⁻ currents regulate steady-state and dynamic membrane potentials in cultured rat microglia. *The Journal of physiology* 567:869-890.
- Ng JK et al. (2012) Neurofascin as a target for autoantibodies in peripheral neuropathies. *Neurology* 79:2241-2248.
- Nguyen T, Mehta NR, Conant K, Kim KJ, Jones M, Calabresi PA, Melli G, Hoke A, Schnaar RL, Ming GL, Song H, Keswani SC, Griffin JW (2009) Axonal protective effects of the myelin-associated glycoprotein. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29:630-637.
- Niemann A, Berger P, Suter U (2006) Pathomechanisms of mutant proteins in Charcot-Marie-Tooth disease. *Neuromolecular medicine* 8:217-242.
- Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F (2005) Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* 308:1314-1318.
- Obremski VJ, Johnson MI, Bunge MB (1993) Fibroblasts are required for Schwann cell basal lamina deposition and ensheathment of unmyelinated sympathetic neurites in culture. *Journal of neurocytology* 22:102-117.

- Oldfors A (1980) Macrophages in peripheral nerves. An ultrastructural and enzyme histochemical study on rats. *Acta neuropathologica* 49:43-49.
- Pannell M, Meier MA, Szulzewsky F, Matyash V, Endres M, Kronenberg G, Prinz V, Waiczies S, Wolf SA, Kettenmann H (2016) The subpopulation of microglia expressing functional muscarinic acetylcholine receptors expands in stroke and Alzheimer's disease. *Brain structure & function* 221:1157-1172.
- Parkhurst CN, Yang G, Ninan I, Savas JN, Yates JR, 3rd, Lafaille JJ, Hempstead BL, Littman DR, Gan WB (2013) Microglia promote learning-dependent synapse formation through brain-derived neurotrophic factor. *Cell* 155:1596-1609.
- Patzko A, Shy ME (2011) Update on Charcot-Marie-Tooth disease. *Current neurology and neuroscience reports* 11:78-88.
- Patzko A, Shy ME (2012) Charcot-Marie-Tooth disease and related genetic neuropathies. *Continuum* 18:39-59.
- Poliak S, Peles E (2003) The local differentiation of myelinated axons at nodes of Ranvier. *Nature reviews Neuroscience* 4:968-980.
- Poliak S, Gollan L, Martinez R, Custer A, Einheber S, Salzer JL, Trimmer JS, Shrager P, Peles E (1999) Caspr2, a new member of the neurexin superfamily, is localized at the juxtaparanodes of myelinated axons and associates with K⁺ channels. *Neuron* 24:1037-1047.
- Quarles RH (2007) Myelin-associated glycoprotein (MAG): past, present and beyond. *Journal of neurochemistry* 100:1431-1448.
- Rasband MN, Trimmer JS, Schwarz TL, Levinson SR, Ellisman MH, Schachner M, Shrager P (1998) Potassium channel distribution, clustering, and function in remyelinating rat axons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 18:36-47.
- Reilly MM, Murphy SM, Laura M (2011) Charcot-Marie-Tooth disease. *Journal of the peripheral nervous system : JPNS* 16:1-14.
- Richard L, Vedrenne N, Vallat JM, Funalot B (2014) Characterization of Endoneurial Fibroblast-like Cells from Human and Rat Peripheral Nerves. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 62:424-435.
- Richard L, Topilko P, Magy L, Decouvelaere AV, Charnay P, Funalot B, Vallat JM (2012) Endoneurial fibroblast-like cells. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 71:938-947.
- Rosenberg AF, Wolman MA, Franzini-Armstrong C, Granato M (2012) In vivo nerve-macrophage interactions following peripheral nerve injury. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 32:3898-3909.
- Rosenthal JJ, Bezanilla F (2000) Seasonal variation in conduction velocity of action potentials in squid giant axons. *The Biological bulletin* 199:135-143.
- Rudnik-Schoneborn S, Tolle D, Senderek J, Eggermann K, Elbracht M, Kornak U, von der Hagen M, Kirschner J, Leube B, Muller-Felber W, Schara U, von Au K, Wieczorek D, Bussmann C, Zerres K (2016) Diagnostic algorithms in Charcot-Marie-Tooth neuropathies: experiences from a

- German genetic laboratory on the basis of 1206 index patients. *Clinical genetics* 89:34-43.
- Salzer JL (2015) Schwann cell myelination. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 7:a020529.
- Salzer JL, Brophy PJ, Peles E (2008) Molecular domains of myelinated axons in the peripheral nervous system. *Glia* 56:1532-1540.
- Samsam M, Mi W, Wessig C, Zielasek J, Toyka KV, Coleman MP, Martini R (2003) The Wlds mutation delays robust loss of motor and sensory axons in a genetic model for myelin-related axonopathy. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23:2833-2839.
- Schafer DP, Lehrman EK, Kautzman AG, Koyama R, Mardinly AR, Yamasaki R, Ransohoff RM, Greenberg ME, Barres BA, Stevens B (2012) Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner. *Neuron* 74:691-705.
- Scherer SS, Deschenes SM, Xu YT, Grinspan JB, Fischbeck KH, Paul DL (1995) Connexin32 is a myelin-related protein in the PNS and CNS. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 15:8281-8294.
- Schmid CD, Stienekemeier M, Oehen S, Bootz F, Zielasek J, Gold R, Toyka KV, Schachner M, Martini R (2000) Immune deficiency in mouse models for inherited peripheral neuropathies leads to improved myelin maintenance. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 20:729-735.
- Schubert T, Friede RL (1981) The role of endoneurial fibroblasts in myelin degradation. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 40:134-154.
- Shen ZL, Lassner F, Bader A, Becker M, Walter GF, Berger A (2000) Cellular activity of resident macrophages during Wallerian degeneration. *Microsurgery* 20:255-261.
- Shy ME, Rose MR (2005) Charcot-Marie-Tooth disease impairs quality of life: why? And how do we improve it? *Neurology* 65:790-791.
- Shy ME, Patzko A (2011) Axonal Charcot-Marie-Tooth disease. *Current opinion in neurology* 24:475-483.
- Skre H (1974) Genetic and clinical aspects of Charcot-Marie-Tooth's disease. *Clinical genetics* 6:98-118.
- Sun X, Wang X, Chen T, Li T, Cao K, Lu A, Chen Y, Sun D, Luo J, Fan J, Young W, Ren Y (2010) Myelin activates FAK/Akt/NF-kappaB pathways and provokes CR3-dependent inflammatory response in murine system. *PLoS one* 5:e9380.
- Susuki K, Rasband MN (2008) Molecular mechanisms of node of Ranvier formation. *Current opinion in cell biology* 20:616-623.
- Susuki K, Yuki N, Schafer DP, Hirata K, Zhang G, Funakoshi K, Rasband MN (2012) Dysfunction of nodes of Ranvier: a mechanism for anti-ganglioside antibody-mediated neuropathies. *Experimental neurology* 233:534-542.
- Susuki K, Rasband MN, Tohyama K, Koibuchi K, Okamoto S, Funakoshi K, Hirata K, Baba H, Yuki N (2007) Anti-GM1 antibodies cause

- complement-mediated disruption of sodium channel clusters in peripheral motor nerve fibers. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27:3956-3967.
- Thaxton C, Pillai AM, Pribisko AL, Dupree JL, Bhat MA (2011) Nodes of Ranvier act as barriers to restrict invasion of flanking paranodal domains in myelinated axons. *Neuron* 69:244-257.
- Timmerman V, Strickland AV, Zuchner S (2014) Genetics of Charcot-Marie-Tooth (CMT) Disease within the Frame of the Human Genome Project Success. *Genes* 5:13-32.
- Trapp BD, Quarles RH (1982) Presence of the myelin-associated glycoprotein correlates with alterations in the periodicity of peripheral myelin. *The Journal of cell biology* 92:877-882.
- Ubogu EE (2013) The molecular and biophysical characterization of the human blood-nerve barrier: current concepts. *Journal of vascular research* 50:289-303.
- Ueno M, Fujita Y, Tanaka T, Nakamura Y, Kikuta J, Ishii M, Yamashita T (2013) Layer V cortical neurons require microglial support for survival during postnatal development. *Nature neuroscience* 16:543-551.
- Ulzheimer JC, Peles E, Levinson SR, Martini R (2004) Altered expression of ion channel isoforms at the node of Ranvier in P0-deficient myelin mutants. *Molecular and cellular neurosciences* 25:83-94.
- Vasudeva K, Andersen K, Zeyzus-Johns B, Hitchens TK, Patel SK, Balducci A, Janjic JM, Pollock JA (2014) Imaging neuroinflammation in vivo in a neuropathic pain rat model with near-infrared fluorescence and (1)(9)F magnetic resonance. *PloS one* 9:e90589.
- Wang Ip C, Kroner A, Fischer S, Berghoff M, Kobsar I, Maurer M, Martini R (2006) Role of immune cells in animal models for inherited peripheral neuropathies. *Neuromolecular medicine* 8:175-190.
- Wang X, Zhao L, Zhang J, Fariss RN, Ma W, Kretschmer F, Wang M, Qian HH, Badea TC, Diamond JS, Gan WB, Roger JE, Wong WT (2016) Requirement for Microglia for the Maintenance of Synaptic Function and Integrity in the Mature Retina. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 36:2827-2842.
- Warner LE, Hilz MJ, Appel SH, Killian JM, Kolodry EH, Karpati G, Carpenter S, Watters GV, Wheeler C, Witt D, Bodell A, Nelis E, Van Broeckhoven C, Lupski JR (1996) Clinical phenotypes of different MPZ (P0) mutations may include Charcot-Marie-Tooth type 1B, Dejerine-Sottas, and congenital hypomyelination. *Neuron* 17:451-460.
- Willison HJ, Goodyear CS (2013) Glycolipid antigens and autoantibodies in autoimmune neuropathies. *Trends in immunology* 34:453-459.
- Wogram E, Wendt S, Matyash M, Pivneva T, Draguhn A, Kettenmann H (2016) Satellite microglia show spontaneous electrical activity that is uncorrelated with activity of the attached neuron. *The European journal of neuroscience* 43:1523-1534.
- Ydens E, Cauwels A, Asselbergh B, Goethals S, Peeraer L, Lornet G, Almeida-Souza L, Van Ginderachter JA, Timmerman V, Janssens S (2012) Acute injury in the peripheral nervous system triggers an alternative macrophage response. *Journal of neuroinflammation* 9:176.

- Yin X, Crawford TO, Griffin JW, Tu P, Lee VM, Li C, Roder J, Trapp BD (1998) Myelin-associated glycoprotein is a myelin signal that modulates the caliber of myelinated axons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 18:1953-1962.
- Yoshida H, Hayashi S, Kunisada T, Ogawa M, Nishikawa S, Okamura H, Sudo T, Shultz LD, Nishikawa S (1990) The murine mutation osteopetrosis is in the coding region of the macrophage colony stimulating factor gene. *Nature* 345:442-444.
- Zhan Y, Paolicelli RC, Sforzini F, Weinhard L, Bolasco G, Pagani F, Vyssotski AL, Bifone A, Gozzi A, Ragozzino D, Gross CT (2014) Deficient neuron-microglia signaling results in impaired functional brain connectivity and social behavior. *Nature neuroscience* 17:400-406.
- Zhang Y, Bekku Y, Dzhashiashvili Y, Armenti S, Meng X, Sasaki Y, Milbrandt J, Salzer JL (2012) Assembly and maintenance of nodes of ranvier rely on distinct sources of proteins and targeting mechanisms. *Neuron* 73:92-107.
- Zhou L, Zhang CL, Messing A, Chiu SY (1998) Temperature-sensitive neuromuscular transmission in Kv1.1 null mice: role of potassium channels under the myelin sheath in young nerves. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 18:7200-7215.
- Zoupi L, Markoullis K, Kleopa KA, Karagogeos D (2013) Alterations of juxtaparanodal domains in two rodent models of CNS demyelination. *Glia* 61:1236-1249.

7 Anhang

7.1 Technische Geräte

BioPhotometer 6131	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Deckgläschen	Applied Biosystems (Darmstadt, Deutschland)
Gefrierschrank	Liebherr (Biberach, Deutschland)
Geldokumentation	Intas (Goettingen, Deutschland)
Gelkammern	
Horizontal Mini Gel System	Peqlab (Erlangen, Deutschland)
Mini-PROTEAN3® cell	Bio-Rad (Munich, Deutschland)
Mini-Trans-Blot® cell	Bio-Rad (Munich, Deutschland)
Heizplatte	Medax (Neumuenster, Deutschland)
Homogenisator MICCRA D-8	ART (Muehlheim, Deutschland)
Homogenisator Sonoplus HD60	Bandelin Electronic (Berlin, Deutschland)
Hyperfilm ECL	GE Healthcare (Buckinghamshire, GB)
Kryostat CM 3050S	Leica (Wetzlar, Deutschland)
MicroAmp® Fast 96-WellPlatte	Applied Biosystems (Darmstadt, Deutschland)
Mikroskope	
Axiophot 2	Zeiss (Oberkochen, Deutschland)
FluoView FV1000	Olympus (Hamburg, Deutschland)

Objekträger Superfrost	Langenbrinck (Teningen, Deutschland)
PapPen	SCI (Munich, Deutschland)
PCR- Reaktionsgefäße	Hartenstein (Wuerzburg, Deutschland)
Pipetten	Abimed (Berlin, Deutschland)
	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
	Gilson (Bad Camberg, Deutschland)
Pipettenspitzen	Sarstedt (Nuernbrecht, Deutschland)
ProScan Slow Scan CCD camera	Pro Scan (Lagerlechfeld, Deutschland)
PROTRAN® Nitrozellulosetransfermembran	Hartenstein (Wuerzburg, Deutschland)
Schneidegerät Ultracut	Leica (Wetzlar, Deutschland)
Software	
Adobe Photoshop CS3	Adobe (San Jose, USA)
FluoView	Olympus (Hamburg, Deutschland)
iTEM	Olympus (Hamburg, Deutschland)
ImageJ	NIH (Bethesda, USA)
Office 2010	Microsoft (Redmond, USA)
PASW Statistics 18 SPSS	IBM (Ehningen, Deutschland)
Stromquelle (Gelkammer)	Bio-RAD (Munich, Deutschland)

Thermocycler

Step One Plus RT-PCR System	Applied Biosystems (Darmstadt, Deutschland)
Mastercycler gradient	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Primus96 advanced	Peqlab (Erlangen, Deutschland)
Trockenblockthermostat TDB-120	Hartenstein (Wuerzburg, Deutschland)
Trockenblockthermostat TDB-100	Hartenstein (Wuerzburg, Deutschland)

Zentrifugen

Biofuge 15R	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Biofuge Pico	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Zentrifuge 5424	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)

7.2 Puffer und Lösungen

DABCO	25 % PBS 75 % Glycerol 25 mg/ml 1,4Diazabicyclo[2.2.2]octan Lichtgeschützt bei 4°C aufbewahren
DEPC-H ₂ O	0,01 % Diethylpyrocarbonat (DEPC) in destilliertem Wasser lösen, auto- klavieren

Methylenblau	1 % Methylenblau
	1 % Azure II
	40 % Saccharose
	pH 9.2
PBS (1x)	137 mM NaCl
	2,7 mM KCl
	1,5 mM KH ₂ PO ₄
	8,1 mM Na ₂ HPO ₄
	pH 7.4
Spurr's Medium	10 g Vinyl/ERL
	6 g DER 736
	26 g NSA 26g
	0,4 g DMAE
TBE	89mM Tris
	89mM Borate
	2mM EDTA
	pH 8.0

Falls nicht anders erwähnt wurde destilliertes Wasser als Lösungsmittel verwendet und die beschriebenen Lösungen bei RT aufbewahrt.

7.3 Antikörper

Für die immunhistochemischen Färbungen wurden folgende Primär- und Sekundärantikörper verwendet.

Primärantikörper	Firma	Klon	Verdünnung	Fixierung / Block
Maus anti-Ratte Caspr	NIH Neuro Mab	75-001	1:1000	Aceton / 0,3 % TritonX
Kaninchen anti- Ratte Caspr2	Millipore	AB5886 - 500L	1:500	Aceton / 0,3 % TritonX
Ratte anti-Maus F4/80	Serotec	MCA49 7	1:300	Aceton
Kaninchen anti- Maus Nav1.6	Millipore	AB5580 -50UL	1:1000	Aceton / 0,3 % TritonX

Sekundärantikörper	Firma	Klon	Verdünnung
Ziege anti-Maus Alexa Fluor 488	Invitrogen	A11006	1:300
Ziege anti-Kaninchen Cy3	Dianova	111-165-144	1:300
Ziege anti-Ratte Cy3	Serotec	112-165-167	1:300
Ziege anti-Ratte IgG Biot	Serotec	303008	1:100

7.4 PCR-Bedingungen und Primersequenzen

Mit Hilfe einer konventionellen Polymerasekettenreaktion (PCR) konnte die zuvor isolierte DNA der Modelltiere genotypisiert werden. Hierbei wurde ein Gesamtvolumen von 50 µl pro PCR-Ansatz verwendet, wobei eine Annealingtemperatur von 55°C und eine Elongationstemperatur von 72°C gewählt wurden. Die PCR-Produkte wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und mittels eines Cyanin-Farbstoffes (Sybr Green) optisch dargestellt.

Primersequenzen:

P0het

S 1295 5'-TCAGTTCCTTGTCCCCCGCTCTC-3'

AS 1606 5'-GGCTGCAGGGTCGCTCGGTGTTC-3'

AS 1772 5'-ACTTGTCTCTTCTGGGTAATCAA-3'

Cx32def

S 5'-CCA TAA GTC AGG TGT AAA GGA GC -3'

AS 5'-AGA TAA GCT GCA GGG ACC ATA GG -3'

NEO 5'-ATC ATG CGA AAC GAT CCT CAT CC -3'

PMP22tg

MBA1 5'-AACCGTGAAAAGATGACCC-3'

MBA2 5'-TCG TTG CCA ATA GTG ATG ACC-3'

2F 5'-TCA GGA TAT CTA TCT GAT TCTC-3'

2R 5'-AAG CTCA TGG AGC ACA AAA CC-3'

8 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AF	Alexa fluor
AIS	Axon initial segment
AMAN	Akute Motorische Axonale Neuropathie
BNB	Blood-nerve barrier
BSA	Bovines Serumalbumin
°C	Grad Celsius
CAM	Cell adhesion molecule
Caspr /Caspr2	Contactin associated protein / 2
CCL	Chemokin (C-C Motif) Ligand
CHN	Congenital hypomyelinating neuropathy
CIDP	Chronisch Inflammatorische Demyelinisierenden Polyradikuloneuropathie
CMT	Charcot-Marie-Tooth
CSF-1	Colony stimulating factor 1
CSF-1R	CSF-1 Rezeptor
Cx32/Gjb1	Connexin 32 / Gap junction protein beta 1
Cy	Cyanine

DAB	Diaminobenzidin
DABCO	1,4Diazobicyclo[222]octan
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMAE	Dimethylethanolamin
DNA	Deoxyribonucleic acid
DSS	Dejerine-Sottas Syndrom
DTT	1,4-Dithiothreitol
EAE	Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis
EZM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Fab	Fragment antigen binding
Fc-R	Fc-Rezeptor
FKS	Fetales Kälberserum
GA	Glutaraldehyd
GBS	Guillain-Barré Syndrom
het	Heterozygot
HMSN	Hereditäre Motorische und Sensible Neuropathie
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
JHD -/-	J _H -Region defizient

MAG	Myelin-associated glycoprotein
MBP	Myelin basic protein
MCP-1/CCL2	Monocyte chemoattractant protein
MCSF	Macrophage colony stimulating factor
MFN-2	Mitofusin 2
min	Minute
MS	Multiple Sklerose
MTMR-2	Myotubularin-related protein 2
MPZ/P0	Myelin protein zero
NF155	Neurofascin 155
NGS	Normal goat serum
NLG	Nervenleitgeschwindigkeit
NrCAM	Neuronal cell adhesion molecule
PBS / PBST	Phosphate buffered saline / PBS
Tween	
PCR	Polymerase chain reaction
PFA	Paraformaldehyde
PMP22	Peripheral myelin protein-22
PNS	Peripheres Nervensystem
PRX	Periaxin
rER	raues Endoplasmatisches Retikulum
RNA	Ribonucleic acid

RS	Ranvier'scher Schnürring
RT	Raumtemperatur
SC	Schwann cell
SCP	Schwann cell precursor
SD	Standard deviation
spCSF-1	secreted proteoglycan CSF-1
TBE	Tris-borate-EDTA
TEMED	Tetramethylethylenediamine
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
Wt	Wildtyp

10 Danksagung

Mein Dank gilt zunächst Herrn Prof. Dr. rer. nat. Rudolf Martini für die Überlassung des Promotionsthemas, sowie die stetige wissenschaftliche Unterstützung und die konstruktiven Ratschläge, welche maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beitrugen.

Zudem möchte ich mich bei meinem Korreferenten PD Dr. rer. nat. Robert Blum für die bereitwillige Übernahme des Zweitgutachtens bedanken.

Ganz besonderer Dank gilt meinen naturwissenschaftlichen Betreuern Herr Dr. rer. nat. Janos Groh sowie Herr Dr. rer. nat. Dennis Klein für ihre Geduld bei der methodischen Einarbeitung, ihre vielfachen Hilfestellungen im Laboralltag, sowie für zahlreiche aufschlussreiche wissenschaftliche Diskussionen.

Bei Heinrich Blazyca, Silke Loserth und Bettina Meyer bedanke ich mich für die exzellente technische Unterstützung und Hilfestellungen beim Durchführen meiner experimentellen Laborarbeiten.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie, insbesondere Annemarie Elsterer, meinen Eltern Manuela und Hans-Joachim, sowie meiner Großmutter Margarete für die stetige Unterstützung und den permanenten Rückhalt bedanken.