

Aus der Neurologischen Klinik und Poliklinik

der Universität Würzburg

Direktor: Prof. Dr. med. K.V. Toyka

**Die Rolle von Immunzellen**  
**bei der primär genetisch-vermittelten Demyelinisierung**  
**in einem Mausmodell für die Charcot-Marie-Tooth Neuropathie,**  
**Typ 1X**

**Inaugural-Dissertation**

zur Erlangung der Doktorwürde

der Medizinischen Fakultät

der

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von

Igor V. Kobsar

aus Kiew, Ukraine

Würzburg, September 2005

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

Korreferent: Prof. Dr. med. E. Asan

Dekan: Prof. Dr. med. G. Ertl

Tag der mündlichen Prüfung: 23.02.2006

Der Promovend ist Arzt.

# Inhaltsverzeichnis

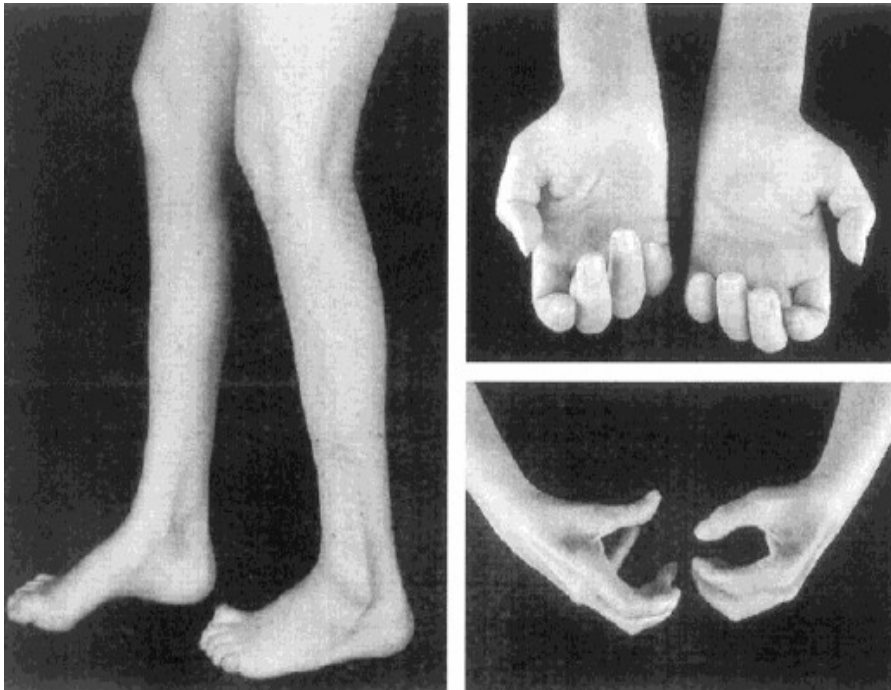
<b>1.</b>	<b>Einführung</b>	1
1.1.	Klinisch-genetische Klassifikation von CMT	1
1.2.	Tiermodelle in der Pathogeneseforschung von CMT	6
1.2.1.	P0-heterozygote Mäuse als Modell von CMT1B	6
1.2.2.	Cx32-defiziente Mäuse als Modell von CMT1X	9
1.3.	Faktoren, die den Schweregrad der CMT Neuropathie bedingen und modulieren	13
1.3.1.	„Toxic gain of functions“ verursachen meist schwere neuropathische Veränderungen	13
1.3.2.	Myelinmutationsbedingte Immunreaktionen als Modulator des genetischen Defekts	14
1.4.	Zielsetzung der Arbeit	18
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b>	19
2.1.	Mausmodelle	19
2.2.	Genotypisierung	19
2.3.	Gewebepräparation und Fixierungsmethoden	20
2.4.	Immunhistochemie	21
2.5.	Immunelektronenmikroskopie	21
2.6.	Quantitative Morphologie	22
2.7.	Statistische Methoden	23
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	24
3.1.	Pathomorphologisches Bild von peripheren Nerven in Cx32-defizienten Mäusen	24
3.2.	Hochregulation von Immunzellen im Quadricepsnerv von Cx32-defizienten Mäusen	30
3.3.	Immunelektronenmikroskopie von Makrophagen in Quadricepsnerven und ventralen Spinalwurzeln von Cx32 <sup>def</sup> Mäusen	32
3.4.	Immunzellen in peripheren Nerven von Cx32 <sup>def</sup> /RAG-1 <sup>-/-</sup> Doppelmutanten	34

3.5.	Die Abwesenheit des RAG-1 Gens führt zu milderer pathologischen Veränderungen im Quadricepsnerv und in den ventralen Spinalwurzeln von Cx32-defizienten Mäusen	36
<b>4.</b>	<b>Diskussion der Ergebnisse</b>	41
4.1.	Sekundäre Immunreaktion bei genetisch vermittelter Demyelinisierung in Mausmodellen von CMT1	41
4.2.	Potentielle Rolle der T-Lymphozyten als Immunmodulatoren	43
4.3.	CD34+ Fibroblasten/Fibrozyten als mögliche zusätzliche Immunmodulatoren	44
4.4.	Bedeutung unserer Untersuchung im Hinblick auf die Pathogenese und therapeutischen Optionen bei CMT1 in Menschen	46
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	50
<b>6.</b>	<b>Glossar</b>	51
<b>7.</b>	<b>Literatur</b>	54
	<b>Danksagung</b>	
	<b>Lebenslauf</b>	

# 1. Einführung

## 1.1 Klinisch-genetische Klassifikation von CMT

Die Charcot-Marie-Tooth Neuropathien (CMT) umfassen häufige, vererbare Erkrankungen des peripheren Nervensystems mit einer Prävalenz von 1:2500 (Skre, 1974). Klassische klinische Kennzeichen der CMT- Neuropathien sind eine zwischen dem zehnten und zwanzigsten Lebensjahr beginnende distale Muskelschwäche und Atrophie zunächst der Beine. Weiterhin werden Fußdeformität (Pes cavus), herabgesetzte oder fehlende Muskeigenreflexe, geringe bis mäßig ausgeprägte Störungen der Oberflächen- und Tiefensensibilität sowie später auch distale Muskelatrophien und Schwäche der oberen Extremitäten beschrieben (Abbildung 1). Sensorische Symptome wie Parästhesie oder Schmerzen sind generell nicht typisch für das CMT Syndrom, obwohl eine aktuelle Studie (Gemignane et al., 2004) über Patienten mit sensorischer Symptomatik berichtet.



**Abbildung 1.** *Beine, Füße und Hände eines Patienten mit CMT. Pes Cavus, krallenartige Finger, Muskelatrophien der unteren und oberen Extremitäten (Kuhlenbäumer et al., 2002).*

Nach Erstbeschreibungen im Jahre 1886 durch Charcot und Marie in Frankreich und Tooth in England wurde bald deutlich, daß CMT ein klinisch und genetisch heterogenes Syndrom ist. Später wurden ähnliche hereditäre Neuropathien, wie das besonders schwere Dejerine-Sottas Syndrom (1893) sowie Roussy-Levy Syndrom (1926), mit zusätzlichem Tremor und Ataxie charakterisiert. Heute wird das Roussy-Levy Syndrom als eine Variante von CMT (CMT1A oder CMT1B) angesehen (Shy et al., 2002).

Mitte des zwanzigsten Jahrhunderts haben elektrophysiologische Methoden (Neurographie) und Biopsien, besonders des Suralisnerven, zusätzlich zur Klinik und Charakterisierung des Erbganges, zur weiteren Differenzierung von CMT geführt. Der Typ CMT1 umfaßt Patienten, die elektrophysiologisch stark verzögerte distale Latenzen und eine deutlich verlangsamte Nervenleitgeschwindigkeit (NLG) aufweisen (Dyck und Lambert, 1968). Unter CMT2 werden Patienten geführt, bei denen diese Parameter entweder normal oder geringfügig verändert sind, die jedoch eine Verminderung der Amplituden der Muskelsummenpotentiale und Muskelmotoreinheiten aufweisen (Bromberg et al., 2003; Lawson et al., 2003). Die derzeit festgelegte Grenze der Nervenleitgeschwindigkeit von CMT1 und CMT2 liegt bei 38 m/s NLG (Harding und Thomas, 1980; Wrabetz et al., 2003a; Kraup, 2003). Morphologisch fanden sich bei der ersten Gruppe (CMT1) vorwiegend Zeichen von Myelinschäden (De- und Remyelinisierung, Zwiebelschalenformationen) während die zweite Gruppe (CMT2) durch axonale Schädigung charakterisiert ist (Dyck, 1966). Die CMT1 ist heute in 60-70% Patienten mit CMT vertreten (Zhou und Griffib, 2003; Wrabetz et al., 2003a).

Demyelinisierung und axonale Pathologie sind eng miteinander verbunden, da die Myelinscheide sehr wichtig für die Erhaltung der Struktur und Funktion des Axons ist (Martini, 2001). Deswegen treten im histopathologischen Erscheinungsbild von CMT Leitstrukturen der Demyelinisierung und der axonalen Schädigung fast immer gemeinsam auf.

Die Vielfalt der klinisch-morphologischen und elektrophysiologischen Daten sowie der Typen des Vererbungsmodus verlangte eine ausführlichere Klassifikation von CMT und anderer hereditärer Neuropathien. Im Jahr 1993 schlug Dyck eine vorwiegend klinische Unterteilung der hereditären motorisch-sensiblen Neuropathien (HMSN) in sieben verschiedene Subtypen vor. HMSN I und HMSN II sind heute in der Literatur

Synonyme für die Charcot-Marie-Tooth Krankheit Typ 1 und 2 (CMT1 und CMT2). In der vorliegenden Arbeit wird vorwiegend der Begriff „CMT“ verwendet. In der Literatur wird HMSNIII (oder CMT3) als eine äquivalente Bezeichnung für das Dejerine-Sottas Syndrom verwendet (Zhou und Griffin, 2003; Wrabetz et al., 2003a). Diese schwere Neuropathie ist durch früheren Beginn (vor dem Erreichen des zweiten Lebensjahres) charakterisiert, sowie durch generalisierte Muskelschwäche und sehr langsame Nervenleitgeschwindigkeit (üblicherweise  $< 10$  ms/m). Im peripheren Nerven findet man ausgeprägten Verlust von myelinisierten Axonen, mehr Zwiebelschalenformationen als bei CMT1 und CMT2 und Hypomyelinisierung. Die Klassifikationseinheiten HMSN IV-VII (Polyneuropathien mit zusätzlichen Symptomen) nach Dick (1993) sind HMSN V mit spastischer Paraparese, HMSN VI mit optischer Atrophie und HMSN VII mit Retinitis pigmentosa. Dies sind eher seltene Subformen der CMT (Auer-Grumbach et al., 1999; Kuhlenbäumer et al., 2002). HMSN IV wird auch als Refsum Krankheit bezeichnet. Diese Erkrankung tritt bei einer Speicherstörung von Phytansäure auf und ist durch Polyneuropathie, zerebelläre Ataxie und Retinitis pigmentosa charakterisiert. Heute betrachtet man die Refsum Krankheit als eine angeborene Neuropathie außerhalb der Gruppe der CMT Neuropathien (Reilly und Hanna, 2002). Zusätzlich klassifizieren Zhou, Griffin (2003) und Wrabetz et al. (2003a) als CMT4 autosomal rezessive Fälle von CMT mit schweren sensomotorischen Defiziten in Kombination mit anderen Symptomen wie Fuß- Deformationen (CMT4A und CMT4C), Schwäche der Gesichtsmuskulatur (CMT4B) oder Hörverlust (CMT4B und CMT4D). NLGs dieser Patienten weisen unterschiedliche Ergebnisse auf. Das morphologische Bild der peripheren Nerven beinhaltet üblicherweise ausgeprägte Demyelinisierung, axonalen Verlust und häufig Anzeichen der Hypermyelinisierung. Reilly und Hanna (2002) betrachten CMT3 und CMT4 dennoch als Subtypen von CMT1.

Ebenso sind andere angeborene Erkrankungen der peripheren Nerven bekannt, die nicht unter die Klassifikation der CMT fallen, so z.B. vorwiegend sensible (HSN), sensible/ autonome (HSAN) und motorische (HMN) Neuropathien (Dyck, 1993; Harding, 1993; Windebank, 1993; Stögbauer et al., 1998; Reilly und Hanna, 2002).

Durch Fortschritte im Bereich der Neurogenetik konnten im Laufe der letzten Jahre die für die Erkrankung relevanten Gene identifiziert werden. Am Anfang der 90-er Jahre des letzten Jahrhunderts wurden die Mutationen charakterisiert, die den häufigsten Subtypen von CMT1 (Tabelle 1) unterliegen, wie PMP-22 Duplikation in Patienten mit

CMT-1A (Timmermann et al., 1990; Lupski et al., 1992), Mutationen im P0 Gen bei CMT-1B (Hayasaka et al., 1993) und im Cx32 Gen bei CMT-1X (Bergoffen et al., 1993).

**Tabelle 1.** Die Prävalenz der häufigsten klinischen Typen von CMT in allen CMT-Fällen (nach Zhou und Griffin, 2003; Wrabetz et al., 2003a).

CMT1 Subtyp	Prävalenz unter allen CMT1-Fällen
CMT1A	75-85%
CMT1B	<10%
CMT1X	7-10%

Später wurden zwölf weitere Gene, deren Mutationen seltenere Varianten von CMT verursachen können, identifiziert (Tabelle 2). Für die ganze Gruppe der hereditären peripheren Neuropathien sind insgesamt 24 Gene beschrieben. Weiterhin sind heute mindestens 30 chromosomale Kandidaten- Loci bekannt (die neuesten Erkenntnisse hierzu finden sich unter <http://www.molgen.ua.ac.be/CMTMutations>). Weiterhin wird über CMT Patienten mit bisher unbekanntem Mutationen berichtet (Lus et al., 2003).

Die neu entdeckten Mutationen und Gene verlangten eine weitere Überarbeitung der CMT Klassifikation. In der aktuellen Klassifikation wurde die Unterteilung von CMT in die Haupttypen CMT1 und CMT2 beibehalten (Reilly und Hanna, 2002; Young und Suter, 2003; Zhou und Griffin, 2003; Wrabetz et al., 2003a). Jeder Haupttyp, bei dem Demyelinisierung (CMT1) oder axonale Beschädigung (CMT2) dominieren, enthält je nach betroffenem Gen zahlreiche Subvarianten.



**Tabelle 2.** Bekannte Gene, deren Mutationen zu unterschiedliche Varianten der CMT führen, und zelluläre Lokalisation der relevanten Genprodukte (Reilly, 2002; Young und Suter, 2003; Zhou und Griffin, 2003; Wrabetz et al., 2003a; Evgrafov et al., 2004)

Gen	Chromosom	Phänotyp	Zelluläre Lokalisation
PMP-22 (peripheral myelin protein);	17	CMT1A, DSS, HNPP	Kompaktes Myelin
Protein P0, P0, MPZ	1	CMT1B, DSS, CH, CMT2	Kompaktes Myelin
Cx32 (Connexin 32) or GJB1 (gap junction protein B1)	X	CMT1X	Nicht kompaktes Myelin, gap junctions
L-periaxin	19	CMT1F, DSS	Ab/Ad-axonale Membran
EGR2 (early growth response)/murines Krox20 (Krüppel-associated box-containing (zink finger) gen)	10	CMT1X, HNPP, DSS, CH	Schwann'sche Zellen, Nukleus
MTMR-2 (myotubularin related protein) und MTMR-13 (myotubularin related protein)	11	CMT4B1, CMT4B2	Zytoplasma von Schwann'schen Zellen und Neuronen
LITAF (liposaccharide-induced TNF-alfa factor)	16	CMT1C	Neuronales lysosomales Protein, auch in Lymphozyten
RAB7 (Rab Familie von RAS-GTPasen)	3	CMT2B	Vesikulärer Transport
NEFL (neurofilament-light chain)	8	CMT2E	Neurofilamente
KIF1b (kinesin isoform 1B (alpha and beta))	1	CMT2A	Microtubuli-aktivierende ATP-ase, „Motor“ des Microtubulären Transportes, bei dem Mikrotubuli als „Schienen“ dienen
HSPB1/HSP27 (27-kDa small heat-shock protein B1)	7	CMT2	Zytoplasma
GDAP1 (ganglioside induced differentiation associated protein)	8	CMT4A	Unbekannt
LMNA (Lamin A/C)	1	CMT2A	4 Isoformen, Zellkernhülle
NDRG1 (N-myc downstream regulated gene)	8	CMT4D	adherent junctions in myelinisierenden Schw. Zellen

*HNPP, hereditary neuropathy with a liability to develop pressure palsies; DSS, Déjérine-Sottas Syndrom; CH, kongenitale Hypomyelinisierung*

## 1.2. Tiermodelle in der Pathogeneseforschung von CMT

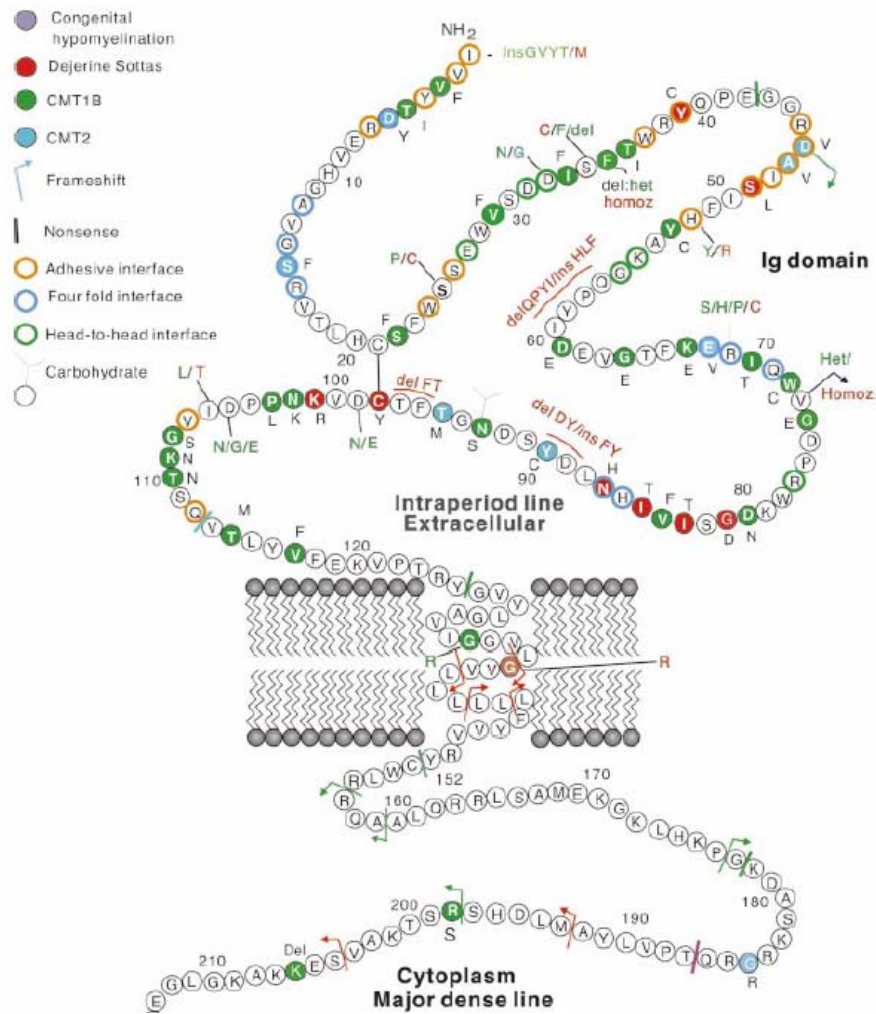
Obwohl inzwischen zahlreiche Gene und Mutationen für erbliche Neuropathien identifiziert wurden, sind die Mechanismen der Pathogenese hereditärer Neuropathien noch nicht bekannt. Mausmodelle von CMT sind bei dieser Fragestellung von großem Wert für die Aufklärung der Pathomechanismen und Erarbeitung möglicher Behandlungsstrategien dieser bisher unheilbaren Krankheitsformen. Derzeit existieren Knockout- Mausmodelle für Mutationen in acht bekannten CMT Genen, darunter peripheres Myelinprotein-22 (PMP-22), Myelin Protein Zero (P0), Connexin-32 (Cx32), Periaxin, early growth response 2 (EGR2/Krox20), Lamin A/C (LMNA), Kinesin Isoform 1B (KIF1b) und neurofilament-light chain (NEFL). Weiterhin wurden transgene Mäuse hergestellt, die eine unterschiedliche Anzahl von zusätzlichen Kopien des PMP-22 und P0 Gens exprimieren oder verschiedene Punktmutationen von PMP-22, P0 und Cx32 Genen aufweisen. Bei diesen sind, ähnlich der humanen CMT, unterschiedliche pathomorphologische Phänotypen von peripheren Nerven wie vorwiegende Demyelinisierung, axonaler Verlust u. a. nachweisbar (Wrabetz et al., 2003b).

Wir haben uns auf die Pathomechanismen des demyelinisierenden Haupttyps von CMT (CMT1), der mehr als 80% aller CMT Fälle bildet, konzentriert. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Pathogenese von CMT1B und CMT1X.

### 1.2.1. P0-heterozygote Mäuse als Modell von CMT1B

CMT1B ist die erste CMT Variante, bei der die chromosomale Lokalisation der Mutation festgestellt werden konnte (Bird et al., 1982). Derzeit sind mehr als 100 Punktmutationen des P0 Gens bekannt. In Abbildung 2 sind diese Mutationen am Proteinmodell dargestellt und entsprechend der Prävalenz ihrer klinischen Manifestation aufgeschlüsselt: CMT1B (50-60%) > Dejerine-Sottas Syndrom und kongenitale Hypomyelinisierung (20-25%) > CMT2 (10-15%) > polymorphe klinische Subtypen (<10%) ([http://molgen-www.uia.ac.be/CMT Mutation](http://molgen-www.uia.ac.be/CMT%20Mutation)).

Das Glykoprotein P0 besteht aus 148 Aminosäurenresten (vor Einbau in die Myelinschicht verliert das Protein die Signalsequenz von 29 Aminosäuren) und wird in extrazelluläre, intrazelluläre und Transmembrandomänen unterteilt (Abbildung 2).



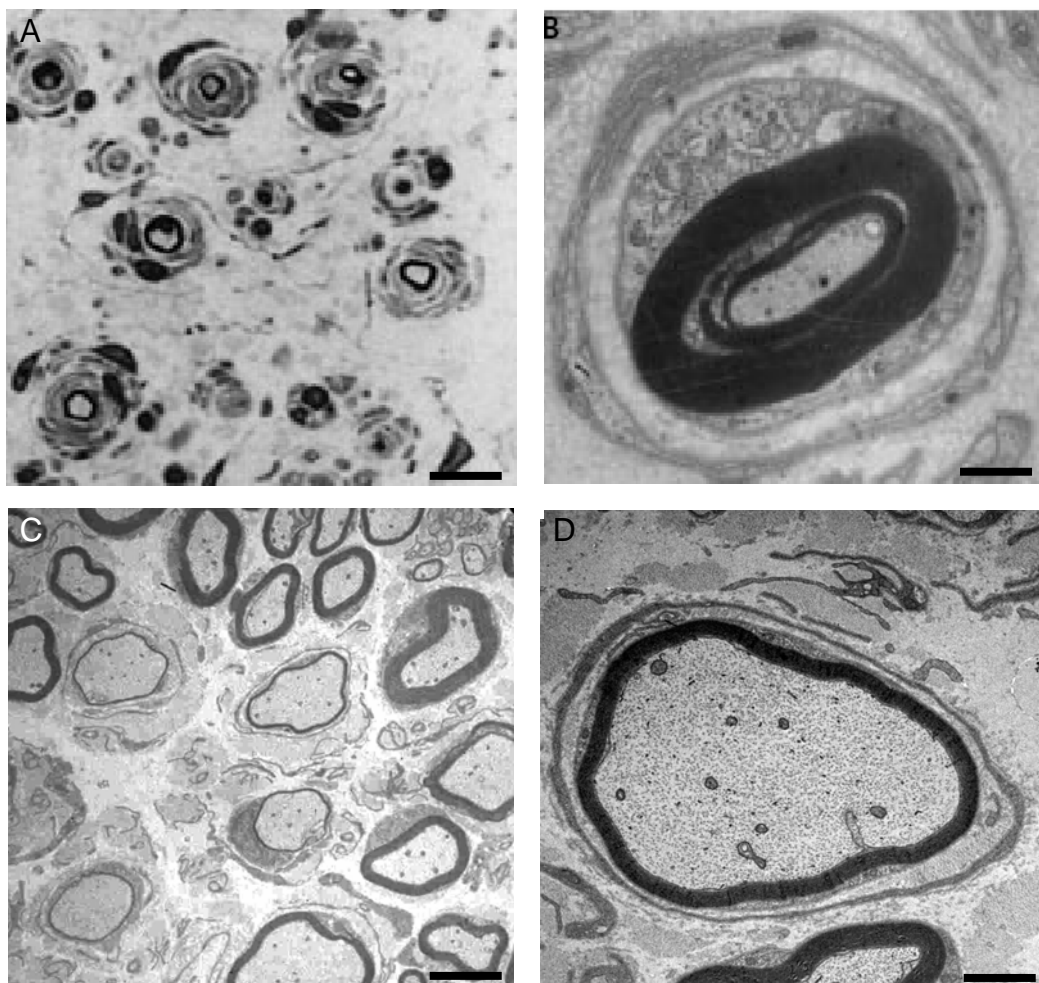
**Abbildung 2.** Die zu CMT und CMT-artigen Neuropathien führenden Mutationen des P0 Gens (Shy et al., 2004)

P0 gehört zur Immunglobulinsuperfamilie. Das ca. 30 kDa schwere P0 Molekül interagiert als homophiles Zelladhäsionsmolekül mit sich selbst und mit PMP22 (D'Urso et al., 1999). P0 ist wichtig für die Kompaktierung der Myelinlamelle (Schneider-Schaulies et al., 1990; Martini, 1994; Martini et al., 1995b). Ein Tetramer der extrazellulären P0 Domänen nimmt an der Formation der „intraperiod myelin line“ teil, die intrazelluläre P0 Domäne ist an der Formation der „major dense line“ beteiligt (Shapiro et al., 1996; Inoue et al., 1999). Gleichzeitig spielt P0 eine wesentliche Rolle bei der Mylinerhaltung (Martini and Schachner, 1997) und bei Signaltransduktionvorgängen (Xu et al., 2001).

P0 defiziente Mäuse wurden ursprünglich hergestellt um die Funktion dieses Myelinproteins in vivo zu charakterisieren (Giese et al., 1992). Homozygote P0 knock-

out ( $P0^{-/-}$ ) Mäuse zeigen ein schweres klinisch-morphologisches Bild mit früherem Beginn der Neuropathie, das auch beim DSS gefunden wird, wohingegen heterozygote  $P0$ -defiziente ( $P0^{+/-}$ ) Mäuse eine wesentlich mildere Neuropathie entwickeln, die mit manchen CMT1B Formen zu vergleichen ist (Giese et al., 1992; Martini et al., 1995a; Martini, 1999).

Die typischen histopathologischen Anzeichen der peripheren Neuropathie in  $P0$ -heterozygoten ( $P0^{+/-}$ ) Mäusen sind De- und Remyelinisierung sowie Zwiebelschalenformationen in peripheren Nerven (Abbildung 3). Diese Merkmale nehmen mit zunehmendem Alter zu (Martini et al., 1995a; Martini, 1997).



**Abbildung 3.** *Demyelinisierte, dünn/remyelinisierte Nervenfasern, Zwiebelschalen-formation in peripheren Nerven von Patienten mit CMT1B (n. Suralis, A von Hattori et al., 2003; B von Lagueny et al., 2001) und von  $P0^{+/-}$  Mäusen (n. Quadriceps, C, D). Überzählige Schwann'sche Zellen als Zwiebelschalenformation (B,D). Balken A 30  $\mu\text{m}$ , B 1,5  $\mu\text{m}$ , C 5  $\mu\text{m}$ , D 2  $\mu\text{m}$ ,*

Die P0<sup>+/-</sup> Mäuse zeigen bis zum Alter von 2-3 Monaten eine normale Myelinbildung und entwickeln später neuropathische Veränderungen. Im Alter von 5-7 Monaten sind in P0<sup>+/-</sup> Mäusen dann elektrophysiologische Anzeichen der peripheren Neuropathie wie Verlängerung der F-Wellen Latenzen nachweisbar (Zielasek et al., 1996). Ähnliche Symptome sind generell typisch für humane CMT1B Neuropathie, unabhängig von der zugrundeliegenden P0 Punktmutation (Martini, 1997; Hattori et al., 2003; Krarup, 2003; Wrabetz et al., 2003a).

### **1.2.2. Cx32-defiziente Mäuse als Modell von CMT1X**

Eine der, nach CMT1A, häufigsten Subformen von CMT1 ist CMT1X, die 7-10% der CMT1 Fälle stellt (Tabelle 2).

Connexin 32 (Cx32 oder gap junction Protein B1, GJB1) ist das erste klonierte Connexin (Paul, 1986) unter 19 murinen und 20 humanen derzeit bekannten Connexinen (Willecke et al., 2002). Das Cx32 Gen ist in Mammalia hochkonserviert (Scherer and Paul, 2003). Cx32 wird in der Leber exprimiert, aber auch in anderen Geweben wie Niere, Darm, Lunge, Milz, Magen, Pankreas, Gehirn (in Oligodendrozyten und möglicherweise in manchen Neuronen) und in myelinisierenden Schwann'schen Zellen (Scherer et al., 1995). Das Cx32 Gen hat drei Promotoren, deren Aktivierung vom Zelltyp abhängig ist. Die Transkription von Cx32 ist eng mit den Transkriptionsfaktoren EGR2 und SOX10 verknüpft (Bondurand et al., 2001), beide werden in Schwann'schen Zellen exprimiert, während in Oligodendrozyten nur SOX10 exprimiert wird (Kuhlbrodt et al., 1998). Im Nervensystem werden zwei Connexine exprimiert, Cx32 und Cx29. Im PNS ist vorwiegend Cx32 zu finden, im ZNS sind beide Connexine ähnlich exprimiert (Scherer and Paul, 2003). Im ZNS kann das Cx29 angeblich die Funktion vom Cx32 übernehmen, weshalb eine zentrale Symptomatik bei Mutationen des Cx32 Gens weniger auffällig ist (Kleopa et al., 2002).

Das Molekül von Cx32 besteht aus 283 Aminosäureresten und beinhaltet jeweils eine extrazelluläre, intrazelluläre und vier transmembrane Domänen. Die Funktion von Connexin ist die Formation von Kanälen (Connexonen) in sog. „gap junctions“ zwischen benachbarten Zellen. Sechs Connexin Moleküle formieren ein transmembranes Connexon, das zusammen mit einem Connexon der gegenüberliegenden Zellmembran Kanäle ausbildet, wodurch Ionen und

niedermolekulare Moleküle bis zu einer Größe von 1 kDa von Zelle zu Zelle gelangen können (Bruzzone et al., 1996).

Im Gegensatz zu P0 ist Connexin32 in Nervensystem im unkompakten Myelin paranodal und in den Schmidt-Lanterman Inzisuren lokalisiert (Scherer et al., 1995; Balice-Gordon, et al., 1998). Vermutlich formiert Connexin die radialen Wege durch die Myelinscheide, die eine direkte Verbindung zwischen Schwannzellsoma und den am weitesten „distal“ gelegenen zytoplasmatischen Fortsätzen (sog. „periaxonal collar“) bilden (Scherer et al., 1995).

Die Verbreiterung des adaxonalen Schwann Zell-Zytoplasmas kann deshalb als spezifischer Ausdruck der Cx32 Mutation betrachtet werden, da sich auf diese Weise die Kanalproteinsdysfunktion mit veränderten Diffusionswegen manifestiert. Möglicherweise hat Cx32 noch andere Funktionen, da manche Mutationen von Cx32, die CMT1X verursachen, in vitro in Zellkulturen komplett funktionstüchtige Kanäle formieren (Castro et al., 1999; Abrams et al., 2001).

Da das Cx32 Gen X-chromosomal lokalisiert ist, sind Männer meist deutlich schwerer betroffen als Frauen. Suralisbiopsien zeigen zusätzlich zu De- und Remyelinisierung und Zwiebschalenformation so genannte axonale Bündel als Anzeichen von axonaler De- und Regeneration. Darüber hinaus zeigen sie eine typische axonopathische Veränderung mit Auftreibung des adaxonalen Schwannzell-Zytoplasmas, so genannte verbreiterte periaxonale Schwann'zelluläre Fortsätze (Sander et al., 1998; Birouk et al., 1998; Hahn et al., 2001).

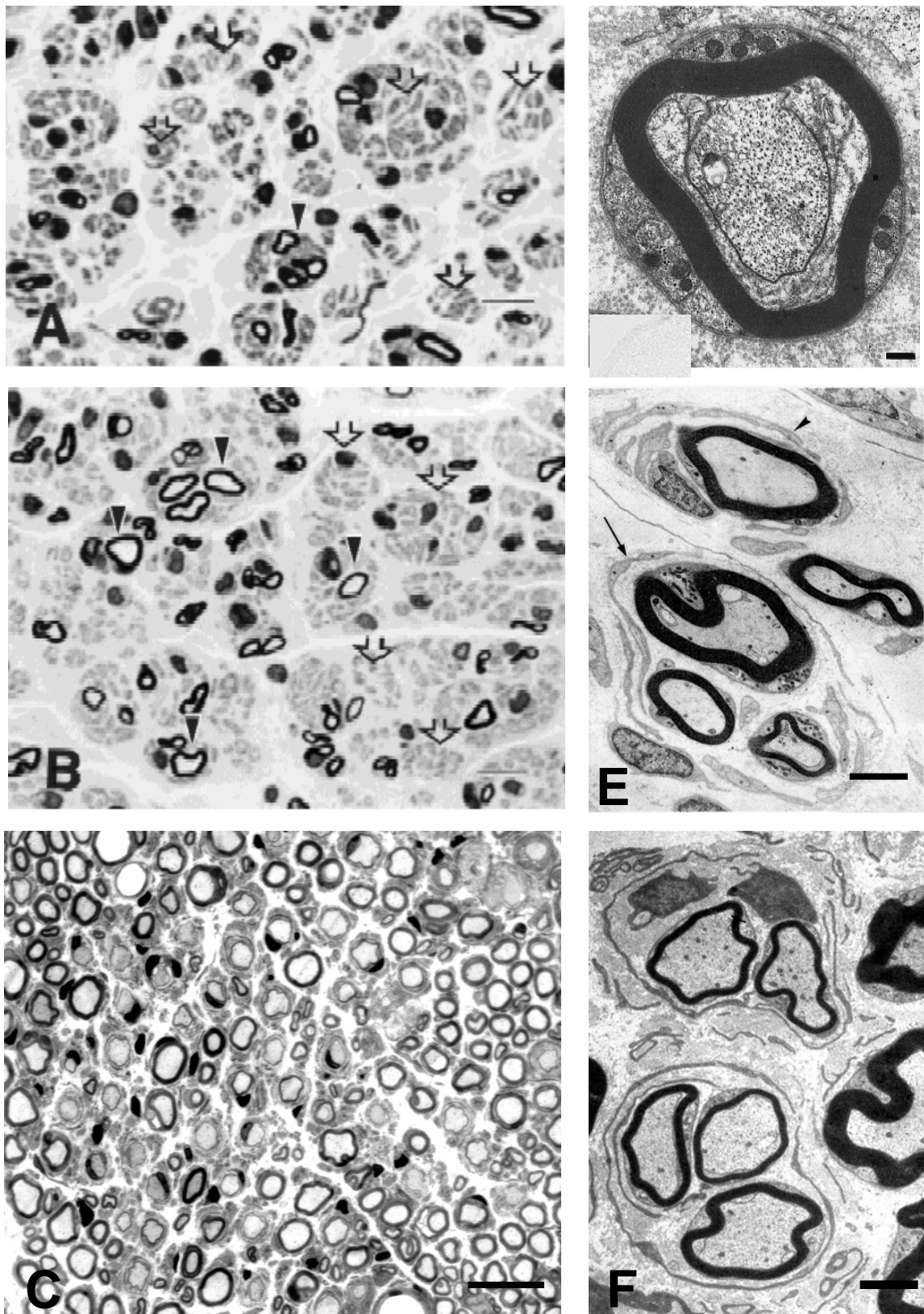
Für das Mausmodell von CMT1X wurden Cx32-defiziente (Cx32<sup>def</sup>) Mäuse als klassische knock-out Mäuse hergestellt (Nelles et al., 1996). Obwohl diese Mäuse keine offensichtlichen klinischen Abnormalitäten zeigen (Nelles et al., 1996), ähnelt das pathomorphologische Bild der peripheren Nerven (Abbildung 4, 6) humanen CMT1X Biopsien (Anzini et al., 1997; Martini, 1997; Scherer, 1998; Wrabetz et al, 2003b; Young und Suter, 2003).

Obwohl das Protein Cx32 sich strukturell, funktionell und hinsichtlich der Lokalisation im Myelin von P0 unterscheidet, weisen der Verlauf und das morphologische Bild der peripheren Neuropathie in entsprechenden Myelinmutanten gemeinsame Eigenschaften auf. Ähnlich zu den P0<sup>+/-</sup> Mäusen, zeigen die Cx32<sup>def</sup> Myelinmutanten zuerst normale Myelininformation, aber ab einem Alter von 3-4 Monate entwickelt sich die Pathologie vorwiegend motorischer Nerven. Spezifisch für die Cx32<sup>def</sup> Mäuse sind verbreiterte

periaxonale Schwann'zelluläre Fortsätze und axonopathische Anzeichen wie axonale Degeneration und regenerierende axonale Bündel.

Beim Vergleich von pathomorphologischen Phänotypen der humanen CMT und ihrer murinen Modelle muß man berücksichtigen, daß in Menschen mit hereditären Neuropathien pathomorphologische Untersuchungen von peripheren Nerven aus ethischen Gründen vorwiegend in den rein sensorischen Ästen des N. ischiadicus (N. suralis oder N. peroneus superficialis) durchgeführt werden. Die Erkenntnisse über die Morphologie von motorischen Nerven bei CMT sind sehr gering. Oda et al. (1990) fanden in motorischen Muskelnerve der Patienten mit HNPP ähnliche pathologische Anzeichen wie bei Suralisbiopsien. Hahn und Kollegen (2000, 2001) haben pathologische Veränderung des sensorischen N. peroneus superficialis und des motorischen N. peroneus profundus in Patienten mit CMT1X beschrieben. Die Abbildungen 4A und 4B zeigen, daß motorische Nerven in betroffenen Menschen ein zumindest ähnlich schweres pathomorphologisches Bild wie sensorische Nerven aufweisen.

In Mäusen kann man eine eingehendere Untersuchung des PNS durchführen. Sowohl in  $P0^{+/-}$ , als auch in  $Cx32^{def}$  Mäusen, sind vorwiegend motorische Nervenfasern betroffen. Je mehr motorische Axone ein Nerv enthält, desto mehr morphologische Anzeichen der Neuropathie sind nachweisbar: Ventrale Spinalwurzeln (fast ausschließlich Motoraxone) > Quadricepsnerv (gemischter Nerv, 40-45% motorische Axone) > Ischias- und Plantarnerven (gemischte Nerven, 12-15% motorische Axone) > Saphenusnerv und dorsale Spinalwurzeln (rein sensorisch). Warum das „sensorische“ Myelin unter diesen Bedingungen weniger betroffen ist, ist unklar.



**Abbildung 4.** Demyelinisierte, dünn/remyelinisierte Nervenfasern, Zwiebelschalenformation, axonale Bündel (E,F) und verbreiterte periaxonale Schwann'zelluläre Fortsätze (D) in peripheren Nerven von Patienten mit CMTIX (sensorischer N. peroneus superficialis (A von Hahn et al., 2000, D von Hahn et al. 1990, E von Vital et al., 2001) und motorischer N. peroneus profundus (B von Hahn et al., 2000); N. Quadriceps (C) und motorischer Spinalwurzel (F) von  $Cx32^{def}$  Mäusen. Balken A,B – 10  $\mu\text{m}$ , C – 20 $\mu\text{m}$ , D,E – 2  $\mu\text{m}$ , F – 4  $\mu\text{m}$ .



### **1.3. Faktoren, die den Schweregrad der CMT Neuropathie bedingen und modulieren**

Periphere Neuropathien können die verschiedensten Ursachen haben, wie z.B. Autoimmunität (Guillain-Barre Syndrom, CIDP), metabolische (Diabetes, Hypothyreoidismus, Leberpathologie, u.a.) und infektiöse (Diphtherie, Lepra, AIDS/HIV und u.a.) Erkrankungen sowie mitochondrialen Zytopathien (MHGIE Syndrom: myopathy, neuropathy, gastro-intestinal (pathology), encephalopathy oder NARP Syndrom: neuropathy, ataxia, retinitis pigmentosa). Zu peripheren Myelin- und/oder Axonenschäden führen auch ionisierende Strahlung und Vergiftung durch mehr als 100 Substanzen (Blei, Tellur u.a., oder Medikamenten wie Amiodaron, Vinca Alkaloide u.a.).

In unserer Arbeit haben wir uns auf diejenigen pathologischen Mechanismen konzentriert, die mit zugrundeliegenden Myelinmutationen verbunden sind.

#### **1.3.1. „Toxic gain of functions“ verursachen meist schwere neuropathische Veränderungen**

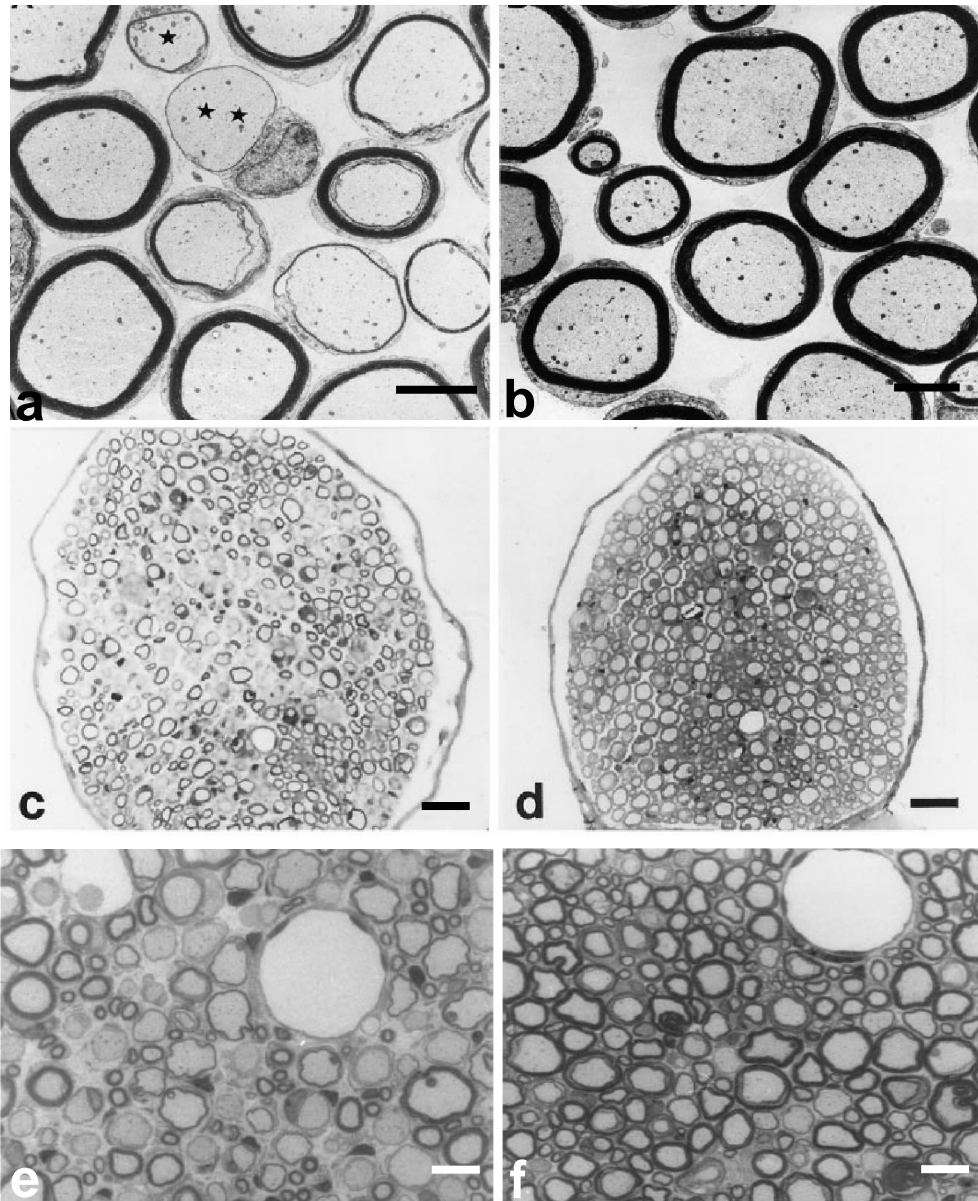
Im Vergleich zu  $P0^{+/-}$  Mausmutanten weisen Menschen mit CMT1B oft ein schwereres klinisches Bild der Neuropathie auf (Martini et al., 1995a; Martini, 1997).  $P0^{+/-}$  Mäuse exprimieren nur 50% der normalen Menge des P0 Proteins. Im Gegensatz dazu wird bei den meisten menschlichen P0 Punktmutationen zusätzlich zum normalen P0 Protein auch die mutierte Version von P0 exprimiert. Nur bei einer bekannten humanen Mutation, die zu einer Verschiebung des P0 Leserasters führt, verliert das mutierte Allel seine Funktion (Warner et al., 1996). In diesem Fall zeigen sich größere phänotypische Ähnlichkeiten der Pathologie zwischen Patienten und  $P0^{+/-}$  Mäusen. Die meisten humanen P0 Mutationen führen zu Phänotypen unterschiedlicher Ausprägung der Krankheit (CMT1B, Dejerine-Sottas Syndrom, kongenitale Hypomyelinisierung, CMT2) was durch das abnorme Genprodukt im Sinne eines „toxic gain of function“ bedingt wird (Hayasaka et al., 1993; Kirschner und Saavedra, 1994; Wong und Filbin, 1996). Wir haben dieses Phänomen auch in einem der ersten molekular „identischen“ Modelle der CMT1B beobachtet (Ile106Leu; Rühnker et al., 2004), das der humanen Erkrankung (Gabreëls-Festen et al., 1996) weitgehend entspricht.

Die Überproduktion von P0 (Wrabetz et al., 2000; Yin et al., 2000) oder PMP-22 (Magyar et al., 1996; Sereda et al., 1996; Huxley et al., 1998; Perea et al., 2001) in transgenen Mäusen kann auch das komplexe Netz von Synthese, Transport, Lokalisation und Degradation von Myelinkomponenten stören und zur Entwicklung der peripheren Neuropathie führen. In Menschen ist die Überexpression von PMP-22 eine der häufigsten Ursachen von CMT.

Vermutlich existieren noch weitere Faktoren, die epigenetisch den Schweregrad der CMT Neuropathie beeinflussen. Diese Annahme gründet sich u.a. auf die Existenz von deutlichen phänotypischen Unterschieden in Verwandten mit derselben Mutation wie bei CMT1B (Marques et al., 1999, Donaghy et al., 2000), CMT1A (Thomas et al., 1997; Ginsberg et al., 2004) und CMT1X (Gutierrez et al., 2000; Kuntzer, 2003).

### **1.3.2. Myelinmutationsbedingte Immunreaktionen als Modulator des genetischen Defekts**

In Mausmodellen von CMT1B wurde gezeigt, daß das Immunsystem den Schweregrad der peripheren hereditären Neuropathie beeinflusst (Abbildung 5; Schmid et al., 2000; Carenini et al., 2001; Mauerer et al., 2001). In  $P0^{+/-}$  Mäusen ist im Alter von 3-4 Monaten, zusammen mit den ersten histologischen Anzeichen der peripheren Neuropathie, auch der Anstieg von Makrophagen in den betroffenen Nerven nachweisbar. Einige Monate später, mit Zunahme der Neuropathie, steigt auch die Anzahl von CD8+ T-Zellen; CD4+ T-Zellen sind jedoch in peripheren Nerven von  $P0^{+/-}$  Mäusen kaum zu finden (Shy et al., 1997; Schmidt et al., 2000; Carenini et al., 2001; Martini und Toyka, 2004). Die Verkreuzung von  $P0^{+/-}$  Mäuse mit Mutanten, die keinen Macrophage colony stimulating factor (MCSF) exprimieren können (Yoshida et al., 1990; spontane Mutation, sogenannte „osteopetrotische“ Mäuse), oder mit Mutanten, die keine reifen Lymphozyten generieren (gentechnisch hergestellte Recombinant-activating gene-1 knock-out Mäuse, RAG-1<sup>-/-</sup>; Mombaerts et al., 1992), führte zu einer deutlichen Abmilderung der peripheren Neuropathie in Doppelmutanten im Vergleich zu  $P0^{+/-}$  Mäusen mit intaktem Immunsystem. Wenn bei RAG-1-defizienten/ $P0^{+/-}$  Doppelmutanten ein Knochenmarkstransfer von Wildtyp-Mäusen durchgeführt wurde, war der Schweregrad der Pathologie im peripheren Nerven ähnlich zu dem von  $P0^{+/-}$  Mäusen mit intaktem Immunsystem (Abbildung 5E, F; Mauerer et al., 2001).



**Abbildung 5.**  $P0^{+/-}$  Mäuse mit inkompetentem Immunsystem (b,d,f) weisen deutlich abgemilderte periphere Neuropathie im Vergleich zu den  $P0^{+/-}$  Mäusen mit intaktem (a,c) oder rekonstituiertem Wildtyp (e) Immunsystem auf.

a-d - Quadricepsnerven von  $P0^{+/-}$  Mäusen mit intaktem Immunsystem (a,c), und von  $P0^{+/-}/MCSF^{-/-}$  (b) und  $P0^{+/-}/RAG-1^{-/-}$  (d) Doppelmutanten;

e,f – ventrale Spinalwurzeln von  $P0^{+/-}/RAG-1^{-/-}$  Doppelmutanten nach einer Rekonstitution von Wildtyp- (e) und  $RAG-1^{-/-}$  (f) Knochenmark.

Carenini et al., 2001 (a,b); Schmid et al., 2000 (c,d), Mäurer et al, 2001 (e,f).

Balken a, b 5  $\mu\text{m}$ , c, d 20  $\mu\text{m}$  e,f 10 $\mu\text{m}$ .

Die Rolle von  $\alpha\beta$ -T-Zellen für die Ausprägung der Neuropathie in  $PO^{+/-}$  Mäusen war von Schmid und Kollegen (2000) mit T-Zell-Rezeptor- $\alpha$  defizienten/ $PO^{+/-}$  Doppelmutanten gezeigt worden.

Die  $PO^{+/-}$  Maus ist nicht das einzige Tiermodell, das die Beteiligung des Immunsystems in der Pathogenese von hereditären neurologischen Erkrankung zeigt. Arbeiten am Tiermodell von Morbus Krabbe, einer schweren, genetisch determinierten Leukenzephalopathie, zeigen, daß der Erkrankungsverlauf durch die Verkreuzung mit MHC Klasse II defizienten Mäusen deutlich abgemildert werden kann (Matsushima et al., 1994).

In Menschen sind die Anzeichen der Inflammation in Patienten mit degenerierenden Erkrankungen sowohl des zentralen Nervensystems, wie Adrenoleukodystrophie (Dunne, 1993; McGuinness et al., 1995), als auch bei peripherer Facioscapulohumeraler muskulärer Dystrophie (Arahata, 1995) und hereditärer Neuropathie des Plexus brachialis ( Klein et al., 2002) beschrieben.

Es gibt zahlreiche Berichte über Anzeichen von Inflammation in peripheren Nerven von Patienten mit CMT und sogar über ein Ansprechen mancher Patienten mit hereditärer Neuropathie (vorwiegend CMT1) auf eine antiinflammatorische Therapie (Dyck et al., 1982a,b; Prenskey and Dodson, 1984; Bird and Sladky, 1991; Vital et al., 1992; Gabreels-Festen et al., 1992, 1993; Schmid et al., 1996; Thomas et al., 1997; Reilly et al., 1998; Malandrini et al., 1999; Tabaraud et al., 1999; Donaghy et al., 2000; Lewis et al., 2000; Malik et al., 2000; Gabriel, 2002; Watanabe et al., 2002; Vital et al., 2003; Ginsberg et al., 2004).

Hierbei handelt sich jedoch um das gleichzeitige Vorkommen von Hereditärer- und Immunneuropathie mit CIDP- ähnlichen Eigenschaften (Martini und Toyka, 2004). So zeigen die wenigen Patienten, die eine klinische Verbesserung nach antiinflammatorischer Therapie aufwiesen (Dyck et al., 1982b; Bird und Sladky, 1991; Crawford und Griffin, 1991; Vital et al., 1992, 2003; Reilly et al., 1998; Malandrini et al., 1999; Rajabally et al., 2000; Donaghy et al., 2000; Watanabe et al., 2002; Ginsberg et al., 2004), häufig asymmetrische klinische Anzeichen der Neuropathie, Episoden mit schneller klinischer Verschlechterung, sensible Störungen wie Hyperalgesie und Allodynie. Bei Nervenbiopsien war eine Ödemformation in den betroffenen Nerven nachweisbar. Bei der Analyse von endoneuralen Immunzellen, die nur in einzelnen Fällen durchgeführt wurde, wurde eine vorwiegend perivaskuläre, epi- oder perineurale

Immunzellinfiltration nachgewiesen, worin CD4<sup>+</sup> T-Zellen (Ginsberg et al., 2004) einen wesentlichen Anteil bildeten. Die Abwesenheit der oben erwähnten CIDP-ähnlichen Eigenschaften im Mausmodell der CMT1B Neuropathie läßt jedoch vermuten, daß der Einbindung des Immunsystems in die Pathogenese der peripheren Demyelinisierung in P0<sup>+/-</sup> Mäuse andere Mechanismen zugrunde liegen.

Am Ende dieser Behandlung stellt sich die Frage, ob die Wirkung des Immunsystems auf den Schweregrad der peripheren Neuropathie ein spezifisches Phänomen im Mausmodell von CMT1B ist, oder ob wir einen Pathomechanismus beobachten, der in Mausmodellen anderer CMT1 Subtypen auch wesentlich zur Entwicklung der peripheren Neuropathie beiträgt.

#### **1.4. Zielsetzung der Arbeit**

In unserer Arbeit wollten wir die Frage beantworten, ob die modulierende Wirkung des Immunsystems auf den Schweregrad einer peripheren Neuropathie ein spezifisches Phänomen bei P0<sup>+/-</sup> Myelinmutanten ist, oder ob es sich um einen weiter verbreiteten Mechanismus handelt. Wir haben uns auf die Cx32-defiziente (Cx32<sup>def</sup>) Maus als Modell einer der häufigsten Subformen von CMT1, die CMT1X Neuropathie, konzentriert. Der diesem Modell zugrundeliegende Gendefekt betrifft Cx32. Das entsprechende Protein unterscheidet sich in Funktion, Struktur und Lokalisation grundlegend vom Myelinprotein P0. Trotzdem aber zeigen die Cx32<sup>def</sup> Mäuse bestimmte klinische und pathomorphologische Eigenschaften der peripheren Neuropathie, die denen des Mausmodells von CMT1B ähneln.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Mausmodelle

Cx32-defiziente (Cx32<sup>def</sup>) Mäuse (Cx32<sup>y/-</sup> oder Cx32<sup>-/-</sup> Genotypen) und RAG-1 defiziente Mäuse wurden mit Hilfe konventioneller knock-out Methoden durch Verwendung homologer Rekombination in embryonalen Stammzellen generiert (Mombaerts et al., 1992; Nelles et al., 1996). Cx32<sup>def</sup> Mutanten wurden uns von Prof. Willecke (Bonn) und RAG-1-defiziente Mutante von Prof. Zinkernagel (Zürich) zur Verfügung gestellt.

Um die Gefahr einer Misinterpretation aufgrund der verschiedenen genetischen Hintergründe zu minimieren, wurden in unsere Studie nur Geschwistertiere eingeschlossen.

Als erster Schritt zur Generierung Cx32- und RAG-1-defizienter Doppelmutanten wurden weibliche Cx32<sup>def</sup> Mäuse mit RAG-1<sup>-/-</sup> Mäusen verpaart. Cx32-defiziente Mäuse besaßen einen C57/BL6 x 129sv genetischen Hintergrund, RAG-1 Mutanten einen einheitlichen C57/BL6 Hintergrund. Männliche hemizygote Cx32<sup>y/-</sup>/RAG-1<sup>+/-</sup> und weibliche heterozygote Cx32<sup>+/-</sup>/RAG-1<sup>+/-</sup> Mäuse wurden daraufhin herangezogen um Doppelmutanten zu erzielen (F2). 12-13 Monate alte Cx32<sup>def</sup>/RAG-1<sup>-/-</sup> und Cx32<sup>def</sup>/RAG-1<sup>+/?</sup> Geschwistertiere wurden verglichen.

Die Züchtung der transgenen Mäuse wurde von Seiten der Bayerischen Staatsbehörden genehmigt (Würzburg, Deutschland).

### 2.2. Genotypisierung

Mit Hilfe konventioneller PCR wurde die aus Schwanzspitzen gewonnene DNA (DNeasy Tissue Kit, Qiagen, Hilden, Deutschland) entsprechender Mäuse genotypisiert.

Dazu wurden folgende Primer verwendet:

Primer 1: 5'-CCATAAGTCAGGTGTAAAGGAGC-3'

Primer 2: 5'-AGATAAGCTGCAGGGACCATAGG-3'

Primer 3: 5'-ATCATGCGAAACGATCCTCATCC-3'

Das Cx32 Wildtyp Allel wurde mit Primer 1 und 2 identifiziert, für das mutierte Cx32 Allel verwendeten wir Primer 1 und 3.

Das Endvolumen der PCR-Ansätze betrug 25µl. PCR-Ansätze wurden bei 93°C für 2 Minuten denaturiert, gefolgt von 40 Zyklen (93°C für 30 Sekunden, 66°C für 45 Sekunden und 72°C für 90 Sekunden) und einer finalen Elongation bei 72°C für 10 Minuten. Die PCR-Produkte (Wildtypallel von 550 Basenpaaren (bp) und das mutierte Allel von 414 bp) wurden mittels Gelelektrophorese getrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt.

Der RAG-1 Immunstatus wurde mit Hilfe von FACS (fluorescence activated cell sorting, FACScan (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany)) peripherer Blutzellen, die mit anti-CD4-PE (phycoerythrin-coupled anti-CD4) und anti-CD8-FITC (Fluorescein-isothiocyanate-coupled anti-CD8) Antikörpern (PharMingen, Heidelberg, Germany) gefärbt wurden, bestimmt. Mäuse mit CD4- und CD8-positiven T-Zellen wurden als RAG-1<sup>+/?</sup> klassifiziert, während Mäuse mit fehlenden CD4- und CD8-positiven T-Zellen als RAG-1<sup>-/-</sup> bezeichnet wurden (Schmid et al., 2000). Die FACS Ergebnisse wurden auch mit CD8-Färbung der Quadricepsnerven bestätigt: In RAG-1 defizienten Myelinmutanten war keine CD8+ Zellen nachweisbar.

### **2.3. Gewebepräparation und Fixierungsmethoden**

Für die Durchführung von Immunhistochemie wurden N. femoralis aus mit Ketanest/Rompun betäubten Mäusen entnommen, in Tissue-Tek (Sakura, Niederlande) eingebettet und sofort in Methylbutan (Serva, Deutschland), das zuerst mit flüssigem Stickstoff gekühlt worden war, gefroren. Die gefrorenen Nervenblöcke wurden bei -20°C aufbewahrt.

N. femoralis und lumbale (L2-L4) Spinalwurzeln wurden für Licht- und Elektronenmikroskopie bearbeitet, wie früher beschrieben (Carenini et al., 2001): Für Immunelektronenmikroskopie wurden die Mäuse 2 Minuten lang mit PBS und anschließend 12-15 Minuten lang mit 4% Paraformaldehyd (Merck, Deutschland) in 0,1M Cacodylat (Serva, Deutschland) Puffer transkardial perfundiert. Für konventionelle Elektron- und Lichtmikroskopie der peripheren Nerven haben wir den gleichen Perfusionspuffer mit zusätzlich 2% Glutaraldehyd (Serva, Deutschland) verwendet. Nach der Perfusion wurden die entnommenen Nerven über Nacht in demselben Fixationspuffer gelagert, danach wurden sie osmifiziert (in 2% OsO<sub>4</sub> im 0,1M Cacodylat Puffer) und in Spurr (61% Nonenylsuccinic anhydride, 14% 3,4-Epoxy-cyclohexylmethyl-3,4-Epoxy-cyclohexylcarboxylate (ERL), 1% Dimethylaminoethanol, 14% D.E.R. 736 von Serva, Deutschland) eingebettet.



Für die lichtmikroskopische Analyse wurden 0,5- $\mu\text{m}$  dicke „semidünne“ Schnitte von Femoralisnerven und Spinalwurzeln mit alkalischem (pH 9,2) Azur-Methylenblau gefärbt.

Für die konventionelle Elektronenmikroskopie wurden 70 nm dicke, „ultradünne“ Schnitte der gleichen Nerven mit Bleizitrat gefärbt und elektronenmikroskopisch mit einem Zeiss EM 10B (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) untersucht.

#### **2.4. Immunhistochemie**

Immunhistochemische Analysen wurden auf 10- $\mu\text{m}$  dicken Querschnitten von N. femoralis durchgeführt. Für die Färbung endoneuraler Makrophagen wurde ein Ratten anti-Maus F4/80 Antikörper (1:300; Serotec, Eching, Deutschland) verwendet. T-Zellen in Quadricepsnerven und in Milzgewebe als Positivkontrolle wurden mit Hilfe von Ratten anti-Maus CD8 Antikörpern gefärbt (1:1000; freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Professor R. Zinkernagel, Zürich, Schweiz). Biotinylierter Anti-Ratten Sekundärantikörper (1:100, Vector Labs., Burlingame, USA) wurde für 1 Stunde bei Raumtemperatur angewendet. Anschließend wurden die Schnitte mit Streptavidin, biotinylierter Meerrettich -Peroxidase (Vector Labs., Burlingame, USA) und 3,3 Diaminobenzidin-tetrachlorid Dihydrat (DAB, Kem-En-Tec Diagn., Kopenhagen, Dänemark) gefärbt.

#### **2.5. Immunelektronenmikroskopie**

Wie schon erwähnt, wurden Femoralisnerven und Spinalwurzeln zuerst nach der transkardialen Perfusion mit 4% Paraformaldehyd in 0,1M Cacodylat Puffer übernacht in demselben Puffer nachfixiert. Nach der Zupfpräparation wurden die Nerven im selben Fixationspuffer für 3 Stunden nochmals nachfixiert und danach mit primärem Ratten Anti-Maus F4/80 Antikörper (1:300; Serotec, Eching, Deutschland), sekundärem biotinyliertem anti-Ratten Antikörper und anschließend mit Meerrettich-Peroxidase- DAB System (siehe 2.4. Immunhistochemie) gefärbt. Die gefärbten Nerven wurden mit 2% OsO<sub>4</sub> in 0,1M Cacodylat Puffer osmifiziert und nach Dehydration in Spurr eingebettet.

Die Immunreaktivität wird in der Elektronenmikroskopie durch ein elektronendichtes DAB- Präzipitat sichtbar und identifiziert so eindeutig die Makrophagen.

## 2.6. Quantitative Morphologie

Die Untersuchung des Einflusses einer RAG-1 Defizienz auf die periphere Neuropathie in Cx32-defizienten Mäusen wurde von Prof. R. Martini und Prof. K.V.Toyka ohne Kenntnis des RAG-1 Genotyps auf semidünnen Schnitten von Quadricepsnerven und Spinalwurzeln durchgeführt.

Die pathologischen Merkmale wurden anschließend in Quadricepsnerven und Spinalwurzeln mit Hilfe einer BioVision slow scan Kamera, die an ein Elektronenmikroskop, Zeiss EM 10B, gekoppelt ist und unter Verwendung entsprechender Software analySIS 3.0 Doku (Münster, Deutschland) mit einer Vergrößerung von x640 bis x25000 untersucht.

Die folgenden morphologischen Parameter wurden quantifiziert (Abbildung 4,6): Die Anzahl von myelinisierten Axonen mit verbreiterten periaxonalen Schwann'zelluläre Fortsätze (Anzini et al., 1997), von demyelinisierten und dünn myelinisierten Axonen mit g-ratio >0.9 (g-ratio ist ein Maß der Myelindichte; Friede, 1972), von überzähligen Schwann'schen Zellen, von regenerativen axonalen Bündeln (Anzini et al., 1997) und die Anzahl der Axonen mit periaxonalen Vakuolen. Die g-ratio wurde in 50 zufällig gewählten Nervenfasern des Quadricepsnervs oder der ventralen Spinalwurzel gemessen. Da die Anzahl von myelin-kompetenten Axonen im Quadricepsnerv (500-600 Axone) und in ventralen Spinalwurzeln (700-1000 Axone) unterschiedlich ist, haben wir die relative Anzahl der pathologischen Profile entsprechend zur gesamten Anzahl der myelin-kompetenten Axone kalkuliert.

Die Neurofilamentdichte (Abbildung 9, 10) haben wir in Quadricepsnerven von drei Mäusen/Genotyp, 7-9 Axonen jedes Axontyps/Maus (Abbildung 9), auf der Fläche von 0.8-1.2  $\mu\text{m}^2$ /Axon bei einer Vergrößerung von x25000 im internodalen Bereich gemessen. Bereiche von Ranvier'sch Schnürringe und Schmidt-Lanterman Inzisuren wurden vermieden, da hier auch in Wildtyp-Tieren eine erhöhte NF-Dichte vorkommt (Price et al., 1988).

Für die Analyse der Axongrößenverteilung haben wir die Umfänge von 400-500 myelin-kompetenten Axonen pro Quadricepsnerv von drei Mäusen pro Genotyp bei einer Vergrößerung von x640 gemessen.

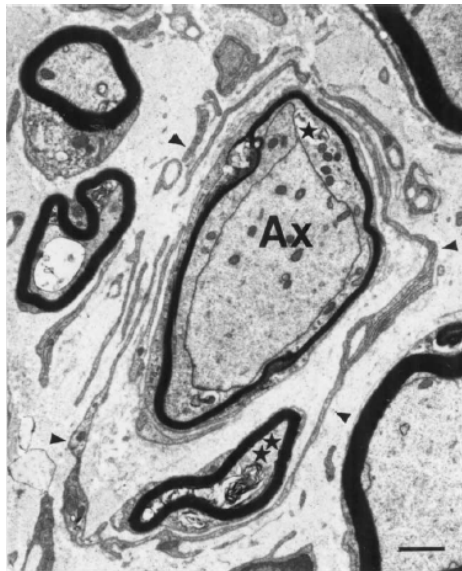
## **2.7. Statistische Methoden**

Die pathologischen Parameter der peripheren Neuropathie in Mäusen von unterschiedlichen Genotypen wurden mit dem Mann-Whitney U- Test analysiert. Als statistische Signifikanz wurde  $p < 0,05$  angenommen. Alle Daten wurden als Mittelwerte (M)  $\pm$  Standardabweichung (SD) dargestellt. Für den Vergleich der Axongrößenverteilungen wurde der Kolmogorov-Smirnov Test angewendet. Die Statistische Analyse wurde mit MS Excel (Microsoft GmbH, Stuttgart, Deutschland) und SYSTAT (SPSS Inc., Chicago, USA) durchgeführt. Alle Graphen wurden mit SigmaPlot 2001 (SPSS Inc.) dargestellt.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Pathomorphologisches Bild von peripheren Nerven in Cx32-defizienten Mäusen.

Die konventionelle Elektronenmikroskopie zeigte typische pathologische Profile (Anzini et al., 1997) in Quadricepsnerven und ventralen Spinalwurzeln (L2-L4) von Cx32-defizienten Mäusen (Abbildung 6): Dünn- und demyelinisierte myelinkompetente Axone (mit Durchmesser  $> 1\mu\text{m}$ ; Voyvodic, 1989), überzählige Schwann'sche Zellen, verbreiterte periaxonale Schwann'zelluläre Fortsätze und so genannte „regenerative axonale Bündel“ (zwei oder mehr myelin-kompetente Axone, die von einer überzähliger Schwann'scher Zelle umgeben werden; Dyck et al., 1993).



**Abbildung 6.** Die konventionelle Elektronenmikroskopie von *N. quadriceps* einer 6 Monate alten Cx32-defizienter Maus zeigte typische pathologische Profile der peripheren Neuropathie, wie verbreiteter periaxonaler Schwann'zellulärer Fortsatz (Sternchen), dünnes Myelin, überzählige Schwann'sche Zellen und regenerierendes Axon (Doppelsternchen). Ax, myelinisiertes Axon. Balken  $1\mu\text{m}$

Wie bereits erwähnt, ist die Anzahl der pathologisch veränderten Nervenfasern von der Anzahl der motorischen Axone im jeweiligen Nerven abhängig. So sind die ventralen Spinalwurzeln und der Quadricepsnerv am stärksten betroffen, eine deutlich mildere Pathologie weisen *N. ischiadicus* und *N. plantaris* auf. Anteilsmäßig weniger pathologische Profile konnte man in dorsalen Spinalwurzeln und dem *N. Saphenus*

finden. Es ist bemerkenswert, daß verbreiterte periaxonale Schwann'zelluläre Fortsätze sowohl in sensorischen als auch in motorischen oder gemischten Nerven relativ häufig nachweisbar waren, vielleicht als das früheste Anzeichen der Pathologie, die alle peripheren Nerven gleich stark betreffen kann. Deutliche Anzeichen der Pathologie waren schon im Alter von 3 Monaten in Quadricepsnerven von Cx32<sup>def</sup> Mäusen nachweisbar und ihre Anzahl zeigte eine positive Korrelation mit dem Alter der Tiere (Tabelle 3).

**Tabelle 3.** *Quantitative Morphologie von Quadricepsnerv in Wildtyp und Cx32<sup>def</sup> Mäusen (in der ältesten Gruppe 12 Cx32<sup>def</sup> Mäuse und 7 Wildtyp, in anderen Gruppen n=3)*

Alter der Mäuse:	3 Monate	6 Monate	12-13Monate
------------------	----------	----------	-------------

Wildtyp Mäuse

Anzahl der myelinkompetenten Axone	538.5±24.9	554.0±20.4	536±33.1
------------------------------------	------------	------------	----------

Cx32<sup>def</sup> Mäuse

(die pathologischen Profile in % zur gesamten Anzahl der myelinkompetenten Axone)

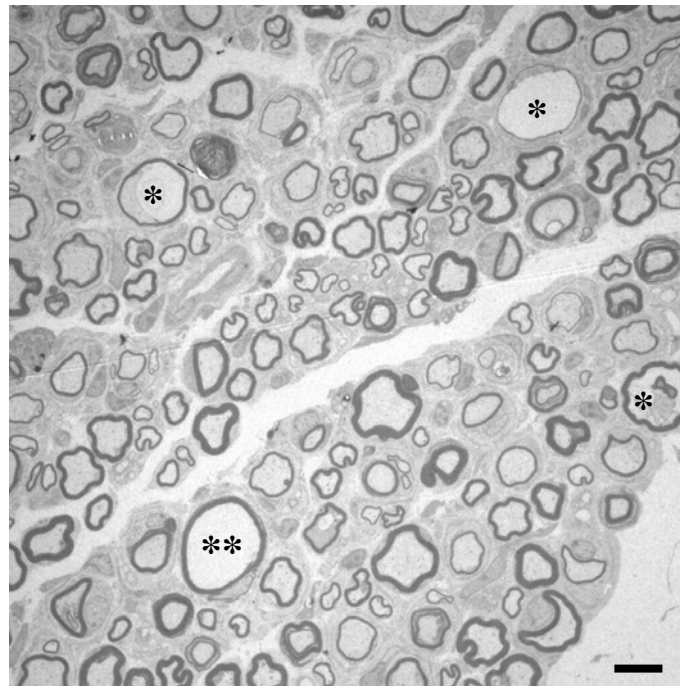
Anzahl der myelinkompetenten Axone	554.3±35.3	551.7±31.3	568.5±31.2
Überzählige Schw. Zellen (in %)	14.3±2.8	27.7±3.5	40.9±9.3
Regenerative axonale Bündel (in %)	0.3±0.1	0.6±0.2	2.6±1.0
Demyelinisierte myelinkompet. Axone (in %)	0.1±0.1	0.6±0.5	1.9±0.7
Dünn myelinisierte Axone (in %)	1.7±0.7	3.6±0.5	10.9±2.7
Verbreiterte periaxonale Schwann'zelluläre Fortsätze (in %)	0.4±0.1	0.8±0.3	3.6±1.4

Weder Quadriceps- noch Plantar- Cx32-defiziente Nerven wiesen axonalen Verlust auf (Tabelle 4).

**Tabelle 4.** Anzahl der myelin-kompetenten Axone in peripheren Nerven von *Cx32*-defizienten (*Cx32<sup>def</sup>*) und Wildtyp (*Cx32<sup>wt</sup>*) Geschwistertieren

	Quadricepsnerv	Plantarnerv
<i>Cx32<sup>def</sup></i> (n=5)	564.3±40.0	1474.6±103.1
<i>Cx32<sup>wt</sup></i> (n=4)	552.8±35.4	1551.4±74.7

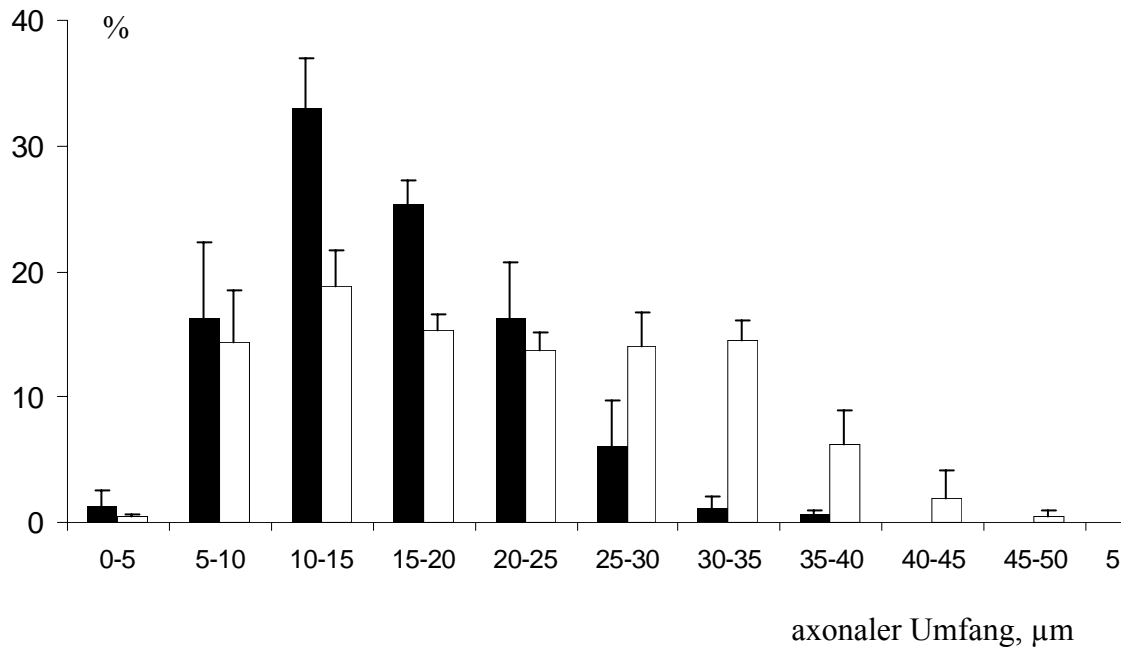
Dennoch zeigten diese Nerven und auch ventrale Spinalwurzeln insbesondere von älteren *Cx32<sup>def</sup>* Myelinmutanten Anzeichen einer subtilen Axonopathie: Verbreiterte periaxonale Schwann'zelluläre Fortsätze, regenerative axonale Bündel (Tabelle 3), vakuolisierte myelinkompetente Axone, degenerierte Nervenfasern ohne sichtbares axonales Zytoskelett (Abbildung 7), Veränderungen der axonalen Größe (Abbildung 8) und der Neurofilamentdichte (Abbildungen 9,10).



**Abbildung 7.** Vakuolisierte (\*) und degenerierte (\*\*) Axone im Quadricepsnerv einer 13 Monate alten *Cx32<sup>def</sup>* Maus. Balken 10  $\mu$ m

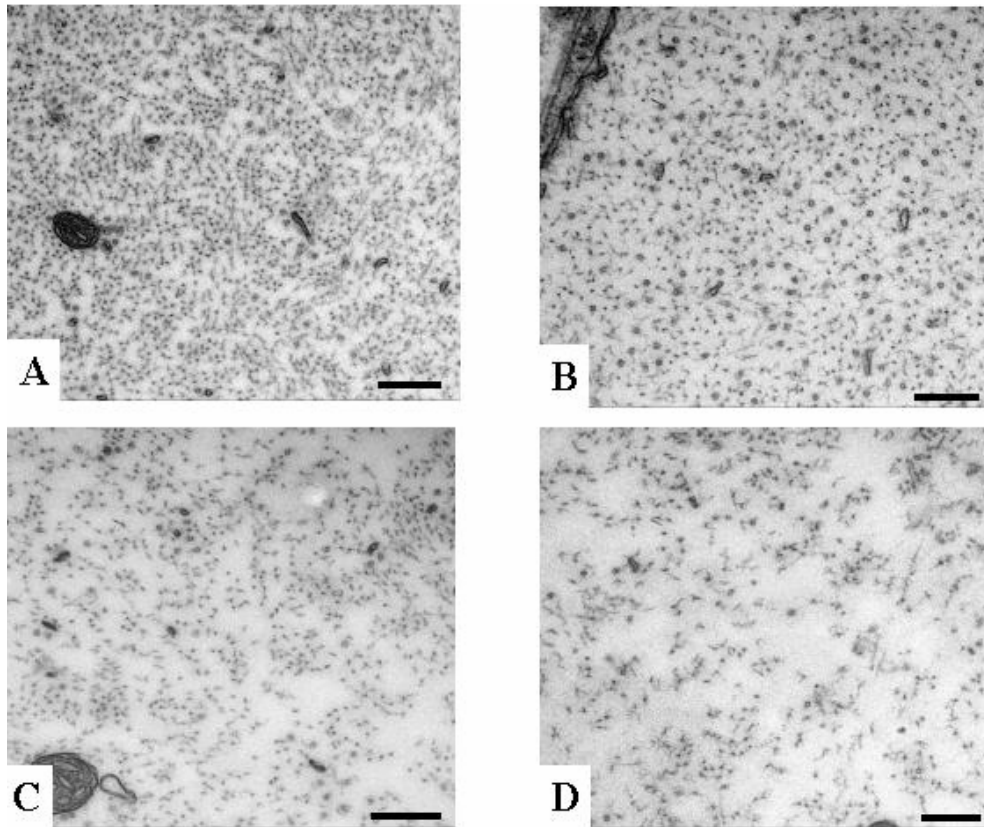
Die Verteilung der axonalen Durchmesser weist in Quadricepsnerven einjähriger Mäuse einen deutlichen Unterschied zwischen *Cx32<sup>def</sup>* und Wildtyp Geschwistertieren auf. Der Anteil von relativ großen Axonen war in *Cx32<sup>def</sup>* Mäusen deutlich reduziert.

Stattdessen wurden mehr kleinere Axone im Vergleich zu den Wildtyp Mäusen gezählt (Abbildung 8).



**Abbildung 8.** Die Verteilung der axonalen Umfänge von myelinisierten Axonen im Quadricepsnerv 12-13 Monate-alter Mäuse (3 Mäuse pro Genotyp, zirka 400 Axone/Maus);  $p < 0.0005$ , Kolmogorov-Smirnov Test)

Wir führten eine Analyse der Neurofilamentdichte (NF-Dichte) im internodalen Bereich von relativ großen Axonen (Diameter 4-6 µm) ventraler Spinalwurzeln durch. Bemerkenswerterweise zeigten sich in Axonen mit morphologisch normalen Myelinschichten von Cx32<sup>def</sup> Mäusen eine signifikant erhöhte NF-Dichte im Vergleich zu gleich großen Axonen in Wildtyp Mäusen (Abbildungen 9, 10).



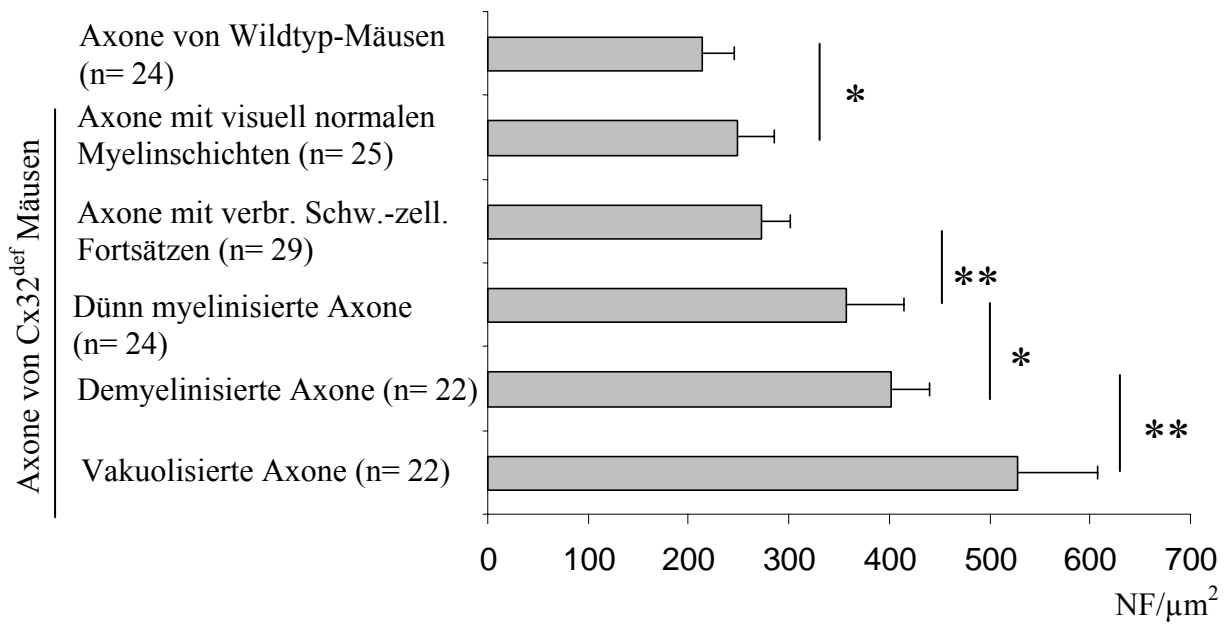
**Abbildung 9.** *Querschnitte von internodalen Bereichen unterschiedlicher Axone in ventralen Spinalwurzeln einer Cx32<sup>def</sup> Maus (A,B,C) und eines Wildtyp Geschwistertiers (D) im Alter von 12-14 Monaten:*

*A – Axon mit einer Vakuole, B – demyelinisiertes Axon, Axone von gleicher Größe mit morphologisch normalem und ähnlich dickem Myelin eines Cx32<sup>def</sup> Mutantes (C) und einer Wildtyp Maus (D). Balken 2,5 µm.*

In Cx32<sup>def</sup> Mäusen haben dünn myelinisierte Axone dichter gepackte Neurofilamente als Axone mit normal erscheinendem Myelin. Gleich große demyelinisierte Axone wiesen noch höhere NF-Dichte auf. Die höchste Dichte von Neurofilamenten als ein ausgeprägtes Anzeichen der axonalen Pathologie haben wir in vakuolisierten myelin-kompetenten Axonen gefunden (Abbildungen 9,10).

Gleiche Tendenzen haben wir auch in anderen peripheren Nerven wie N. quadriceps, N. ischiadicus und N. plantaris beobachtet.



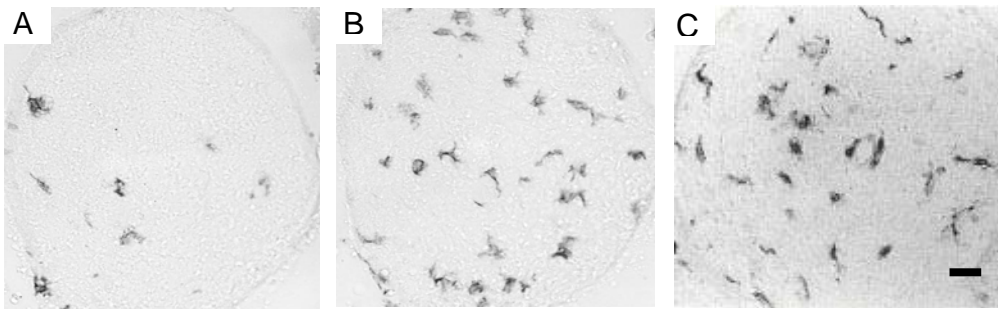


**Abbildung 10.** Die NF-Dichte in ventralen Rückenmarkswurzeln von drei 12-13 Monate Cx32<sup>def</sup> Mäusen ( $n = \text{Anzahl der untersuchten Axone mit Diameter von } 6 \text{ bis } 10 \mu\text{m}$ ) und drei Wildtyp Geschwistertieren.

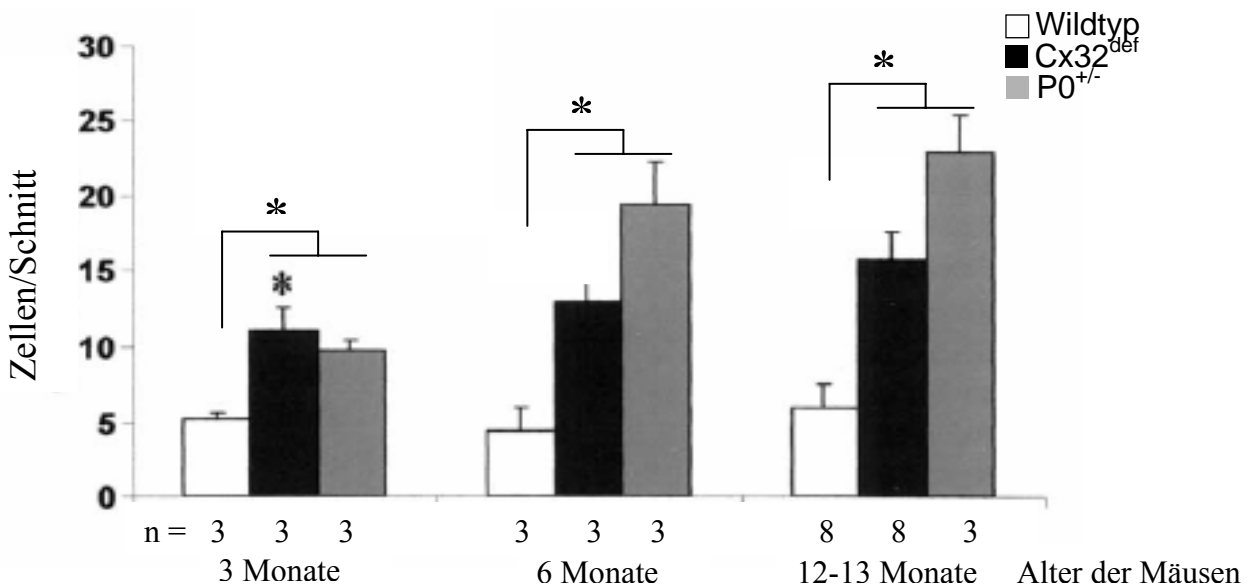
$M, SD, * - p < 0.01; ** - p < 0.001, \text{Mann-Whitney U-Test.}$

### 3.2. Hochregulation von Immunzellen im Quadricepsnerv von Cx32-defizienten Mäusen

Wir untersuchten die Anzahl der Makrophagen in Quadricepsnerven von Cx32-defizienten Mäusen im Alter von 3, 6 und 12 Monaten mit dem Maus-Makrophagen spezifischen Antikörper F4/80. Als Kontrolle dienten die Nerven von Wildtyp Geschwistertieren. Für einen Vergleich mit einem anderen Modell erblicher Neuropathie wurden die Nerven von P0<sup>+/-</sup> Mäusen herangezogen. Die Makrophagenanzahl in Myelinmutanten war altersabhängig, wobei mit wachsendem Alter die absolute Anzahl der Makrophagen in Cx32<sup>def</sup> Mutanten etwas geringer als in P0<sup>+/-</sup> Mäusen war (Abbildung 11, 12).

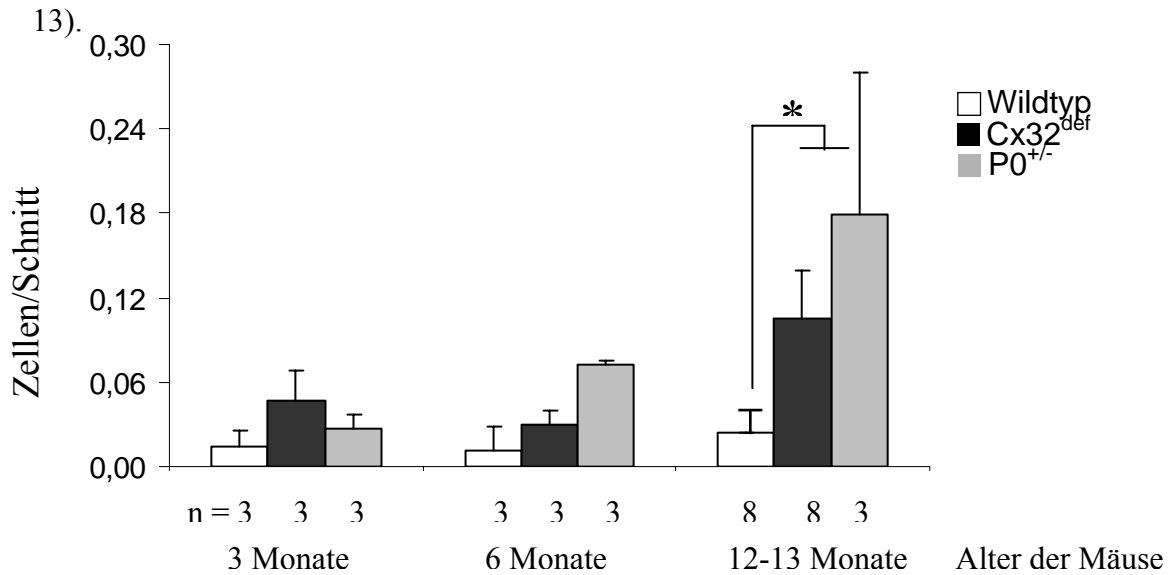


**Abbildung 11.** Makrophagen (F4/80 Färbung) in Quadricepsnerven von Wildtyp (A),  $Cx32^{def}$  (B) und  $P0^{+/-}$  (C) Mäusen im Alter von 12 Monaten. Balken 20  $\mu m$



**Abbildung 12.** Quantifizierung von F4/80 positiven Makrophagen in Quadricepsnerven von Wildtyp,  $Cx32^{def}$  und  $P0^{+/-}$  Mäusen im Alter von 3, 6. und 12-13 Monaten;  $M, SD$ ; \*  $p < 0,05$  (Mann-Whitney U-Test).

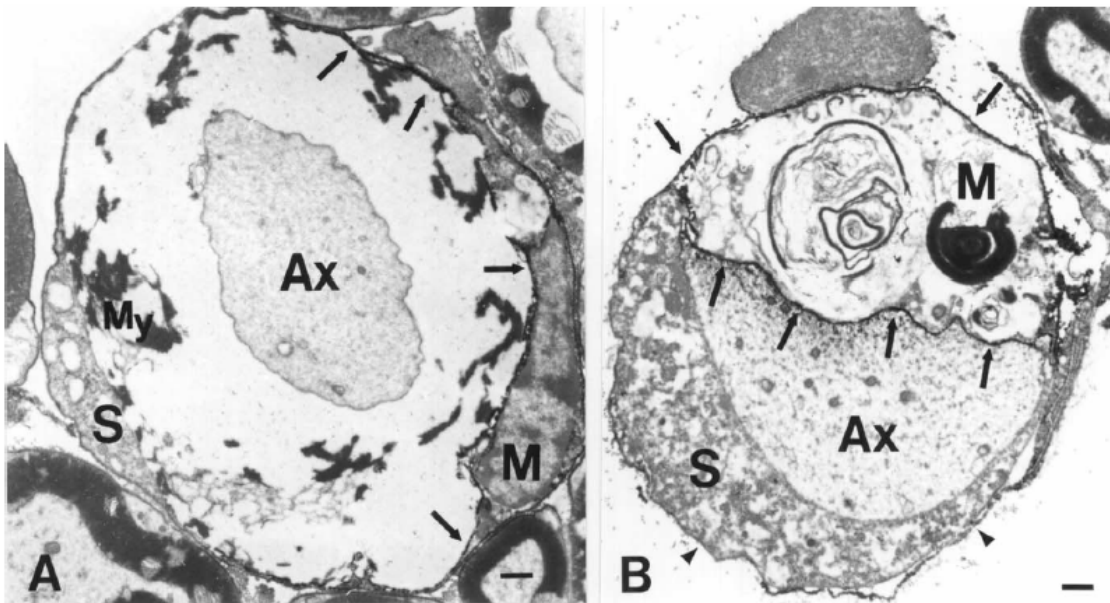
Ähnliche Tendenzen haben wir auch für CD8-positive T-Zellen beobachtet (Abbildung 13), jedoch wurde eine wesentliche und signifikante Steigerung der Anzahl von CD8+ T-Zellen erst in der Gruppe von 12-13 Monaten alten Mäusen nachweisbar (Abbildung



**Abbildung 13.** Anzahl von CD8-positiven T-Zellen in Quadricepsnerven von Wildtyp, Cx32<sup>def</sup> und P0<sup>+/-</sup> Mäusen im Alter von 3, 6 und 12-13 Monaten; M, SD; \*  $p < 0,05$  (Mann-Whitney U-Test);

### 3.3. Immunelektronenmikroskopie von Makrophagen in Quadricepsnerven und ventralen Spinalwurzeln von Cx32<sup>def</sup> Mäusen

Makrophagen in Quadricepsnerven und ventrale Spinalwurzeln wurden mit F4/80 Antikörper gefärbt. Die Immunreaktivität wird mit Elektronenmikroskopie durch ein elektrondichtes DAB- Präzipitat sichtbar und identifiziert so die Makrophagen eindeutig (Abbildung 14).



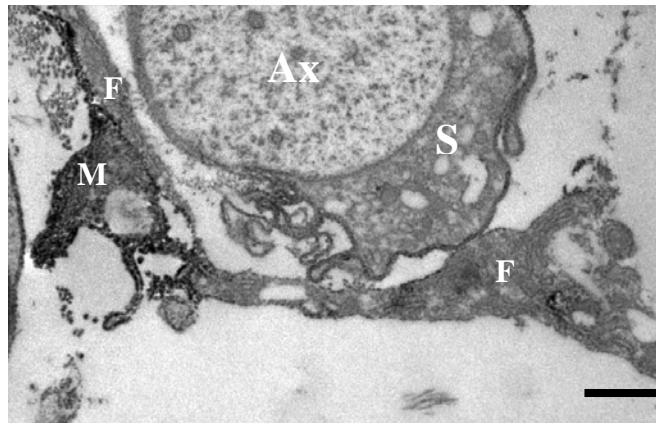
**Abbildung 14.** F4/80-Immunelektronenmikroskopie von Makrophagen in ventralen Wurzeln von einer 6 Monate alten Cx32<sup>def</sup> Maus.

(A) Ein F4/80-positiver Makrophage (M) hat die Basalmembran der Schwann'schen Zelle penetriert und ist in engem Kontakt mit teilweise vakuolisiertem Myelin (My).

(B) Ein demyelinisiertes Axon (Ax) in engem Kontakt mit einem F4/80-positiven Makrophagen. Pfeile: F4/80- Immunpräzipitat; Schwann'sche Zellen (S) und ihre Basallamina (Pfeilköpfe) zeigen keine positive F4/80 Färbung. Balken: 1 µm.

In untersuchten Nerven hatten manche Makrophagen innerhalb der endoneuralen Röhren einen direkten Zugang zu dem relativ unbeschädigten oder schon teilweise degeneriertem Myelin (Abbildung 14). Weiterhin konnte man innerhalb einer endoneuralen Röhre zwischen Schwann'scher Zelle und demyelinisiertem Axon einen mit Myelinresten beladenen Makrophagen nachweisen (Abbildung 14B).

Interessanterweise haben wir häufig enge Kontakte zwischen F4/80+ Makrophagen und endoneuralen Fibroblasten beobachtet (Abbildung 15). Die Fibroblasten können wir morphologisch identifizieren, als F4/80-negative Zellen mit rauem endoplasmatischem Retikulum und fehlender Basallamina.



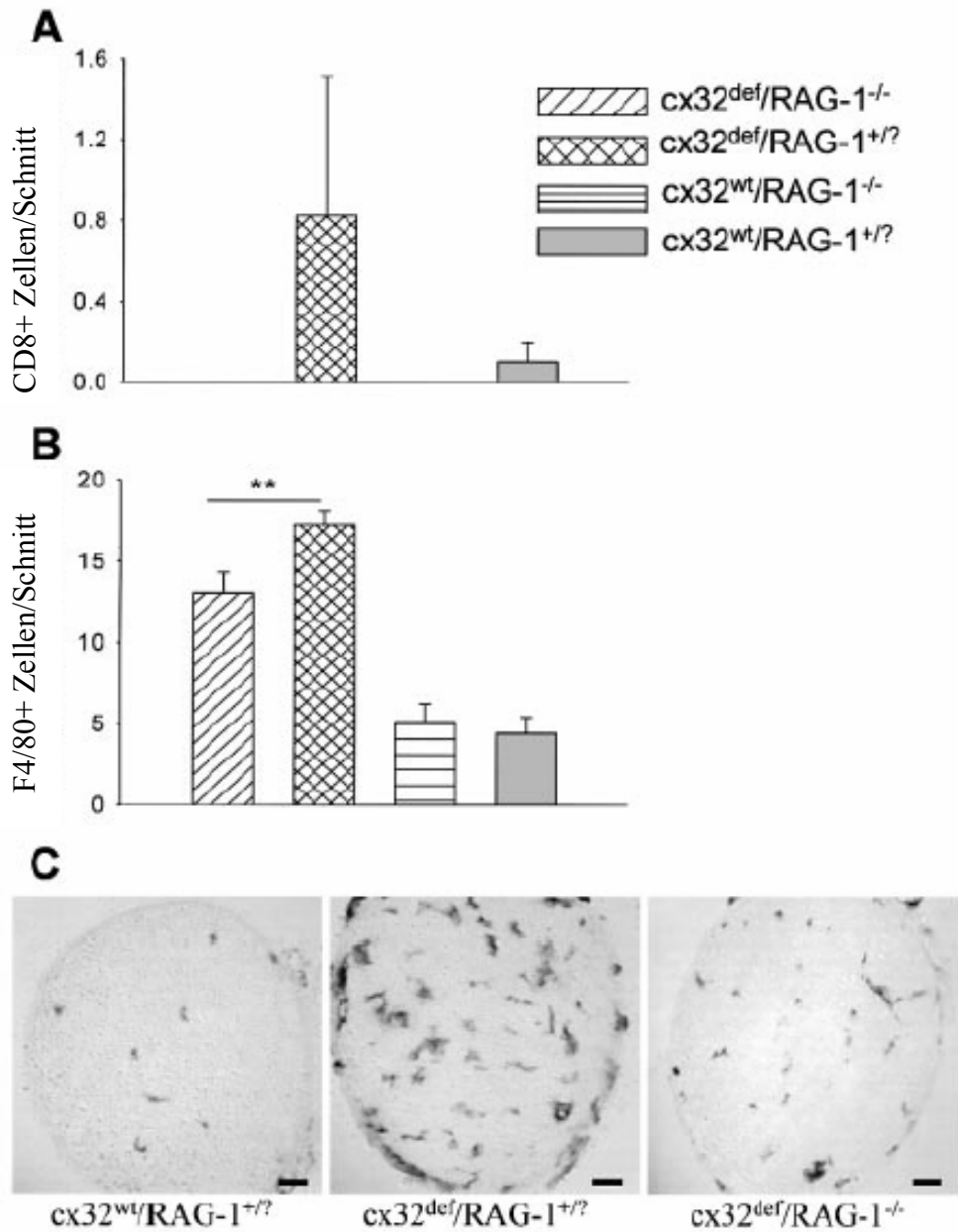
**Abbildung 15.** *Immunoelektronenmikroskopie mit Antikörpern gegen F4/80 in einem Quadricepsnerven einer 8-Monate alten Cx32-defizienter Maus. Das elektrondichte Präzipitat markiert einen Makrophagen (M) in enger Nähe zu einem demyelinisierten Axon (Ax). Er bildet Kontakte zu einem F4/80 negativen Fibroblasten (F). S, Schwann'sche Zelle. Balken 1  $\mu$ m*

### **3.4. Immunzellen in peripheren Nerven von Cx32<sup>def</sup>/RAG-1<sup>-/-</sup> Doppelmutanten**

Zur Charakterisierung der Rolle von Immunzellen in Cx32-defizienten Mäusen wurden diese mit RAG-1-defizienten Mäusen, die keine reifen T- und B-Lymphozyten besitzen, verkreuzt. Wir untersuchten diese Mäuse im Alter von 13 Monaten. Wie erwartet, wurden in den Nerven dieser Cx32<sup>def</sup>/RAG-1<sup>-/-</sup> Doppelmutanten keine CD8-Zellen gefunden (Abbildung 16).

Weiterhin war eine signifikante Reduzierung der Anzahl F4/80-positiver Makrophagen in Cx32<sup>def</sup>/RAG-1<sup>-/-</sup> Mäusen im Vergleich zu den Cx32<sup>def</sup>/RAG-1<sup>+/?</sup> Geschwistertieren nachweisbar.

Mittels konventioneller Elektronenmikroskopie wurde die Anzahl von Makrophagen auch in ventralen Spinalwurzeln Cx32<sup>def</sup>/RAG-1<sup>+/?</sup> und Cx32<sup>def</sup>/RAG-1<sup>-/-</sup> Mäuse untersucht. Als Makrophagen wurden morphologisch die Zellen identifiziert, die augenscheinlich intrazelluläre Vakuolen mit Myelin-Abbauprodukten enthielten, keinerlei Basalmembran und kleine, Mikrovilli- ähnliche Fortsätze aufwiesen. In den ventralen Spinalwurzeln der Cx32<sup>def</sup>/RAG-1<sup>+/?</sup> Mäuse wurden  $20,4 \pm 4,4$  Makrophagen je Gewebsschnitt gezählt (n = 5), wohingegen in den Spinalwurzeln Cx32<sup>def</sup>/RAG-1<sup>-/-</sup> Mäuse die Anzahl der Makrophagen pro Nervenschnitt signifikant niedriger war:  $7,8 \pm 2,7$  Makrophagen, n = 5, p < 0,001.



**Abbildung 16.** Quantifizierung von CD8- (A) und F4/80- (B) positiven Zellen und (C) mit F4/80 Antikörper gefärbte Kryoschnitte von Quadricepsnerven der Cx32 und RAG-1 Doppelmutanten.

A,B: M, SD, n= 5 in jeder Gruppe. \*\*  $p < 0,01$  beim Vergleich der Makrophagenanzahl zwischen  $Cx32^{def}/RAG-1^{+/?}$  and  $Cx32^{def}/RAG-1^{-/-}$  Mäusen (Mann-Whitney U-Test).

Balken: 20  $\mu$ m.

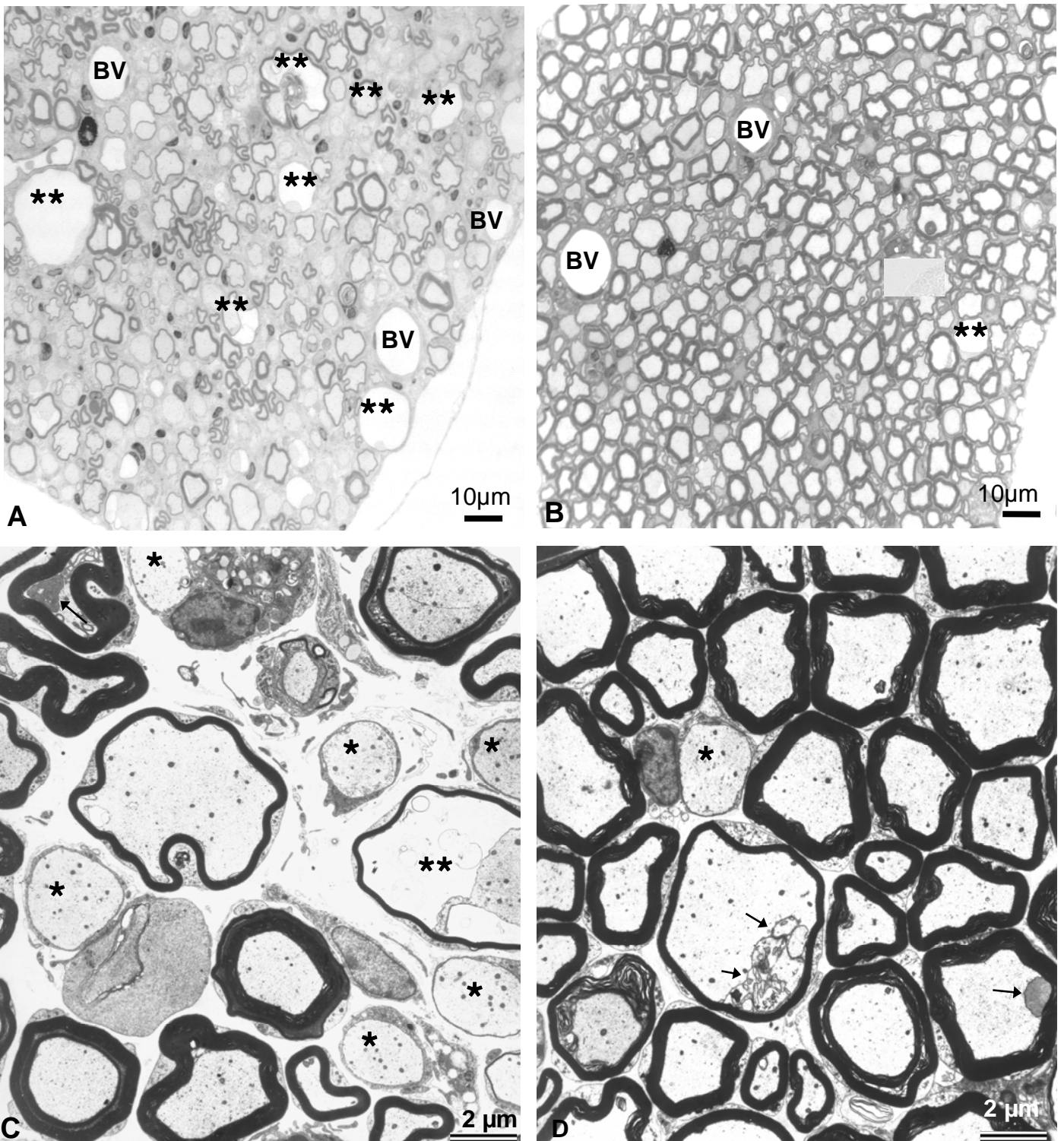
### **3.5. Die Abwesenheit des RAG-1 Gens führt zu milderer pathologischen Veränderungen im Quadricepsnerv und in den ventralen Spinalwurzeln von Cx32-defizienten Mäusen**

Zunächst wurde der mögliche Einfluss der RAG-1 Defizienz auf pathologische Veränderungen in Cx32-defizienten Mäusen mit Hilfe lichtmikroskopischer Methoden analysiert. Semidünnschnitte von Quadricepsnerven (nicht gezeigt) und ventralen Spinalwurzeln (Abbildung 17 A, B) von Cx32<sup>def</sup>/RAG-1<sup>+/?</sup> Mäusen können aufgrund stärkerer pathologischer Eigenschaften wie stärker vakuolisierte, dünn- und demyelinisierte Axone eindeutig von Schnitten von Cx32<sup>def</sup>/RAG-1<sup>-/-</sup> Mäusen unterschieden werden.

Elektronenmikroskopische Übersichten (Abbildung 17 C und D) zeigten detaillierter die milder ausgeprägte Pathologie in Cx32<sup>def</sup>/RAG-1<sup>-/-</sup> Doppelmutanten im Vergleich zu Cx32<sup>def</sup>/RAG-1<sup>+/?</sup> Mäusen. Quadricepsnerven von Cx32<sup>def</sup>/RAG-1<sup>+/?</sup> Mäuse wiesen charakteristische myelin- und axonopathische Eigenschaften reiner Cx32-defizienten Mäusen auf (Abbildung 18). Die Anzahl von verbreiterten periaxonalen Schwann'zelluläre Fortsätze war in Cx32<sup>def</sup> Mäusen unabhängig von RAG-1 Genotyp. Im Gegensatz dazu war die Anzahl von überzähligen Schwann'schen Zellen signifikant niedriger in Cx32<sup>def</sup> /RAG-1<sup>-/-</sup> Mäusen als in Cx32<sup>def</sup>/RAG-1<sup>+/?</sup> Geschwistertieren mit intaktem Immunsystem (Abbildung 18A). Cx32<sup>def</sup>/RAG-1<sup>-/-</sup> Mäuse zeigten signifikant niedrigere g-ratios als die Cx32<sup>def</sup>/RAG-1<sup>+/?</sup> Mutanten, was bedeutet, dass die Myelinscheiden in immundefizienten Myelinmutanten dicker waren, als in immunkompetenten Geschwistertieren (Abbildung 18A).

Weiterhin war in Cx32<sup>def</sup>/RAG-1<sup>-/-</sup> Doppelmutanten die Anzahl von Axonen, die periaxonale Vakuolen beinhalteten und eine wesentliche Steigerung der Neurofilamentendichte (Abbildung 8) aufwiesen, im Vergleich zu Cx32<sup>def</sup>/RAG-1<sup>+/?</sup> Mäusen signifikant reduziert ( $p < 0.01$ ).





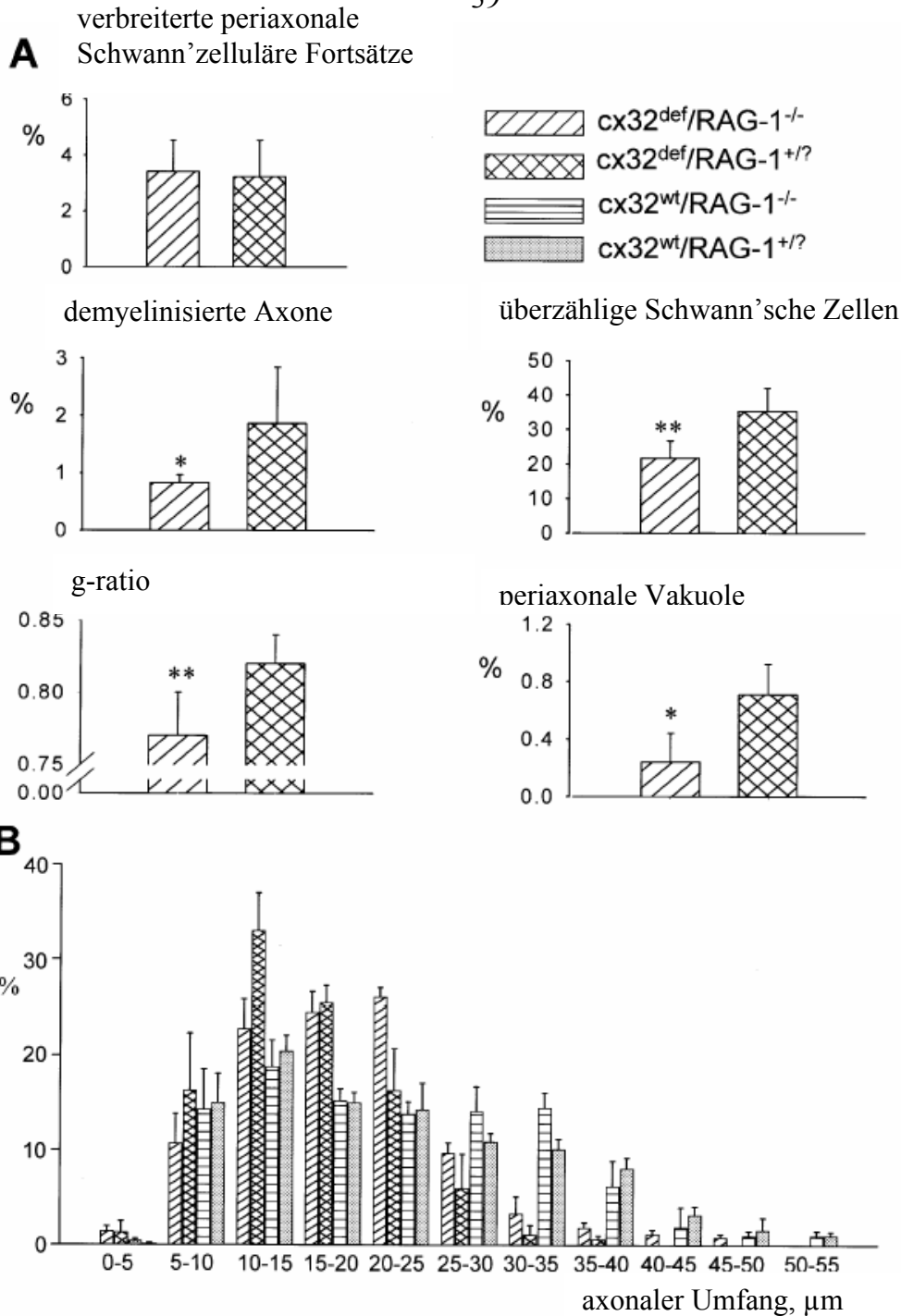
**Abbildung 17.** Licht- (A, B) und Elektronenmikroskopie (C, D) von ventralen Spinalwurzeln in  $Cx32^{def}/RAG-1^{+/?}$  (A, C) und  $Cx32^{def}/RAG-1^{-/-}$  (B, D) Mäusen. Pathologische Merkmale wie dünnes Myelin, demyelinisierte Axone (\*, C and D) und periaxonale Vakuolen (\*\*) sind häufiger in  $Cx32^{def}/RAG-1^{+/?}$  und seltener in  $Cx32^{def}/RAG-1^{-/-}$  Mäusen. Die verbreiterten periaxonalen Schwann'zelluläre Fortsätze (Pfeile in C und D) sind in beiden Genotypen gleich häufig zu sehen. BV: Blutgefässe. Balken: 10  $\mu\text{m}$  (A und B) und 2  $\mu\text{m}$  (C und D).

Als weitere typische axonale Abnormalität in  $Cx32^{def}/RAG-1^{+/?}$  Mäusen findet sich eine ausgeprägte Reduktion der axonalen Größe (Abbildung 18B). Im Vergleich zu diesen Mäusen, wiesen die immundefizienten  $Cx32^{def}/RAG-1^{-/-}$  Doppelmutanten eine Erhöhung des Anteils von mittelgroßen Axonen (Umfang von 20-25  $\mu\text{m}$ ) und einen niedrigeren Anteil von kleineren myelin-kompetenten Axonen ( $p < 0.00001$ , Kolmogorov-Smirnov Test) auf. Größere Axone (Umfang von 40-50  $\mu\text{m}$ ) waren nur in  $Cx32^{def}/RAG-1^{-/-}$ , nicht aber in  $Cx32^{def}/RAG-1^{+/?}$  Mäusen nachweisbar (Abbildung 18B).

Ein typisches pathologisches Merkmal der betroffenen peripheren Nerven von  $Cx32$ -defizienten Mäusen sind regenerierende axonale Bündel. Ihre Anzahl in Quadricepsnerven war in beiden Genotypen ähnlich ( $24.6 \pm 9.4$  in  $Cx32^{def}/RAG-1^{-/-}$  Doppelmutanten und  $16.8 \pm 7.5$  in  $Cx32^{def}/RAG-1^{+/?}$  Geschwistertieren,  $p=0.21$ ), obwohl innerhalb dieser Bündel die Anzahl von regenerierenden Axonen in immundefizienten Mutanten ( $2.57 \pm 0.22$ ) signifikant höher war, als in  $Cx32^{def}/RAG-1^{+/?}$  Mäusen ( $2.20 \pm 0.24$ ,  $p < 0.03$ ).

In ventralen Spinalwurzeln von  $Cx32^{def}/RAG-1^{+/?}$  Mäusen haben wir generell ähnliche pathologische Veränderungen gefunden wie in Quadricepsnerven, obwohl die Häufigkeit von manchen pathologischen Profilen unterschiedlich war (Abbildung 19). Zum Beispiel war in ventralen Spinalwurzeln die Anzahl von demyelinisierten Axonen ungefähr fünf Mal höher als im Quadricepsnerven desselben Tieres, gleichzeitig war die Anzahl von überzähligen Schwann'schen Zellen in den Spinalwurzeln wesentlich reduziert.

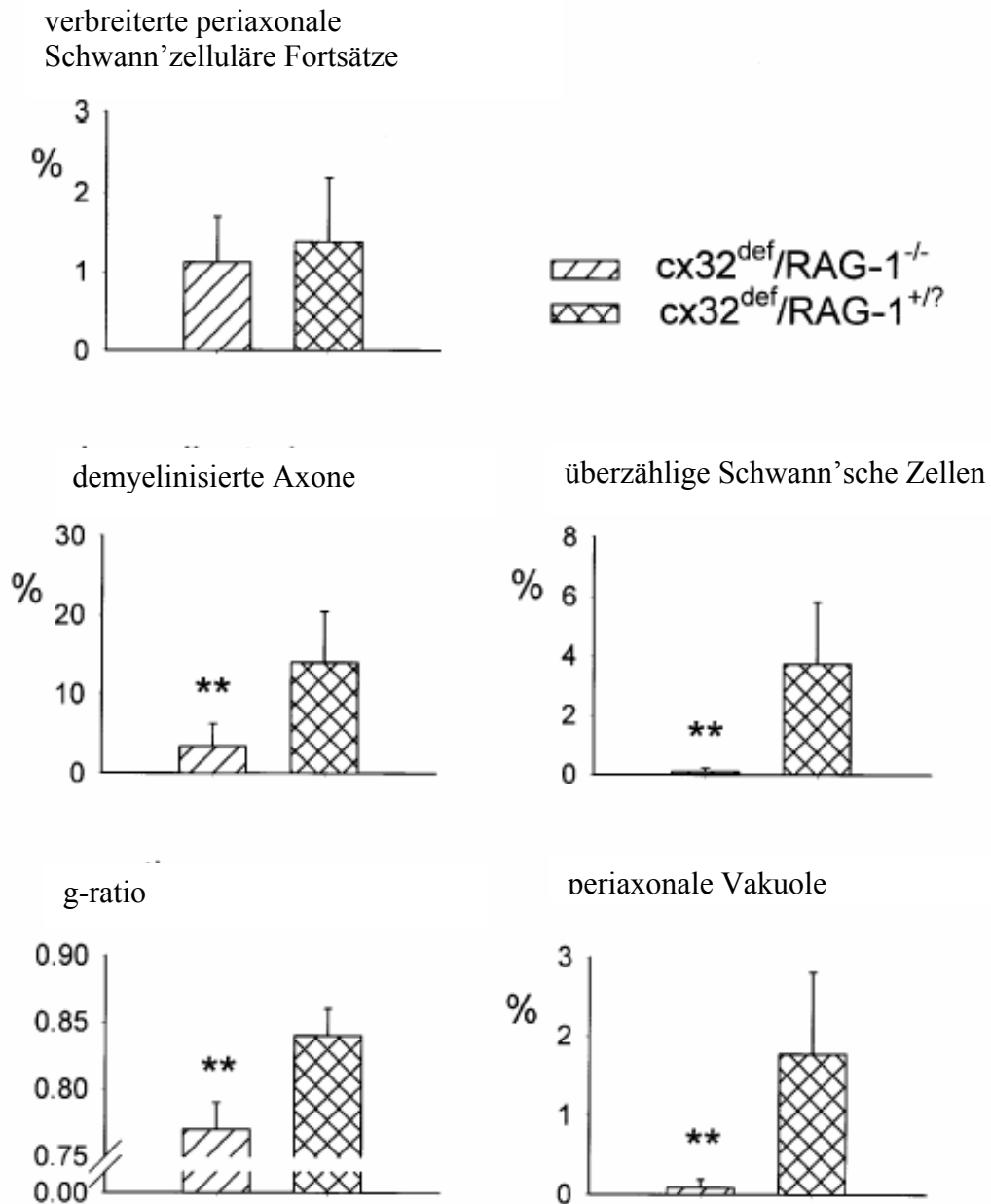
Die Anzahl von verbreiterten periaxonalen Schwann'zellulären Fortsätzen in ventralen Spinalwurzeln war unabhängig vom RAG-1 Genotyp, ebenso wie in Quadricepsnerven. Die Unterschiede im Schweregrad der peripheren Neuropathie in den  $Cx32^{def}/RAG-1^{+/?}$  und  $Cx32^{def}/RAG-1^{-/-}$  Geschwistertieren waren in ventralen Spinalwurzeln sogar noch stärker ausgeprägt als in Quadricepsnerven. Die ventralen Spinalwurzeln von  $Cx32^{def}/RAG-1^{-/-}$  Doppelmutanten wiesen nur milde Anzeichen der Demyelinisierung und Axonopathie auf (Abbildung 17 und 19). Besonders bemerkenswert war eine wesentliche Reduktion der Axone mit erhöhter Neurofilamentdichte ( $> 450 \text{ Nf}/\mu\text{m}^2$ ) und periaxonalen Vakuolen in  $Cx32^{def}/RAG-1^{-/-}$  Doppelmutanten.



**Abbildung 18.** Elektronenmikroskopische Quantifizierung der pathologischen Merkmale (A) und der Verteilung der axonalen Umfänge (B) in Quadricepsnerven von *Cx32* und *RAG-1* Doppelmutanten, M, SD; in jeder Genotypgruppe  $n=5$  (A) und  $n=3$  (B).

(A) \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , Mann-Whitney U-Test;

(B) *RAG-1* Defizienz in *Cx32*<sup>def</sup> Mäusen führt zu einer Verminderung des Anteils von kleineren Axonen (Umfang 5-15  $\mu\text{m}$ ) und zum Anstieg des Anteils von mittelgroßen Axonen (Umfang 20-25  $\mu\text{m}$ ) ( $p < 0.0001$ , Mann-Whitney U-Test). Desweiteren sind große Axone (Umfang 40-50  $\mu\text{m}$ ) in *Cx32*<sup>def</sup>/*RAG-1*<sup>-/-</sup> aber nicht in *Cx32*<sup>def</sup>/*RAG-1*<sup>+/?</sup> Mäusen nachweisbar. Es gibt keine Unterschiede zwischen Axonengrößenverteilung in *Cx32*<sup>wt</sup>/*RAG-1*<sup>+/?</sup> und *Cx32*<sup>wt</sup>/*RAG-1*<sup>-/-</sup> Mäusen (Kolmogorov-Smirnov Test).



**Abbildung 19.** Elektronenmikroskopische Quantifizierung der pathologischen Merkmale in ventralen Spinalwurzeln von  $Cx32^{def}/RAG-1^{+/?}$  und  $Cx32^{def}/RAG-1^{-/-}$  Mäusen. M, SD,  $n=5$ , \*\*  $p < 0.01$ , Mann-Whitney U-Test.

Außer verbreiterten periaxonalen Schwann'zellulären Fortsätzen, sind alle pathologische Eigenschaften in  $Cx32^{def}/RAG-1^{-/-}$  Mäusen im Vergleich mit  $Cx32^{def}/RAG-1^{+/?}$  Geschwistertieren reduziert.

## 4. Diskussion der Ergebnisse

### 4.1. Sekundäre Immunreaktion bei genetisch vermittelter Demyelinisierung in Mausmodellen von CMT1

In unserer Arbeit konnten wir in demyelinisierten Nerven des Mausmodells von CMT1X enge räumliche Kontakte zwischen Makrophagen und pathologisch veränderten Nervenfasern nachweisen. Beim Vergleich zwischen immundefizienten  $Cx32^{\text{def}}/RAG-1^{-/-}$  Doppelmutanten und  $Cx32^{\text{def}}/RAG-1^{+/?}$  Geschwistertieren mit intaktem Immunsystem konnten wir auch eine signifikante Korrelation zwischen dem Schweregrad der peripheren Neuropathie und der Anzahl von Makrophagen und CD8+ T-Zellen zeigen. Da RAG-1-Defizienz selbst keinen wesentlichen Effekt auf das periphere Nervensystem hat (Rambukkana et al., 2002), spielen die Immunzellen folglich eine wichtige Rolle bei peripherer Demyelinisierung im untersuchten Mausmodell von CMT1X.

Vergleichbare Ergebnisse sind schon für  $P0^{+/-}$  Mäuse bekannt, die als Modell für eine andere Subform von CMT, CMT1B, dienen (Schmid et al., 2000; Carenini et al., 2001).

Endoneurale Makrophagen und T-Zellen können bei erworbenen immunvermittelten peripheren Neuropathien wie beim Guillain-Barre Syndrom und dem korrespondierenden Tiermodell, der experimentellen allergischen Neuritis, die Nervenfasern beschädigen (Hartung et al., 1998 b,c; Gold et al., 1999). Im letzten Fall dringen zuerst, noch vor der Entwicklung der klinischen Anzeichen, die aktivierten CD4+ T-Lymphozyten in den peripheren Nerven ein. Bei der Wechselwirkung dieser CD4+ T-Lymphozyten mit antigenpräsentierenden endoneuralen Makrophagen entwickelt sich eine inflammatorische Reaktion und Zytokine, wie Interleukin-2 (IL-2), Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) und Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) werden freigesetzt (Hartung et al., 1998a,b; Gold et al., 1999; Mäurer et al., 2002). Dies führt zur Hochregulation von endothelialen Zytokinen wie IP-10 (Interferon- $\gamma$  induzierbares Protein 10 KDa; Kieseier et al., 2002) und Adhäsionsmolekülen wie VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule; Jander et al., 1996) sowie Öffnung der Blut- Nervenschranke mit weiterer Invasion und Aktivierung von T-Zellen und Monozyten. Aktivierte Makrophagen produzieren zytotoxische Faktoren wie freie Radikale, NO, Prostaglandine und Zytokine. Einen Beitrag zu dieser Pathologie können auch zytotoxische CD8+

Lymphozyten unter Einbindung der Perforin- Granzyme und/oder des Fas-FasL Systemen leisten (Neumann et al., 2002; Trapani und Smyth, 2002). Die Funktionen dieser Zellen sind bei der EAN jedoch noch nicht vollständig geklärt, da CD8<sup>+</sup> T-Zellen in den betroffenen Nerven in der Genesungsphase dominieren (Hartung et al., 1993; Mäurer et al., 2002).

Bei Modellen für angeborene periphere Neuropathien sind Immunzellen ebenfalls involviert. Jedoch bestehen im Vergleich zu erworbenen Neuropathien deutliche Unterschiede. So ist die Erhöhung der endoneuralen Makrophagenzahl die erste erkennbare zelluläre Veränderung in P0<sup>+/-</sup> und Cx32<sup>def</sup> Mutanten (Schmid et al., 2000; Kobsar et al., 2002). Eine signifikante Steigerung der Anzahl von endoneuralen T-Zellen ist erst später, im Alter von 6-8 Monaten, zu beobachten.

Die genaue Sequenz von zellulären und molekularen Ereignissen, die von genetisch bedingten Myelinschäden zur Aktivierung und Erhöhung der Anzahl von endoneuralen Makrophagen führt, ist unbekannt. Wir vermuten, daß die Schwann'schen Zellen diesen Prozeß wesentlich beeinflussen. Die Schwann'schen Zellen erfahren eventuell durch das Cx32- oder P0-Defizit einen physiologischen Stress, der sich ultrastrukturell durch geschwollene periaxonale Schwann'zelluläre Fortsätze (periaxonal collars) bzw. Myelindekompaktierung widerspiegelt (Martini et al., 1995; Anzini et al., 1997). Durch diese Situation könnten unbekannte intrazelluläre Signale induziert werden, welche die Sekretion von Chemokinen/ Zytokinen durch Schwann'sche Zellen verursachen und dadurch Immunzellen anlocken und aktivieren. Ein möglicher Kandidat hierfür ist MCSF (macrophage colony stimulating factor), weil bei seiner Abwesenheit die Makrophagenanzahl in demyelinisierten Nerven von P0<sup>+/-</sup> Mäusen nicht ansteigt (Carenini et al., 2001). Auch Chemokine, insbesondere MCP-1 (Monocyte chemoattractant proteine -1), sind mögliche Kandidaten. MCP-1 gehört zu den Agonisten der G-Protein- gebundenen Rezeptoren (GPCRs, wobei CCR2 nach Boring et al. (1997) der wichtigste ist), die in Zellen die MAPK (mitogen aktivated protein kinase)-Kaskade aktivieren (Marinissen und Gutkind, 2001). In Schwann'schen Zellen wird bei Nervenverletzung MCP-1 hochreguliert (Taskinen und Roytta, 2000; Subang und Richardson, 2001; Tofaris et al., 2002). Drei Subfamilien von MAP-Kinasen wie ERK 1/2 (extracellular signal-regulated kinase), JNKs (c-Jun amino terminal kinases) und p38 können bei unterschiedlicher Stimulation phosphoryliert werden und in dieser aktivierten Form an unterschiedlichen zellulären Prozessen wie Proliferation, Differenzierung, Apoptose u.a. teilnehmen (Marinissen und Gutkind, 2001; Pierce et

al., 2002). Ashida et al., (2001) wiesen eine Beteiligung der MAPK-Kaskade in MCP-1 induzierter Adhäsion (ERK) und Chemotaxis (p38) von Monozyten nach. Unpublizierte Befunde von S. Fischer zeigen am Anfang der peripheren Demyelinisierung in P0<sup>+/-</sup> Mäusen (im Alter von 1-2 Monaten) eine Hochregulierung von phosphorylierten MEK1/2 und ERK (MAPK/ERK Kinasen), was zur Aktivierung von immunregulatorischen Transkriptionsfaktoren wie NF(nuklear factor)-kappaB oder AP-1 führen kann (Roebuck et al., 1999; Schwarz et al., 2002). Einen Monat später ist eine endoneurale Hochregulierung von MCP-1 mRNA (C. Kleinschnitz, unpublizierte Befunde) und STAT (signal transducers and activators of transcription) Proteinen nachweisbar. Mellado et al. (1998) haben in mit MCP-1 aktivierten Monozyten die Hochregulation von JAK/STAT Proteinen beschrieben. Die zelluläre Lokalisation dieser Proteine in demyelinisierten Nerven von untersuchten CMT1 Mausmodellen ist bisher nicht bekannt. Wir vermuten, daß diese endoneuralen molekularen Veränderungen die demyelinisierungsbedingten zellulären Stressreaktionen und die anschließende Aktivierung von endoneuralen Immunzellen widerspiegeln.

#### **4.2. Potentielle Rolle der T-Lymphozyten als Immunmodulatoren**

Die Verkreuzung von P0<sup>+/-</sup> (Schmid et al., 2000) und Cx32<sup>def</sup> Myelinmutanten mit RAG-1-defizienten Mäusen führt zu einer Abmilderung der peripheren Neuropathie. Vergleichbare Ergebnisse haben Schmid et al. (2000) auch bei der Verkreuzung der P0<sup>+/-</sup> Myelinmutanten mit Mäusen, die ein Defekt in T-Zellen-Rezeptor- $\alpha$  (TCR- $\alpha$ ) beinhalten, erhalten. Die Population von  $\alpha\beta$  T-Lymphozyten beinhaltet CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen. In P0<sup>+/-</sup> und Cx32<sup>def</sup> Myelinmutanten treten CD4<sup>+</sup> Lymphozyten in peripheren Nerven praktisch nicht auf. CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden in demyelinisierten peripheren Nerven von beiden Mausmodellen (CMT1B und CMT1X) nachgewiesen, aber ihre Anzahl ist 15-20 mal niedriger als die Anzahl endoneuraler Makrophagen (Schmid, 2000; Kobsar et al., 2002, 2003). Die Zunahme von CD8<sup>+</sup> T-Zellen ist in peripheren Nerven von beiden Myelinmutanten 3-4 Monate später als die Hochregulation von Makrophagen nachweisbar.

Unter pathologischen Umständen wie Nervenverletzung (Taskinen und Roytta, 2000) oder bei einer erworbenen autoimmunen Neuropathie (Kieseier et al., 2002) können die endoneuralen Makrophagen chemoattraktive Chemokine wie RANTES (regulated on activation, normal T-express and secreted) oder MIPs (Macrophage inflammatory

proteins) exprimieren und dadurch CD8<sup>+</sup> T-Zellen anlocken. Makrophagen können CD8<sup>+</sup> T-Zellen Myelinantigene im Kontext mit MHC-I Molekülen präsentieren; diese CD8<sup>+</sup> Zellen können sich dann entweder in Effektor- oder in immunregulatorische Zellen differenzieren (Hartung et al., 1998a) und wiederum Anzahl und Aktivierungszustand der Makrophagen beeinflussen (Hartung et al., 1998a,c). Martini und Toyka (2004) begründen diese Hypothese mit der Beobachtung, daß in peripheren Nerven der RAG-1-defizienten Myelindoppelmutanten (Schmid et al., 2000; Kobsar et al., 2003) nicht nur CD8<sup>+</sup>T-Lymphozyten fehlen, sondern auch die Anzahl von Makrophagen wesentlich reduziert ist.

Andererseits reagieren die Splenozyten von 8 Monate alten P0<sup>+/-</sup> Mäusen mit stärkerer Proliferation auf Myelinkomponenten als Splenozyten von Wildtyp Geschwistertieren (Schmid et al., 2000). Im Patienten mit CMT1 sind aktivierte, myelinspezifische T und B-Lymphozyten sowohl in Blut (Solders et al. 1992; Williams et al., 1987; 1993) als auch in Knochenmark und Liquor (Solders et al. 1992) nachweisbar. Folglich darf die exoneurale zentrale Immunregulation der peripheren Demyelinisierung in P0<sup>+/-</sup> und Cx32<sup>def</sup> Mäusen nicht vernachlässigt werden.

Von wesentlicher praktischer Bedeutung ist die Frage, ob Lymphozyten die Aktivität der Makrophagen exo- oder endoneural modulieren, hier sind jedoch noch weitere Experimente notwendig.

### **4.3. CD34<sup>+</sup> Fibroblasten/Fibrozyten als mögliche zusätzliche Immunmodulatoren**

Wir haben in demyelinisierenden Nerven von P0<sup>+/-</sup> Myelinmutanten eine Hochregulation von CD34<sup>+</sup>/PDGFR $\alpha$ <sup>+</sup> Fibroblasten/Fibrozyten nachgewiesen (Mäurer et al., 2003). Enge Zell-Zell Fibroblasten-Makrophagen Kontakte haben wir mit Immunelektronenmikroskopie auch in Cx32-defizienten Mäusen beobachtet.

Welche molekularen Ereignisse den endoneuralen Fibroblasten-Makrophagen Kontakten zugrunde liegen ist bisher unbekannt.

Fibroblasten können in vivo bei manchen Pathologien wie rheumatoider Arthritis (Komuro et al., 2001; Buckley et al., 2004; Nanki et al., 2004; Saidenberg-Kermanach et al., 2004), autoimmuner Thyreoiditis (Hofbauer et al., 2002), Herzfibrose (Clancy et al., 2004), chronischer Darmentzündung (Ashcroft et al., 2003; Franchimont et al.,



2004) u.a. oder *in vitro* mit proinflammatorischen Zytokinen (IL-1, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) aktiviert werden. Aktivierte Fibroblasten können Makrophagen anlockende und aktivierende Substanzen, wie MCP-1 (Jeong et al., 2004), MCS-F (Udagawa et al., 1990; Yoshida et al., 1990), MIP-1 $\alpha$  (Min et al., 2004), MIP-3 $\alpha$  (Ruth et al., 2003), LIF (leukemia inhibitory factor; Subang und Richardson, 2001), RANKL (ligand of receptor for activation of nuclear factor kappa B (Lacey et al., 1998), sowie Zytokine wie TNF- $\alpha$ , Interleukin-1 $\beta$  und Interleukin-6 (Murwani and Armati, 1998; Neumann et al., 2004) produzieren und/oder durch interzelluläre Kontakte die *in vitro* Produktion dieser Chemo- und Zytokine in Makrophagen stimulieren (Steinhauser et al., 1998; Neumann et al., 2004). Nach peripheren Nervenverletzungen ist die Produktion von MCP-1 and MIP-1 $\alpha$  in endoneuralen Fibroblasten nachweisbar (Taskinen und Roytta, 2000).

Fibroblasten können durch Ausschüttung von Zytokinen, wie Osteoprotegerin (Simonet et al., 1997; Collin-Osdoby, 2004) und IL-10 (Min et al., 2002), Entzündungsreaktionen modulieren.

Die Interaktion zwischen Fibroblasten und Makrophagen sowie von Fibroblasten produzierte Zytokine, wie Osteoprotegerin, spielen außer in der Pathologie auch eine Rolle in der Organogenese, wie in der Osteogenese (Kong et al., 1999; Teitelbaum, 2000), der adulten Neurogenese (in Ratten, Mercier et al. 2002), der Entwicklung des lymphatischen Systems (Kong et al., 1999; Nishikawa et al., 2000) und der Brustdrüse (Srivastava et al., 2003).

Für den Aufbau interzellulärer Kontakte exprimieren Fibroblasten Zelladhäsionsmoleküle (CAM) wie VCAM-1/CD106 (vaskuläre CAM), welches mit Makrophagen- VLA-4 (very late antigen-4, Integrin  $\alpha$ 4 $\beta$ 1) interagiert (Nishikawa et al., 2000; Neumann et al., 2004).

Fibroblasten und Schwann'sche Zellen, die Hauptproduzenten der endoneuralen extrazellulären Matrix (ECM; Chernousov und Carey, 2000; Dubovy et al., 2004), könnten durch Modulierung der ECM- Komponenten auch die Mobilität von Immunzellen beeinflussen. In Suralisnerven von Patienten mit CMT1 (Palumbo et al., 2002) und in einem PMP-22-defizienten Mausmodell von CMT1A (Misko et al., 2002) sind der Gehalt und die Verteilung von Kollagen IV und anderen ECM Komponenten in Vergleich zu Kontrolldaten deutlich verändert. Kollagen IV ermöglicht die Mobilität

von Immunzellen durch ECM bei Interaktion mit ihren VLA-1 (very late antigen-1, Integrin  $\alpha 1\beta 1$ ; Ben-Horin und Bank, 2004).

Eine besondere Zellsubpopulation von Fibroblasten, so genannte Fibrozyten, die ca. 0.1-0.5% der leukozytären Bestandteile des peripheren Blutes ausmacht, besitzt auch antigenpräsentierende Eigenschaften (Bucala et al., 1994; Quan et al., 2004). Fibrozyten sind durch die Expression von Kollagen I, MHC II, dem hämatopoetischen Stammzellmarker CD34 und dem kostimulatorischen Protein CD86 (Chesney et al., 1997) charakterisiert. Im Blut zirkulierende Fibrozyten können in Bereichen von Wundheilung (Abe et al., 2001) und Gewebsverletzung bei autoimmunen (Schmidt et al., 2003) oder chronischen inflammatorischen (Barth et al., 2002) Erkrankungen migrieren. MHC-II+ Fibroblasten sind in Suralisnervenbiopsien von Patienten mit CMT nachweisbar (Sommer und Schröder, 1995; Stoll et al., 1998).

Als möglicher chemoattraktiver Faktor für Fibrozyten ist TGF (transforming growth factor)- $\beta 1$  beschrieben (Abe et al., 2001). TGF- $\beta 1$  wird von Schwann'schen Zellen exprimiert (McLennan und Koishi, 2002) und ist sowohl in die axon- gliale Wechselwirkung (Einheber et al., 1995) und in Myelinerhaltung (Day et al., 2003), als auch in die Interaktion zwischen Schwann'schen- und Immunzellen bei Nervenverletzung (Rufer et al., 1994) und Inflammation (Kieseier et al., 2000) involviert.

Die Literaturangaben über die Funktion der CD34+ Fibrozyten sind bisher sehr eingeschränkt. Wir vermuten, daß die CD34+ Fibroblasten eine Rolle in der Pathogenese in Mausmodellen von CMT1X und CMT1B spielen (Mäurer, 2002, 2003).

#### **4.4. Bedeutung unserer Untersuchung im Hinblick auf die Pathogenese und therapeutischen Optionen bei CMT1 in Menschen**

Bisher fehlen effektive kausale Behandlungsmethoden für CMT. Eine Gentherapie, bei der mutierte Myelogene durch die Einbringung von Wild-Typ Genen ersetzt werden sollen (Guenard et al., 1999), trifft auf eine Reihe konzeptioneller Probleme: Nur wenige CMT Formen werden von Null-Mutationen hervorgerufen. Pathologische Veränderungen beruhen häufig auf einem dominant negativen Effekt eines veränderten Genproduktes (Kirschner und Saavedra, 1994; Martini et al., 1995a; Wong und Filbin, 1996; Shy et al., 2004), wie wir es auch in einem Modell der tomakulärem Subform

(Gabreels-Festen et al., 1996) von CMT1B beobachtet haben (Rünker et al., 2004). Bisher gibt es keine Möglichkeiten die Expression eines mutierten Genes in allen Schwann'schen Zellen zu hemmen oder ein normales Myeligen in das Genom einzubauen, um dadurch die Produktion der richtigen Dosis des entsprechenden Myelinproteins zu gewährleisten. Sogar wenn diese Probleme gelöst würden, muß man die Vielfalt der mit CMT verbundenen Mutationen beachten, wo jeder Fall ein unterschiedliches gentherapeutisches Verfahren erfordert.

Sereda et al. (2003) haben eine Korrelation zwischen Schweregrad der peripheren angeborenen Neuropathie und dem Progesterongehalt beschrieben. Die dieser Arbeit zugrundeliegende Eigenschaft des Progesterons, die Expression von P0 und PMP22 Genen in kultivierten Schwann'schen Zellen zu regulieren, haben die Autoren auch in vivo in einem PMP22 überexprimierenden Rattenmodell der CMT1A nachgewiesen. In diesem Rattenmodell hatte der Progesteronantagonist Onapristone eine klinische und morphologische Abmilderung der peripheren Neuropathie hervorgerufen. Die Daten von Sereda et al. (2003) zeigen, daß der Progesteronrezeptor der myelinisierenden Schwann'schen Zellen als ein versprechendes pharmakologisches Ziel betrachtet werden kann.

Passage et al. (2004) haben die Abmilderung einer peripheren Neuropathie nach Behandlung mit Ascorbinsäure in einem Mausmodell von CMT1A mit Überexpression von PMP-22 beobachtet. Die Autoren erklären ihre Ergebnisse mit der modulierenden Wirkung von Vitamin C auf die Biosynthese von PMP-22. Jedoch sind bei diesem Ansatz noch viele offene Fragen zu klären. So unterscheidet sich der Ascorbinsäure-Metabolismus der Maus von dem des Menschen: Mäuse können, im Gegensatz zu Menschen, Ascorbinsäure selbst synthetisieren (Smirnoff, 2001).

Sowohl Befunde unserer Arbeitsgruppe (Schmid et al., 2000; Carenini et al., 2001; Mauerer et al., 2001, 2002, 2003; Kobsar et al., 2002, 2003) als auch Literaturdaten über degenerative Erkrankungen des Nervensystems in anderen Mausmodellen (Matsushima et al., 1994) und in Menschen (Dunne, 1993; Arahata, 1995; McGuinness et al., 1995; Klein et al., 2002) weisen oft auf die pathogenetische Beteiligung des Immunsystems hin.

Martini und Toyka (2004) referieren über Subformen der CMT mit Komponenten der CIDP. Diese Komponenten umfassen für CMT atypische Symptome, wie plötzliche schnelle Progression der Neuropathie, asymmetrische oder proximale Muskelschwäche,

Parästhesien, Schmerzen und epi-perineurale oder perivaskuläre inflammatorische Zellinfiltrate in Suralisnervenbiopsien (Dyck et al., 1982; Crawford und Griffin, 1991; Reilly et al., 1998; Malandrini et al., 1999; Rajabally et al., 2000; Donaghy et al., 2000; Watanabe et al., 2002; Vital et al., 2003; Ginsberg et al., 2004). In den Fällen, in denen Immunzellen analysiert worden waren, war die Anzahl von CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten im peripheren Nerven erhöht. Im Gegensatz zu den „typischen“ Formen der CMT, respondierte die Patienten mit oben genannter Subform positiv auf anti-inflammatorische Behandlungsversuche. Im Ganzen zeigten sie klinische und zytomorphologische Ähnlichkeiten der peripheren Neuropathie mit erworbenen inflammatorischen Neuropathien wie CIDP und GBS.

Die Abwesenheit der positiven Wirkung von anti-inflammatorischen Therapeutika wie Cortikosteroiden bei den meisten CMT1 Patienten, ebenso wie bei unserem Mausmodell der CMT1B (Martini und Toyka, 2004) kann durch relative Resistenz von CD8<sup>+</sup> T-Zellen gegen Cortikosteroide (Leussink et al., 2001) erklärt werden. Andererseits ist es möglich, daß residente endoneurale Makrophagen, die im Vergleich zu hämatogenen Monozyten genauso aktiv an peripherer Demyelinisierung von P0<sup>+/-</sup> Mäusen teilnehmen (Mäurer et al., 2003), schwieriger für Cortikosteroide erreichbar sind (Martini und Toyka, 2004).

Die periphere Myelinpathologie der untersuchten P0<sup>+/-</sup> und Cx32<sup>def</sup> Myelinmutanten ähnelt jedoch dem morphologischen Bild in Suralisnerven der Patienten mit entsprechenden Formen von CMT1 (Martini, 1997). Auch die elektronenmikroskopischen Anzeichen einer Beteiligung der phagozytierenden Makropagen an der Demyelinisierung bei menschlicher CMT (Vital et al., 1992; Gabreels-Festen et al., 2002) gleichen den entsprechenden endoneuralen Profilen von P0<sup>+/-</sup> oder Cx32<sup>def</sup> Mäusen. Einzelne Untersuchungen der Makrophagenanzahl in Suralisnerven von Patienten mit CMT1A (Stoll et al., 1998) ohne CIDP-ähnliche Anzeichen weisen auf eine Hochregulierung und Aktivierung von endoneuralen Makrophagen, vergleichbar zu immunhistochemischen Befunden in P0<sup>+/-</sup> oder Cx32<sup>def</sup> Myelinmutanten, hin. Folglich können wir vermuten, daß in den meisten Varianten von CMT1 und in den untersuchten Mausmodellen andere Mechanismen die Aktivität und Funktion endoneuraler Immunzellen regulieren, als bei CIDP und der CIDP-ähnlichen Form von CMT1. Beispielsweise haben wir in einem Mausmodell des Dejerine-Sottas Syndroms, P0<sup>-/-</sup> Mäusen, gezeigt, daß die RAG-1 Defizienz sich auch negativ auf demyelinisierte periphere Nerven auswirken kann (Berghoff et al., 2005). Generell

können die Immunzellen neurotrophe Faktoren wie nerve growth factor (NGF) und BDNF (brain derived neurotrophic factor) produzieren (Kerschensteiner et al., 2003), die ihrerseits das Überleben von Neuronen nach neuronalem Trauma oder Degeneration unterstützen können (Kermer et al., 2000; Guillin et al., 2001).

Die vorliegenden Ergebnisse unterstreichen die Notwendigkeit einer weiterführenden Untersuchung der Interaktion zwischen endoneuralen Glia- und Immunzellen bei angeborenen CMT Neuropathien. Nur ausführliche Erkenntnisse über Signalkaskaden und Immunreaktionen in peripheren Nerven von Mausmodellen und Patienten mit CMT1 können uns zu wirkungsvollen Behandlungsverfahren führen.

## 5. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war, zu untersuchen, ob Immunzellen den Schweregrad einer peripheren Neuropathie im Mausmodell von CMT1X (Cx32<sup>def</sup> (Cx32-defiziente) Maus) beeinflussen können. Mit Hilfe von immunhistochemischen Färbemethoden, lichtmikroskopischen, immunelektronenmikroskopischen und computergestützten konventionellen elektronenmikroskopischen Auswertungsverfahren wurde die Anzahl von endoneuralen Makrophagen und CD8<sup>+</sup> T-Zellen, sowie die Morphologie von Quadricepsnerven und ventralen Spinalwurzeln analysiert..

Aufgrund der vorliegenden Ergebnissen können dabei folgende Aussagen getroffen werden:

1. Makrophagen und CD8<sup>+</sup> T-Zellen sind in Quadricepsnerven von Cx32-defizienten Mäusen hochreguliert, wobei die Anzahl der endoneuralen Makrophagen die Anzahl der CD8<sup>+</sup> T-Zellen wesentlich übersteigt. Die Anzahl war altersabhängig und korrelierte mit dem Schweregrad des pathomorphologischen Bildes der peripheren Neuropathie.
2. Mit Immunelektronenmikroskopie haben wir eindeutig identifizierbare endoneurale Makrophagen innerhalb der endoneuralen Röhren in engem Kontakt zu demyelinisierten oder in Demyelinisierung begriffenen Axonen nachgewiesen. Endoneurale Makrophagen enthielten häufig Reste von phagozytiertem Myelin.
3. Bei Immun- und konventioneller Elektronenmikroskopie haben wir häufig ausgeprägte Kontakte zwischen Makrophagen und Fibroblasten beobachtet.
4. In Cx32<sup>def</sup>/RAG-1<sup>-/-</sup> Doppelmutanten, die zusätzlich zu der Myelinmutation auch keine reifen Lymphozyten beinhalten, ist eine signifikant geringere Hochregulation der Anzahl von endoneuralen Makrophagen nachweisbar, ebenso eine wesentliche Abmilderung der pathologischen Veränderungen von Quadricepsnerven und ventralen Spinalwurzeln im Vergleich zu Cx32<sup>def</sup>/RAG-1<sup>+/?</sup> Geschwistertieren.

Diese Ergebnisse lassen die Schlußfolgerung zu, daß Makrophagen und CD8<sup>+</sup> T-Zellen die primär genetisch-bedingte Demyelinisierung im Mausmodell für CMT1X wesentlich verstärkend beeinflussen. Aufgrund der ähnlichen Literaturdaten über das Mausmodell von CMT1B (P0<sup>+/-</sup> Mutante) können wir vermuten, daß die Interaktion zwischen Schwann- und Immunzellen eine wichtige Komponente der peripheren Demyelinisierung in Mausmodellen für CMT1 ist.

## 6. Glossar

BDNF	brain derived neurotrophic factor
CAM	cell adhesion molecule
CH	kongenitale Hypomyelinisierung
CIDP	chronic inflammatory demyelination polyneuropathy
CMT	Charcot-Marie-Tooth (Neuropathie oder Krankheit)
Cx32	Connexin-32
Cx23 <sup>def</sup>	Cx32-defiziente (Maus)
DAB	3,3 Diaminobenzidin-tetrachlorid Dihydrat
DSS	Déjérine-Sottas Syndrom
F4/80	makrophagales Antigen
FACS	fluorescence activated cell sorting
GJB1	gap junction Protein B1 (Connexin 32)
GPCR	Agonist der G-Protein- gebundenen Rezeptoren
HMN	hereditäre motorische Neuropathie
HMSN	hereditären motorisch-sensiblen Neuropathie(n)
HNPP	hereditary neuropathy with a liability to develop pressure palsies
HSAN	hereditäre sensible/ autonome Neuropathie
HSN	hereditäre sensible Neuropathie
EGR2	early growth response 2
ERK 1/2	extracellular signal-regulated kinase

IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IP-10	Interferon- $\gamma$ induzierbares Protein 10 KDa
JNKs	c-Jun amino terminal kinases
KIF1b	Kinesin Isoform 1B
LIF	leukemia inhibitory factor
LMNA	Lamin A/C
M $\pm$ SD	Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung
MAPK	mitogen activated protein kinase
MCP	monocyte chemoattractant protein
MCSF	macrophage colony stimulating factor
MHC	major histocompatibility complex
MIP	macrophage inflammatory protein
MPZ	Myelin Protein Zero
NEFL	neurofilament-light chain
NGF	nerve growth factor
NF-Dichte	Neurofilamentdichte
NF-kappaB	nuklear factor-kappaB
NLG	Nervenleitgeschwindigkeit
P0	Myelin Protein Zero
P0 <sup>+/-</sup>	P0-heretozygot defiziente (Maus)
P0 <sup>-/-</sup>	P0-homozygot defiziente (Maus)



PDGFR $\alpha$	platelet derived growth faktor alfa
PMP-22	peripheres Myelinprotein-22 KDa
PNS	peripheres Nervensystem
RAG-1	recombinant-activating gene-1
RANKL	ligand of receptor for activation of nuclear factor kappa B
RANTES	regulated on activation, normal T express and secreted (chemokin)
TGF- $\beta$ 1	transforming growth factor- $\beta$ 1
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule
VLA	very late antigen
ZNS	zentrales Nervensystem

## 7. Literatur

Abe R, Donnelly SC, Peng T, Bucala R, Metz CN. (2001) Peripheral blood fibrocytes: differentiation pathway and migration to wound sites. *J Immunol.*;166(12):7556-7562.

Abrams CK, Freidin MM, Verselis VK, Bennett MV, Bargiello TA. (2001) Functional alterations in gap junction channels formed by mutant forms of connexin 32: evidence for loss of function as a pathogenic mechanism in the X-linked form of Charcot-Marie-Tooth disease. *Brain Res.*;900(1):9-25

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. *J. Neurosci.* 17: 4545–4551

Arahata K, Isihara T, Fukunaga H, et al. (1995) Inflammatory response in facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD): immunocytochemical and genetic analyses. *Muscle Nerve*;2:S56–66.

Ashcroft AJ, Cruickshank SM, Croucher PI, Perry MJ, Rollinson S, Lippitt JM, Child JA, Dunstan C, Felsburg PJ, Morgan GJ, Carding SR. (2003) Colonic dendritic cells, intestinal inflammation, and T cell-mediated bone destruction are modulated by recombinant osteoprotegerin. *Immunity.*;19(6):849-861.

Ashida N, Arai H, Yamasaki M, Kita T. (2001) Differential signaling for MCP-1-dependent integrin activation and chemotaxis. *Ann N Y Acad Sci.*;947:387-389.

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

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

Barth PJ, Ebrahimsade S, Hellinger A, Moll R, Ramaswamy A. (2002) CD34+ fibrocytes in neoplastic and inflammatory pancreatic lesions. *Virchows Arch.*;440(2):128-133

Ben-Horin S, Bank I. (2004) The role of very late antigen-1 in immune-mediated inflammation. *Clin Immunol.*;113(2):119-129.

- Berghoff M, Samsam M, Muller M, Kobsar I, Toyka KV, Kiefer R, Maurer M, Martini R. (2005) Neuroprotective effect of the immune system in a mouse model of severe dysmyelinating hereditary neuropathy: enhanced axonal degeneration following disruption of the RAG-1 gene. *Mol Cell Neurosci.*; 28(1):118-27.
- Bergoffen J, Scherer SS, Wang S, Scott MO, Bone LJ, Paul DL, Chen K, Lensch MW, Chance PF, Fischbeck KH. (1993). Connexin mutations in X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *Science*, 262:2039-2042.
- Bird T., Ott J. and Giblett E. (1982) Evidence for linkage of Charcot-Marie-Tooth neuropathy to the Duffy locus on chromosome 1. *Am. J. Hum. Genet.* 34: 388–394
- Bird SJ, Sladky JT. (1991). Corticosteroid-responsive dominantly inherited neuropathy in childhood. *Neurology*; 41: 437-439.
- Birouk N, LeGuern E, Maisonobe T, Rouger H, Gouider R, Tardieu S, Gugenheim M, Routon MC, Leger JM, Agid Y, Brice A, Bouche P. (1998) X-linked Charcot-Marie-Tooth disease with connexin 32 mutations: clinical and electrophysiologic study. *Neurology*; 52(2):432-433
- Bondurand N, Girard M, Pingault V, Lemort N, Dubourg O, Goossens M. (2001). Human Connexin 32, a gap junction protein altered in the X-linked form of Charcot-Marie-Tooth disease, is directly regulated by the transcription factor SOX10. *Hum Mol Genet.*;10(24):2783-2795.
- Boring L., Gosling J., Chensue SW. et al. (1997). Impaired monocyte migration and reduced type 1 (Th1) cytokine responses in C-C chemokine receptor 2 knockout mice. *J.Clin. invest.*; 100: 2552-2561.
- Bromberg MB, Swoboda KJ, Lawson VH (2003). Counting motor units in chronic motor neuropathies. *Exp Neurol.*, 184 Suppl 1:53-57.
- Bruzzone R, White TW, Paul DL. (1996). Connections with connexins: the molecular basis of direct intercellular signaling. *Eur J Biochem.*;238(1):1-27.
- Bucala R, Spiegel LA, Chesney J, Hogan M, Cerami A.(1994). Circulating fibrocytes define a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair. *Mol Med.*;1(1):71-81.
- Buckley CD, Filer A, Haworth O, Parsonage G, Salmon M. (2004) Defining a role for fibroblasts in the persistence of chronic inflammatory joint disease. *Ann Rheum Dis.*;63 Suppl 2:ii92-ii95.

Carenini S, Mäurer M, Werner A, Blazyca H, Toyka KV, Schmid CD, et al. (2001). The role of macrophages in demyelinating peripheral nervous system of mice heterozygously deficient in PO. *J Cell Biol*; 152: 301-308.

Castro C, Gomez-Hernandez JM, Silander K, Barrio LC. (1999) Altered formation of hemichannels and gap junction channels caused by C-terminal connexin-32 mutations. *J Neurosci.*;19(10):3752-3760.

Chernousov MA, Carey DJ. (2000) Schwann cell extracellular matrix molecules and their receptors. *Histol Histopathol.*;15(2):593-601

Chesney J, Bacher M, Bender A, Bucala R.(1997). The peripheral blood fibrocyte is a potent antigen-presenting cell capable of priming naive T cells in situ. *Proc Natl Acad Sci USA*; 94(12): 6307-6312.

Clancy RM, Kapur RP, Molad Y, Askanase AD, Buyon JP. (2004) Immunohistologic evidence supports apoptosis, IgG deposition, and novel acrophage/fibroblast crosstalk in the pathologic cascade leading to congenital heart block. *Arthritis Rheum.*;50(1):173-182.

Collin-Osdoby P. (2004) Regulation of vascular calcification by osteoclast regulatory factors RANKL and osteoprotegerin. *Circ Res.*;95(11):1046-1057.

Crawford TO, Griffin JW. (1991) Morphometrical and ultrastructural evaluation of the sural nerve in children with Charcot-Marie-Tooth: implication for pathogenesis and treatment. *Ann Neurol*; 30: 500.

Day WA, Koishi K, McLennan IS.( 2003) Transforming growth factor beta 1 may regulate the stability of mature myelin sheaths. *Exp Neurol*. Dec;184(2):857-864.

De Jonghe P, Timmerman V, Nelis E, Martin JJ, Van Broeckhoven C (1997). Charcot-Marie-Tooth disease and related peripheral neuropathies. *J Peripher Nerv Syst* 2:370-87

de Waegh SM, Lee VM-Y, Brady ST. (1992). Local modulation of neurofilament phosphorylation, axonal caliber, and slow axonal transport by myelinating Schwann cells. *Cell* 68: 451–463.

Donaghy M, Sisodiya SM, Kennett R, McDonald B, Haites N, Bell C. (2000) Steroid responsive polyneuropathy in a family with a novel myelin protein zero mutation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*; 69: 799-805.

- Dubovy P, Svizenska I, Klusakova I. (2002) Computer-assisted quantitative analysis of immunofluorescence staining of the extracellular matrix in rat dorsal and ventral spinal roots. *Acta Histochem.*;104(4):371-374
- Ducy P., Schlinke Th, Karsenty G. (2000) The Osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science*, 289: 1501-1504.
- D'Urso, D., P. Ehrhardt, and H.W. Muller. 1999. Peripheral myelin protein 22 and protein zero: a novel association in peripheral nervous system myelin. *J.Neurosci.* 19:3396–3403.
- Dunne JW. (1993) Neurologic improvement of adrenomyeloneuropathy after steroid replacement therapy. *Muscle Nerve*;16:1133–4.
- Dyck PJ (1966) Histologic measurements and fine structure of biopsied sural nerve: normal, and in peroneal muscular atrophy, hypertrophy neuropathy, and congenital sensory neuropathy. *Mayo Clin Proc* 41:7412-774.
- Dyck P.J. (1993) Neuronal atrophy and degeneration predominantly affecting peripheral sensory and autonomic neurons. In: Dyck P.J., Thomas P.K., Griffin J.W., Low P.A., Poduslo J.F. (eds). *Peripheral Neuropathy* 3rd ed. Saunders, Philadelphia, pp. 1065-1093
- Dyck P.J., Chance P., Lebo R., Carney J.A. (1993) Hereditary motor and sensory neuropathies. In: Dyck P.J., Thomas P.K., Griffin J.W., Low P.A., Poduslo J.F. (eds). *Peripheral Neuropathy* 3rd ed. Saunders, Philadelphia, pp 1094-1136
- Dyck PJ, Lambert EH (1968). Lower motor and primary sensory neuron diseases with peroneal muscular atrophy. I. Neurologic, genetic and electrophysiologic findings in hereditary polyneuropathies. *Arch Neurol* 18:603-618
- Dyck PJ, Swanson CJ, Low PA, Bartleson JD, Lambert EH. (1982) Prednisoneresponsive hereditary motor and sensory neuropathy. *Mayo Clin Proc*; 57: 239-246.
- Edwards JC. (2000) Fibroblast biology. Development and differentiation of synovial fibroblasts in arthritis *Arthritis Res.*;2(5):344-347.
- Einheber S, Hannocks MJ, Metz CN, Rifkin DB, Salzer JL. . (1995) Transforming growth factor-beta 1 regulates axon/Schwann cell interactions. *J Cell Biol* Apr;129(2):443-458.

- Evgrafov OV, Mersiyanova I, Irobi J, Van Den Bosch L, Dierick I, Leung CL, Schagina O, Verpoorten N, Van Impe K, Fedotov V, Dadali E, Auer-Grumbach M, Windpassinger C, Wagner K, Mitrovic Z, Hilton-Jones D, Talbot K, Martin JJ, Vasserman N, Tverskaya S, Polyakov A, Liem RK, Gettemans J, Robberecht W, De Jonghe P, Timmerman V. (2004) Mutant small heat-shock protein 27 causes axonal Charcot-Marie-Tooth disease and distal hereditary motor neuropathy. *Nat. Genet.*; 36(6):602-606.
- Flügel A, Matsumoto K, Neumann et al. (2001). Antiinflammatory activity of nerve growth factor in experimental autoimmune encephalomyelitis: inhibition of monocyte transendothelial migration. *Eur J Immunol*, 31: 11-22.
- Franchimont N, Reenaers C, Lambert C, Belaiche J, Bours V, Malaise M, Delvenne P, Louis E. (2004) Increased expression of receptor activator of NF-kappaB ligand (RANKL), its receptor RANK and its decoy receptor osteoprotegerin in the colon of Crohn's disease patients. *Clin Exp Immunol.*;138(3):491-498.
- 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. *J Neurosci.*;19(14):6058-6067.
- Friede RL. (1972) Control of myelin formation by axon caliber (with a model of the control mechanism). *J Comp Neurol*; 144: 233-252.
- French-Constant C, Colognato H, Franklin RJM (2004). The mysteries of myelin unwrapped. *Nature*, 304, 688-689.
- Gabriel CM, Gregson NA, Wood NW, Hughes RAC. (2002). Immunological study of hereditary motor and sensory neuropathy type 1a (HMSN1a). *J Neurol Neurosurg Psychiatry*; 72: 230-235.
- Gabreels-Festen AA, Joosten EMG, Gabreels FJM, Jennekes FGI, Janssen-van Kempen TW. (1992). Early morphological features in dominantly inherited demyelinating motor and sensory neuropathy (HMSN type 1). *J Neurol Sci*;107:145–154.
- Gabreels-Festen AA, Gabreels FJ, Hoogendijk JE, Bolhuis PA, Jongen PJ, Vingerhoets HM. (1993). Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy or hereditary motor and sensory neuropathy? Diagnostic value of morphological criteria. *Acta Neuropathol (Berl)*; 86: 630-635
- Gabreels-Festen, A.A., J.E. Hoogendijk, P.H. Meijerink, F.J. Gabreëls, P.A. Bolhuis, S. van Beersum, T. Kulkens, E. Nelis, F.G. Jennekens, M. de Visser, et al. (1996). Two

divergent types of nerve pathology in patients with different P0 mutations in Charcot-Marie-Tooth disease. *Neurology*. 47:761–765

Gemignani F, Melli G, Alfieri S, Inglese C, Marbini A. (2004) Sensory manifestations in Charcot-Marie-Tooth disease. *J Peripher Nerv Syst*; 9: 7–14.

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.

Ginsberg L, Malik O, Kenton AR, Sharp D, Muddle JR, Davis MB, Winer JB Orrell RW, King RHM (2004). Coexistent hereditary and inflammatory neuropathy. *Brain*, 127, 1-10.

Gold R, Archelos JJ, Hartung H-P. (1999) Mechanisms of immune regulation in the peripheral nervous system. [Review]. *Brain Pathol* 9: 343-360.

Greenberg F, Patel PI (1992). Gene dosage is a mechanism for Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Nat Genet.*, 1(1):29-33

Greenfield S, Brostoff S, Eylar EH, Marell P. (1973). Protein composition of myelin of the peripheral nervous system. *J. Neurochem.* 20, 1207-1216.

Gregory R, Thomas PK, King RHM, et al. (1993). Coexistence of hereditary motor and sensory neuropathy type Ia and IgM paraproteinemic neuropathy. *Ann Neurol*; 33: 649–652.

Griffin JW, George R, Ho T. 1993). Macrophage systems in peripheral nerves. A review. *J Neuropathol Exp Neurol.*;52(6):553-560.

Guenard V, Schweitzer B, Flechsig E et al. (1999). Effective gene transfer of LacZ and P0 into Schwann cells of P0-deficient mice. *Glia*; 25: 165-178.

Guillin O, Diaz J, Carrol P, Griffon N, Schwartz JC, Sokoloff P. (2001). BDNF controls dopamine D3 receptor expression and triggers behavioural sensitization. *Nature*; 411: 86-89.

Gutierrez A, England JD, Sumner AJ, Ferer S, Warner LE, Lupski JR, et al. (2000) Unusual electrophysiological findings in X-linked dominant Charcot-Marie-Tooth disease. *Muscle Nerve*; 23: 182-188.

Hahn AF, Brown WF, Koopman WJ, Feasby TE.(1990) X-linked dominant hereditary motor and sensory neuropathy. *Brain* 113, 1511-1525.

Hahn AF, Ainsworth PJ, Naus CCG, Mao J, Bolton CF (2000). Clinical and pathological observations in men lacking the gap junction protein connexin 32. *Muscle and Nerve*, Suppl 9: 39-48.

Hahn AF, Ainsworth PJ, Bolton CF, Bilbao JM., Vallat JM. (2001) Pathological findings in the x-linked form of Charcot-Marie-Tooth disease: a morphometric and ultrastructural analysis. *Acta Neuropathol.* 101: 129–139

Harding A.E. (1993) Inherited neuronal atrophy and degeneration predominantly of lower motor neurons. In: Dyck PJ, Thomas PK, Griffin JW, Low PA, Poduslo JF. (eds). *Peripheral Neuropathy* 3rd ed. Saunders, Philadelphia, pp 1051-1064

Harding AE, Thomas PK.(1980) The clinical features of hereditary motor and sensory neuropathy types I and II. *Brain* 103:259–280.

Hartung HP, Stoll G, Toyka KV. (1993) Immune reactions in the peripheral nervous system. In Dyck PJ, Thomas PK, Griffin JW, Low PA, Poduslo JF, editors. *Peripheral neuropathy.* 3rd ed. Philadelphia: W.B. Saunders Comp; pp. 418-444.

Hartung HP, Toyka KV, Griffin JW. (1998a) Guillain-Barre- syndrome and chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. In Antel J, Birnbaum G, Hartung HP, editors. *Clinical neuroimmunology.* Malden (MA): Blackwell Science; 1998, 294-306.

Hartung HP, van der Meche FG, Pollard JD. (1998b). Guillain-Barre syndrome, CIDP and other chronic immune-mediated neuropathies. *Curr Opin Neurol*; 11: 497-513.

Hartung HP, Gold R, Jung S. (1998c). Local immune responses in the peripheral nervous system. In: Antel J, Birnbaum J, Hartung HP, editors. *Clinical neuroimmunology.* Malden (MA): Blackwell Science; p. 40-54.

Hattori N, Yamamoto M, Yoshihara T, Koike H, Nakagawa M et al. (2003) Demyelinating and axonal features of Charcot-Marie-Tooth disease with mutations of myelinrelated proteins (PMP22, MPZ and Cx32): a clinicopathological study of 205 Japanese patients. *Brain*, 126, 134-151

Hayasaka K, Himoro M, Sato W, Takada G, Uyemura K, Shimizu N, Bird TD, Conneally PM, Chance PF (1993). Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 1B is associated with mutations of the myelin P0 gene *Nat Genet.*, 5(1):31-34.



- Ho TW, McKhann GM, Griffin JW. (1998) Human autoimmune neuropathies. *Annu Rev Neurosci*; 21: 187-226.
- Hofbauer LC, Kluger S, Kuhne CA, Dunstan CR, Burchert A, Schoppet M, Zielke A, Heufelder AE. (2002) Detection and characterization of RANK ligand and osteoprotegerin in the thyroid gland. *J Cell Biochem.*;86(4):642-650.
- Huxley C, Passage E, Robertson AM, et al. (1998) Correlation between varying levels and the degree of demyelination and reduction in nerve conduction velocity in transgenic mice. *Hum Mol Genet*; 7: 449–458.
- Inaba A, Yokota T, Shiojiri T, et al. (1997) Two siblings with nerve conduction abnormalities indicating an acquired type of demyelinating neuropathy. *Muscle Nerve*;20:608–610.
- Inoue, H., H. Tsuruta, J. Sedzik, K. Uyemura, and D.A. Kirschner. (1999). Tetrameric assembly of full-sequence protein zero myelin glycoprotein by synchrotron X-ray scattering. *Biophys. J.* 76:423–437.
- Jeong JG, Kim JM, Cho H, Hahn W, Yu SS, Kim S. (2004). Effects of IL-1beta on gene expression in human rheumatoid synovial fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun.*;324(1):3-7.
- 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(22):5599-5612.
- Kermer P, Klocker N, Labes M, Bahr M. (2000). Insuline-like growth factor-1 protects axotomized rats retinal ganglion cells from secondary death via PI3K-dependent Akt phosphorylation and inhibition of caspase-3 in vivo. *J. Neurosci.*; 20: 2-8.
- Kerschensteiner R, Stadelmann C, Dechant G, Wekerle H, Hochfeld R. (2003). Neurotrophic cross-talk between the nervous and immun systems: implications for neurologic diseases. *Ann. Neurol*; 53: 292-304.
- Kiefer R, Kieseier BC, Stoll G, Hartung HP. (2001).The role of macrophages in immune-mediated damage to the peripheral nervous system. *Prog Neurobiol.*;64(2):109-127.

Kieseier BC, Tani M, Mahad D, Oka N, Ho T, Woodroffe N, Griffin JW, Toyka KV, Ransohoff RM, Hartung HP. (2002) Chemokines and chemokine receptors in inflammatory demyelinating neuropathies: a central role for IP-10. *Brain*;125(Pt 4):823-834.

Klein CJ, Dyck PJ, Friedenberg SM, Burns TM, Windebank AJ. (2002) Inflammation and neuropathic attacks in hereditary brachial plexus neuropathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*; 73: 45–50.

Kleopa KA, Yum SW, Scherer SS. (2002). Cellular mechanisms of connexin32 mutation associated with CNS manifestation. *J. Neurosci. Res.*; 68, 522-534.

Komuro H, Olee T, Kuhn K, Quach J, Brinson DC, Shikhman A, Valbracht J, Creighton-Achermann L, Lotz M. (2001) The osteoprotegerin/receptor activator of nuclear factor kappaB/receptor activator of nuclear factor kappaB ligand system in cartilage. *Arthritis Rheum.*;44(12):2768-2776.

Konttinen YT, Li TF, Hukkanen M, Ma J, Xu JW, Virtanen I. (2000). Fibroblast biology. Signals targeting the synovial fibroblast in arthritis. *Arthritis Res.*;2(5):348-355

Krarpup C. (2003) An update on electrophysiological studies in neuropathy. *Curr. Opin. Neurol*; 16:603-612.

Kuhlbrodt K, Herbarth B, Sock E, Hermans-Borgmeyer I, Wegner M. (1998). Sox10, a novel transcriptional modulator in glial cells. *J Neurosci.*;18(1):237-250

Kuhlenbäumer G, Young P, Hünermund G, Ringelstein B; Stögbauer F. (2002) Clinical features and molecular genetics of hereditary peripheral neuropathies. *J Neurol.* 249 : 1629–1650

Kuntzer T, Dunand M, Schorderet DF, Vallat JM, Hahn AF, Bogousslavsky J. (2003). Phenotypic expression of a Pro 87 to Leu mutation in the connexin 32 gene in a large Swiss family with Charcot-Marie-Tooth neuropathy. *J Neurol Sci.*;207(1-2):77-86

Lacey, D.L., E. Timms, H.-L. Tan, M.J. Kelley, C.R. Dunstan, T. Burgess, R. Elliott, A. Colombero, G. Elliott, S. Scully, et al. (1998) Osteoprotegerin (OPG) and OPG-ligand (OPGL) potently inhibit and stimulate, respectively, osteoclast differentiation. *Cell.* 93: 165-176)

- Laguëny A, Latour P, Vital A, Masson GL, Rouanet M, Ferrer X, Vital C, Vandenberghe A. (2001) Mild recurrent neuropathy in CMT1B with a novel nonsense mutation in the extracellular domain of the MPZ gene *J Neurol Neurosurg Psychiatry*;70:232–235
- Lawson VH, Gordon Smith A, Bromberg MB (2003). Assessment of axonal loss in Charcot-Marie-Tooth neuropathies. *Exp Neurol*. 184(2):753-757.
- Lindberg, R.L.P., Martini R., Baumgartner M., Erne B., Borg J., Zielasek J., Ricker K., Steck A., Toyka K.V., and Meyer U.A. (1999). Motor neuropathy in porphobilinogen deaminase-deficient mice imitates the peripheral neuropathy of human acute porphyria. *J. Clin. Invest.* 103:1127–1134.
- Leussink V, Jung S, Merschdorf U, Toyka KV, Gold R. (2001). High dose methylprednisolon therapy in multiple sclerosis induced apoptosis in peripheral blood cells. *Arch Neurol*; 58: 91–97.
- Lewis RA, Sumner AJ, Shy ME. (2000) Electrophysiological features of inherited demyelinating neuropathies: A reappraisal in the era of molecular diagnosis. *Muscle Nerve*;23:1472–87.
- Lupski J., de Oca-Luna R., Slaugenhaupt S., Pentao L., Guzzetta V., Trask B. et al. (1991) DNA duplication associated with Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Cell* 66: 219–232
- Lupski JR, Wise CA, Kuwano A, Pentao L, Parke JT, Glaze DG, Ledbetter DH, Lus G, Pelis E, Jordanova A., Löfgren A., Cavallaro T., Ammendola A., Melone M.A.B., Rizzuto N., Timmerman V., Cotrufo R., and De Jonghe P. (2003). Charcot–Marie–Tooth disease with giant axons. A clinicopathological and genetic entity. *Neurology*, 61:988–990
- Lus G, Nelis E, Jordanova A, Lofgren A, Cavallaro T, Ammendola A, Melone MA, Rizzuto N, Timmerman V, Cotrufo R, De Jonghe P. (2003) Charcot-Marie-Tooth disease with giant axons: a clinicopathological and genetic entity. *Neurology*;61(7):988-990.
- Magyar JP, Martini R, Ruelicke T, et al. (1996) Impaired differentiation of Schwann cells in transgenic mice with increased PMP22 gene dosage. *J Neurosci* 1996; 16: 5351–5360.

- Malandrini A, Villanova M, Federico A, et al. (1999) Acute inflammatory neuropathy in Charcot-Marie-Tooth disease. *Neurology* ;52:859–861.
- Malik O, Sharp D, King RHM, Orrell R, Ginsberg L. (2000). Coexistent hereditary and inflammatory neuropathy [abstract]. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*; 69: 415.
- Marinissen MJ, Gutkind JS. (2001). G-protein-coupled receptors and signalling networks: emerging paradigms. *Trends Pharmacol Sci* 22; 368-376.
- Marques W Jr, Hanna MG, Marques SR, Sweeney MG, Thomas PK, Wood NW. (1999). Phenotypic variation of a new P0 mutation in genetically identical twins. *J Neurol.*, 246(7): 596-599.
- Martini, R. (1994). Expression and functional roles of neural cell surface molecules and extracellular matrix components during development and regeneration of peripheral nerves. *J. Neurocytol.* 23:1–28.
- Martini R. (1997) Animal models for inherited peripheral neuropathies. [Review]. *J Anat* 1997; 191: 321-36.
- Martini R. (1999) P0-deficient knockout mice as tools to understand pathomechanisms in Charcot-Marie-Tooth 1B and P0-related Dejerine-Sottas syndrome. *Ann N Y Acad Sci.*;883:273-280.
- Martini R. (2001). The effect of myelinating Schwann cells on axons. Review. *Muscle Nerve* 2001, 24: 456-466.
- Martini R, Zielasek J, Toyka KV, Giese KP, Schachner M. (1995a) P0-deficient mice show myelin degeneration in peripheral nerves characteristic of inherited human neuropathies. *Nature Genetics* 11, 281-286.
- Martini, R., M.H. Mohajeri, S. Kasper, K.P. Giese, and M. Schachner. (1995b). Mice doubly deficient in the genes for P0 and myelin basic protein show that both proteins contribute to the formation of the major dense line in peripheral nerve myelin. *J. Neurosci.* 15:4488–4495.
- Martini, R., and M. Schachner (1997). Molecular bases of myelin formation as revealed by investigations on mice deficient in glial cell surface molecules. *Glia.* 19:298–310.
- Martini R. Bollensen E, Schachner M. (1988a). Immunocytological localization of the major peripheral nervous system glycoprotein P0 and the L2/NHK-1 and L3

carbohydrate structures in developing and adult mouse sciatic nerve. *Dev. Biol.* 129, 330-338.

Martini R, Zielasek J, Toyka KV (1998b) Inherited demyelinating neuropathies: from gene to disease. *Curr Opin Neurol* 11:545-556.

Martini R, Toyka KV. (2004) Immune-mediated components of hereditary demyelinating neuropathies: lessons from animal models and patients. *The Lancet neurology*; 3: 457-465.

Matsumuro K, Izumo S, Umehara F, Osame M. (1994) Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy: histological and immunopathological studies on biopsied sural nerves. *J Neurol Sci.*;127(2):170-178.

Matsushima GK, Taniike M, Glimcher LH et al. (1994). Absence of MHC class II molecules reduces CNS demyelination, microglia/macrophage infiltration and twitching in murine globoid cell leukodystrophy. *Cell*; 78: 645-656.

Mäurer M, Schmid CD, Bootz F, Zielasek J, Toyka KV, Oehen S, et al. (2001). Bone marrow transfer from wild-type mice reverts the beneficial effect of genetically mediated immune deficiency in myelin mutants. *Mol Cell Neurosci*; 17: 1094-1101.

Mäurer M, Kobsar I, Berghoff M, Schmid CD, Carenni S, Martini R. (2002). Role of immune cells in animal models for inherited neuropathies: facts and visions. *J Anat.*;200(4):405-414.

Mäurer M, Toyka KV, Gold R. (2002). Immune mechanisms in acquired demyelinating neuropathies: lessons from animal models. *Neuromusc Dis*; 12: 405–14.

Mäurer M, Müller M, Kobsar I, Leonhard C, Martini R, Kiefer R. (2003). Origin of pathogenic macrophages and endoneurial fibroblast-like cells in an animal model of inherited neuropathy. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 23: 351–359

McGuinness MC, Griffin DE, Raymond GV, et al. (1995). Tumour necrosis factor- $\alpha$  and X-linked adrenoleukodystrophy. *J Neuroimmunol* ;61:161–9.

McDonald PP, Fadok VA, Bratton D, Henson PM. (1999) Transcriptional and translational regulation of inflammatory mediator production by endogenous TGF-beta in macrophages that have ingested apoptotic cells. *J Immunol.*;163(11):6164-6172

- McLennan IS, Koishi K. (2002) The transforming growth factor-betas: multifaceted regulators of the development and maintenance of skeletal muscles, motoneurons and Schwann cells. *Int J Dev Biol.*;46(4):559-567
- Mellado M, Rodriguez-Frade JM, Azagay A et al., (1998) The chemokine monocyte chemoattractant protein 1 triggers Janus kinase 2 activation and tyrosine phosphorylation of the CCR2B receptor. *J. Immunol.*; 161: 805-813.
- Mercier F, Kitasako JT, Hatton GI. (2002) Anatomy of the brain neurogenic zones revisited: fractones and the fibroblast/macrophage network. *J Comp Neurol.*;451(2):170-188
- Michailov GV, Sereda MW, Brinkmann BG, Fischer TM, Haug B, Birchmeier C, Role L, Lai C, Schwab MH, Nave KA. (2004). Axonal neuregulin-1 regulates myelin sheath thickness. *Science*;304(5671):700-703.
- Min SY, Kim WU, Cho ML, Hwang SY, Park SH, Cho CS, Kim JM, Kim HY. (2002) Prostaglandin E2 suppresses nuclear factor-kappaB mediated interleukin 15 production in rheumatoid synoviocytes. *J Rheumatol.*;29(7):1366-1376.
- Min DJ, Cho ML, Lee SH, Min SY, Kim WU, Min JK, Park SH, Cho CS, Kim HY. (2004) Augmented production of chemokines by the interaction of type II collagen-reactive T cells with rheumatoid synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum.*;50(4):1146-1155.
- Murwani R, Armati P. (1998) Peripheral nerve fibroblasts as a source of IL-6, TNFalpha and IL-1 and their modulation by IFNgamma. *J Neurol Sci.*;161(2):99-109.
- Moalem G, Leibowitz-Amit R, Yoles E, Mor F, Cohen IR, Schwartz M. (1999). Autoimmune T cells protect neurons from secondary degeneration after central nervous system axotomy. *Nat. Med*; 5: 49-55.
- Mombaerts P, Iacomini J, Johnson RS, Herrup K, Tonegawa S, Papaioannou VE. (1992) RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell*; 68: 869-877.
- 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. *Lab Invest.*; 83(2): 175-185.

- Nanki T, Urasaki Y, Imai T, Nishimura M, Muramoto K, Kubota T, Miyasaka N. (2004) Inhibition of fractalkine ameliorates murine collagen-induced arthritis. *J Immunol.*; 173 (11):7010-7016.
- Nelis E, Timmerman V, De Jonghe P, Van Broeckhoven C, Rautenstrauss B (1999). Molecular genetics and biology of inherited peripheral neuropathies: a fast-moving field. *Neurogenetics* 2:137-48
- Nelles E, Bützler C, Jung D, Temme A, Gabriel H-D, Dahl U, Traub O, Stümpel F, Jungermann K, Zielasek J, Toyka KV, Dermietzel R, Willecke K. (1996). Defective propagation of signals generated by sympathetic nerve stimulation in the liver of connexin32-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA*; 93: 9565-9570.
- Neumann H, Medana IM, Bauer J, Lassmann H.(2002) Cytotoxic T lymphocytes in autoimmune and degenerative CNS diseases. *Trends Neurosci*; 25: 313–319.
- Neumann E, Gay RE, Gay S, Muller-Ladner U. (2004) Functional genomics of fibroblasts. *Curr Opin Rheumatol.*; 16(3):238-245.
- Nishikawa SI, Hashi H, Honda K, Fraser S, Yoshida H. (2000) Inflammation, a prototype for organogenesis of the lymphopoietic/hematopoietic system. *Curr Opin Immunol.*12(3):342-345.
- Oda K, Miura H, Shibasaki H, Endo C, Kakigi R, Kuroda Y, Tanaka K. (1990). Hereditary pressure-sensitive neuropathy: demonstration of „tomacula“ in motor nerve fibers. *J of the Neurol Sci*, 98:139-148.
- Okabe M, Ikawa M, Kominami K, Nakanishi T, Nishimune Y.(1997) 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett.*;407(3):313-319.
- Paul DL. (1986). Molecular cloning of cDNA for rat liver gap junction protein. *J.Cell Biol.*; 103, 123-134.
- Perea J, Robertson A, Tolmachova T, et al. (2001) Induced myelination and demyelination in a conditional mouse model of Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Hum Mol Genet*;10: 1007–1018.
- Pierce KL, Premont RT, Lefkowitz RJ. (2002) Seven-transmembrane receptors. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3; 639-650.
- Prensky AL, Dodson WE. (1984) The steroid treatment of hereditary motor and sensory neuropathy. *Neuropediatrics*; 15: 203-207.

- Price, R., Paggi, P., Lasek, R., and Katz, M. (1988). Neurofilaments are spaced differently in the radial dimensions of axons. *J. Neurocytology*, 17, 55-62.
- Quan TE, Cowper S, Wu SP, Bockenstedt LK, Bucala R. (2004). Circulating fibrocytes: collagen-secreting cells of the peripheral blood. *Int J Biochem Cell Biol.*;36(4):598-606.
- Raeymaekers P, Timmerman V, Nelis E, De Jonghe P, Hoogendijk JE, Baas F. et al. (1991) Duplication in chromosome 17p11.2 in Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 1a (CMT 1a). The HMSN Collaborative Research Group. *Neuromuscul. Disord.* 1: 93–97
- Rajabally Y, Vital A, Ferrer X, et al. (2000) Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy caused by HIV infection in a patient with asymptomatic CMT1A. *J Peripher Nerv Syst*; 5: 158–62.
- Rambukkana A, Zanazzi G, Tapinos N, Salzer JL. (2002) Contactdependent demyelination by *Mycobacterium leprae* in the absence of immune cells. *Science*; 296: 927-931.
- Reilly M. (2000). Classification of the hereditary motor and sensory neuropathies. *Curr Opin. Neurol.*, 13: 561-564.
- Reilly M, Hanna M. (2002). Genetic neuromuscular disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*;73(Suppl II):12–21.
- Reilly MM, Munro N, Robinson S, et al. (1998) Acute inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy in a patient with asymptomatic Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Muscle Nerve*;7:S208.
- Rezania K, Gundogdu B, Soliven B. (2004). Pathogenesis of chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *Front Biosci.*;9:939-945.
- Runker AE, Kobsar I, Fink T, Loers G, Tilling T, Putthoff P, Wessig C, Martini R, Schachner M. (2004). Pathology of a mouse mutation in peripheral myelin protein P0 is characteristic of a severe and early onset form of human Charcot-Marie-Tooth type 1B disorder. *J Cell Biol.*;165(4):565-573.
- Rufer M, Flanders K, Unsicker K. (1994) Presence and regulation of transforming growth factor beta mRNA and protein in the normal and lesioned rat sciatic nerve. *J Neurosci Res.*;39(4):412-423.



- Ruth JH, Shahrara S, Park CC, Morel JC, Kumar P, Qin S, Koch AE. (2003). Role of macrophage inflammatory protein-3 $\alpha$  and its ligand CCR6 in rheumatoid arthritis. *Lab Invest.*;83(4):579-588.
- Sahenk Z, Chen L. (1998). Abnormalities in the axonal cytoskeleton induced by a connexin32 mutation in nerve xenografts. *J Neurosci Res* 51: 174–184.
- Saidenberg-Kermanac'h N, Cohen-Solal M, Bessis N, De Vernejoul MC, Boissier MC. (2004) Role for osteoprotegerin in rheumatoid inflammation. *Joint Bone Spine.*;71(1):9-13.
- 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. *J. Neurosci.*;23(7):2833-2839.
- Sander S, Nicholson GA, Ouvrier RA, McLeod JG, Pollard JD. (1998) Charcot-Marie-Tooth disease: histopathological features of the peripheral myelin protein (PMP22) duplication (CMT1A) and connexin32 mutations (CMTX1). *Muscle Nerve*;21(2):217-225.
- Scherer SS, Descheñnes SM, Xu YT, Grinspan JB, Fischbeck KH, Paul DL. (1995). Connexin32 is a myelin-related protein in the PNS and CNS. *J Neurosci*; 15: 8281-8294.
- Scherer SS, Paul DL (2003). Connexin32 und Connexin29 Genes. In: Lazzarini RA, Griffin JW, Lassman H, Nave K-A, Miller RH, Trapp BD. (Eds). *Myelin biology and disorders*. Elsevier Academic press, 2003, 599-608.
- Scherer SS, Xu Y.-T, Nelles E, Fischbeck K, Willecke K, Bone LJ. (1998). Connexin32-null mice develop demyelinating peripheral neuropathy. *Glia* 24:8-20.
- Schmid B, Toyka KV, Kiefer R, Full J, Hartung HP, Pollard J. (1996) Inflammatory infiltrates in sural nerve biopsies in Gullian-Barre syndrome and chronic inflammatory demyelination neuropathy. *Muscle Nerve* 1996; 19:474-487.
- 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. *J Neurosci* 20: 729-735.

Schneider-Schaulies, J., A. von Brunn, and M. Schachner. (1990). Recombinant peripheral myelin protein P0 confers both adhesion and neurite outgrowth-promoting properties. *J. Neurosci. Res.* 27:286–297.

Sereda M, Griffiths I, Pühlhofer A, et al. (1996) A transgenic rat model of Charcot-Marie-Tooth disease. *Neuron*; 16: 1049–1060.

Sereda MW, Meyer zu Horste G, Suter U, Uzma N, Nave KA. (2003). Therapeutic administration of progesterone antagonist in a model of Charcot-Marie-Tooth disease (CMT-1A). *Nat Med.*;9(12):1533-1537

Shapiro, L., J.P. Doyle, P. Hensley, D.R. Colman, and W.A. Hendrickson. (1996). Crystal structure of the extracellular domain from P0, the major structural protein of peripheral nerve myelin. *Neuron.* 17:435–449.

Shy ME, Arroyo E, Sladky J et al. (1997). Heterozygous P0 knockout mice develop a peripheral neuropathy that resembles chronic inflammatory demyelination polyneuropathy (CIDP). *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*; 56: 811-821.

Shy ME, Garbern JY, Kamholz J. (2002). Hereditary motor and sensory neuropathies: a biological perspective. *Lancet Neurology* 1: 110–118

Shy ME, Agnes Jani A, Krajewski K, Grandis M, Lewis RA, Li J, Shy RR, Balsamo J, Lilien J, Garbern JY, Kamholz J. (2004). Phenotypic clustering in MPZ mutations *Brain* , 127, 371-384.

Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott R, Colombero A, Tan HL, Trail G, Sullivan J, Davy E, Bucay N, Renshaw-Gegg L, Hughes TM, Hill D, Pattison W, Campbell P, Boyle WJ, et al. (1997) Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell.* 1997;89(2):309-319

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

Srivastava S, Matsuda M, Hou Z, Bailey JP, Kitazawa R, Herbst MP, Horseman ND. (2003) Receptor activator of NF-kappaB ligand induction via Jak2 and Stat5a in mammary epithelial cells. *J Biol Chem.*;278(46):46171-46178.

Steinhauser ML, Kunkel SL, Hogaboam CM, Evanoff H, Strieter RM, Lukacs NW. (1998) Macrophage/fibroblast coculture induces macrophage inflammatory protein-

lalpha production mediated by intercellular adhesion molecule-1 and oxygen radicals. *J Leukoc Biol.*;64(5):636-641.

Stögbauer F., Young P., Kühlenbaumer G., Meuleman J., Timmerman V., Van Broeckhoven C., Kurlmann G., Ringelstein E.B. (1998) Hereditäre neuralgische Amyotrophie (HNA): Klinische und molekulargenetische Befunde. *Fortschr Neurol Psychiatr* 66:10-14.

Subang MC, Richardson PM. (2001). Influence of injury and cytokines on synthesis of monocyte chemoattractant protein-1 mRNA in peripheral nervous tissue. *Eur J Neurosci*; 13: 521-528.

Tabaraud F, Lagrange E, Sindou P, Vandenberghe A, Levy N, Vallat JM. (1999). Demyelinating X-linked Charcot-Marie-Tooth disease: unusual electrophysiological findings. *Muscle Nerve*; 22: 1442-1447.

Taskinen HS, Roytta M. (2000). Increased expression of chemokines (MCP-1, MIP-1alpha, RANTES) after peripheral nerve transection. *J Peripher Nerv Syst*; 5: 75-81.

Teitelbaum SL. (2000). Bone resorption by osteoclasts. *Science*; 289, 1504-1508.

Thomas PK, Marques W Jr, Davis MB, Sweeney MG, King RHM, Bradley JL, et al. (1997) The phenotypic manifestations of chromosome 17p11.2 duplication. *Brain*; 120: 465-478.

Timmerman V, Raeymaekers P, De Jonghe P, De Winter G, Swerts L, Jacobs K, Gheuens J, Martin JJ, Vandenberghe A, Van Broeckhoven C (1990) Assignment of the Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 1 (CMT 1a) gene to 17p11.2-p12. *Am J Hum Genet.*, 47(4):680-685.

Tofaris GK, Patterson PH, Jessen KR, Mirsky R. (2002) Denervated Schwann cells attract macrophages by secretion of leukemia inhibitory factor (LIF) and monocyte chemoattractant protein-1 in a process regulated by interleukin-6 and LIF. *J Neurosci*; 22: 6696-6703.

Trapani JA, Smyth MJ. (2002). Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat Rev Immunol*; 2: 735–747.

Udagawa N., Takahashi N, Akatsu T, Tanaka H, Sasaki T, Nishihara T, Koga T, Martin TJ, Suda T. (1990). Origin of osteoclasts: mature monocytes and macrophages are

capable of differentiating into osteoclasts under a suitable microenvironment prepared by bone marrow-derived stromal cell. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 87: 7260-7264.

Vass K, Hickey WF, Schmidt RE, Lassmann H. (1993). Bone marrow-derived elements in the peripheral nervous system. An immunohistochemical and ultrastructural investigation in chimeric rats. *Lab Invest.*;69(3):275-282.

Villosada P, Hauser SL, Bartke et al. (2000). Human nerve growth factor protects common marmosets against autoimmune encephalomyelitis by switching the balance of T helper cells type 1 and 2 cytokines within the central nervous system. *J Exp Med*; 191: 1799-1806.

Vital A, Ferrer X, Lagueny A, Vandenberghe A, Latour P, Goizet C, Canron MH, Louiset P, Petry KG, Vital C. (2001) Histopathological features of X-linked Charcot-Marie-Tooth disease in 8 patients from 6 families with different connexin32 mutations. *J Peripher Nerv Syst.*; 6(2):79-84

Vital A, Vital C, Julien J, et al. (1992) Occurrence of active demyelinating lesions in children with hereditary motor and sensory neuropathy (HSMN) type 1. *Acta Neuropathol*;84:433–436.

Vital A, Vital C, Lagueny A, Ferrer X, Re-bachelier CR, Latour F, Petry KG (2003) Inflammatory demyelination in a patient with CMT1A. *Muscle Nerve* 28: 373–376

Voyvodic JT. (1989) Target size regulates calibre and myelination of sympathetic axons. *Nature*;342(6248):430-433.

Warner LE, Hilz MJ, Appel SH, Killian JM, Kolodry EH, Karpata G, et al. (1996). Clinical phenotypes of different MPZ (P0) mutations may include Charcot-Marie-Tooth type 1B, Dejerine-Sottas, and congenital hypomyelination. *Neuron*, 17: 451-460.

Watanabe M, Yamamoto N, Ohkoshi N, Nagata H, Kohno Y, Hayashi A, et al. (2002). Corticosteroid-responsive asymmetric neuropathy with a myelin protein zero gene mutation. *Neurology*; 59: 767-769.

Watson DF, Nachtman FN, Kuncel RW, Griffin JW. 1994. Altered neurofilament phosphorylation and beta tubulin isotypes in Charcot-Marie-Tooth disease type 1. *Neurology* 44:2383–2387.

Waxman S.G. (1980). Determinants of nerve conduction velocity in myelinated nerve fibers. *Muscle Nerve*, 3, 141-150.

Willecke K, Eiberger J, Degen J, Eckardt D, Romualdi A, Guldenagel M, Deutsch U, Sohl G. (2002) Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome. *Biol Chem.*;383(5):725-737.

Wilson SE, Mohan RR, Netto M, Perez V, Possin D, Huang J, Kwon R, Alekseev A, Rodriguez-Perez JP (2004) RANK, RANKL, OPG, and M-CSF expression in stromal cells during corneal wound healing.. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*;45(7):2201-2211

Windebank AJ. (1993) Inherited recurrent focal neuropathies. In: Dyck P.J., Thomas P.K., Griffin J.W., Low P.A., Poduslo J.F. (eds). *Peripheral Neuropathy* 3rd ed. Saunders, Philadel, pp 1137-1148

Wong MH, Fabin MT. (1996). Dominant-negative effect on adhesion by myelin P0 protein truncated in its cytoplasmic domain. *J Cell Biol*, 134, 1531-1541.

Wrabetz, L., Feltri M.L., Quattrini A., Imperiale D., Previtali S., D'Antonio M., Martini R., Yin X., Trapp B.D., Zhou L., et al. 2000. P(0) glycoprotein overexpression causes congenital hypomyelination of peripheral nerves. *J. Cell Biol.* 148:1021–1034.

Wrabetz L, Feltri ML, Kleopa KA, Scherer SS. (2003a) Inherited neuropathies: Clinical, genetic, and biological features. In: Lazzarini RA, Griffini JW, Lassman H, Nave K-A, Miller RH, Trapp BD. (Eds). *Myelin biology and disorders*. Elsevier Academic press, 2003, 905-951.

Wrabetz L, Feltri ML, Suter U. (2003b) Models of Charkot-Marie-Tooth disease. In: Lazzarini RA, Griffini JW, Lassman H, Nave K-A, Miller RH, Trapp BD. (Eds). *Myelin biology and disorders*. Elsevier Academic press, 2003, 1143-1168

Xu W, Shy M, Kamholz J, et al. (2001). Mutations in the cytoplasmic domain of P0 reveal a role for PKC-mediated phosphorylation in adhesion and myelination. *J Cell Biol*; 155: 439–45.

Yin X, Crawford TO, Griffin JW, Tu P, Lee VM, Li C, et al. (1998). Myelin-associated glycoprotein is a myelin signal that modulates the caliber of myelinated axons. *J Neurosci* 1998; 18:1953-1962.

Yin X., Kidd GJ, Wrabetz L, Feltri ML, Messing A, and Trapp BD. (2000). Schwann cell myelination requires timely and precise targeting of P0 protein. *J. Cell Biol.* 148:1009–1020.

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(6274):442-444.

Young P., Suter U. (2003). The causes of Charcot-Marie-Tooth disease. *Cell. Mol. Life Sci.* 60: 2547–2560

Zielasek J, Martini R, Toyka KV. (1996). Functional abnormalities in P0-deficient mice resemble human hereditary neuropathies linked to P0 gene mutations. *Muscle Nerve*; 19:946-952.

Zhou L, Griffin JW. (2003). Demyelinating neuropathies. *Curr Opin Neurol* 16:307–13.

## **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. Rudolf Martini danke ich für die freundliche Überlassung des Themas, insbesondere für die mir gebotenen Arbeitsmöglichkeiten in Rahmen seiner Arbeitsgruppe sowie für die stetige Unterstützung meiner Arbeit mit neuen Ideen.

Herrn Prof. Dr. Klaus V. Toyka danke ich für die Möglichkeit, in der Neurologischen Universitätsklinik in Würzburg zu arbeiten.

Besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Mathias Mäurer für die hervorragende Betreuung, seine fachlichen und methodischen Ratschläge und für seinen stetigen Optimismus.

Ein ganz besonderer Dank gilt Frauen Dr. Antje Kroner und Yvonne Schramm für die Mühe und Geduld bei der Rechtschreibprüfung.

Außerdem möchte ich herzlich meinen Kollegen Herrn Heinrich Blazyca, Herrn Stefan Fischer, Herrn Dr. Chi Wang Ip, Frau Carolin Kiesel und Frau Bianca Kohl danken, die mich stets motiviert und unterstützt haben.

Ganz besonderer Dank gebührt dem Team der Tierhaltung, insbesondere Frau Helga Brünner und Frau Dr. Bettina Holtmann.

Wertvolle Hilfe mit FACS und Tieren erhielt ich von Herrn Dr. Martin Berghoff.

Ich möchte auch allen Kollegen aus der Universitätsklinik Würzburg danken, deren freundliche Hilfe und Unterstützung ich immer gespürt habe.

## **LEBENS LAUF**

### **PERSONALIEN:**

Name Kobsar  
Vorname Igor  
Geburtsdatum/-ort 29.07.1963, Kiew, Ukraine  
Familienstand verheiratet, 2 Tochter  
Adresse Gieshügeler Str. 63  
97218 Gerbrunn  
Telephon 0931/20123642(dienstlich)  
0931/7844597 (privat)  
e-mail Kobsar\_I@klinik.uni-wuerzburg.de

### **SCHULBILDUNG**

1970 – 1980 Schulausbildung in Kiew, Ukraine. Abschluss cum laude

### **UNIVERSITÄTSSTUDIUM**

1980 – 1986 Hochschulstudium. Studium der Medizin am Institut für Medizin, Kiew.  
Abschluss cum laude

### **WEITERFÜHRENDE BERUFSAUSBILDUNG**

2004 Kurse für Ultraschaldiagnostik an Universität Würzburg  
1991-1997 Spezialisierung in Psychiatrie, Akupunktur, Manueller Therapie,  
Sexualheilkunde und Andrologie, Phytotherapie, Geriatrie an Kiew  
Instituten für Postdiplomausbildung, Orthopädie und Urologie  
1993 Ph.D. Dissertation “Chronische Cerebrale Durchblutungsstörungen in  
Patienten mit Cervicalsmerzsyndrom und Cervicalspondylosis“  
1988-1993 Ph.D. Student am Institut für Gerontologie, Kiew.  
1986-1988 Spezialisierung in Neurologie am Institut für Gerontologie, Kiew  
(klinische Ordinator, AiP in Deutschland)



## **BERUFSERFABUNG**

- 11.2003-04.2004 Arzt (Anerkennungszeit) in geriatrischer Reha Klinik, Würzburg
- Seit 01.2003 Berufserlaubnis zur Ausübung der ärztlichen Tätigkeit in Bayern
- Seit 2000 Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Universität Würzburg,  
Sektion für Experimentelle Entwicklungsneurobiologie
- 1988-2000 Neurologe und wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für  
Gerontologie, Kiew
- Seit 1993 Mitglied der Internationalen Gesellschaft für Psychogeriatric
- Seit 1992 Mitglied der Ukrainischen Gesellschaft für Geriatric
- Seit 1991 Mitglied der Ukrainischen Gesellschaft für Neurologie

## **DIE WICHTIGSTEN PUBLIKATIONEN**

1. Kobzar' (Kobsar), I.V., Plachinda, Yu.I. (1990) Dopplerographic examination of the internal carotid and vertebral arteries in patients of middle and old age with chronic cervical pain syndrome. *Vrach. delo (Ukraine)*, 6: 92-95.
2. Kobzar (Kobsar), I.V., Podrushnyak, E.P. (1995) Investigation of age-related changes in a cervical segment of the spine from data of the quantitative analysis of its structural and functional peculiarities. *Physiol. journal (Ukraine)*, 41, 1-2: 19-25.
3. Polyukhov, A.M., Kobsar, I.V., Grebelnik, V.I., Voitenko, V.P. (2000) The accelerated occurrence of age-related changes of organism in Chernobyl workers - a radiation-induced progeroid syndrome? *Experimental gerontology*, 35 (1): 105-115.
4. Kobsar I, Mäurer M, Ott T, Martini R. (2002) Macrophage-related demyelination in peripheral nerves of mice deficient in the gap junction protein connexin 32. *Neurosci Lett*, 320(1-2):17-20.
5. Mäurer M., Kobsar I., Berghoff M., Carenini S., Schmid Ch., Martini R. (2002) Role of immune cells in animal models for inherited neuropathies: facts and visions.. *Journal of anatomy*, 200: 405-414.
6. 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*, 126(Pt 4):804-813.

7. 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. *Mol Cell Neurosci.*, 23(3):351-359.
8. Runker AE\*, Kobsar I\*, Fink T, Loers G, Tilling T, Putthoff P, Wessig C, Martini R, Schachner M. (2004). Pathology of a mouse mutation in peripheral myelin protein P0 is characteristic of a severe and early onset form of human Charcot-Marie-Tooth type 1B disorder. *J Cell Biol.*;165(4):565-573 (\*shared autorship).
9. Grohmann K, Rossoll W, Kobsar I, Holtmann B, Jablonka S, Wessig C, Stoltenburg-Didinger G, Fischer U, Hubner C, Martini R, Sendtner M. (2004). Characterization of Ighmbp2 in motor neurons and implications for the pathomechanism in a mouse model of human spinal muscular atrophy with respiratory distress type 1 (SMARD1). *Hum Mol Genet.*;13(18):2031-2042.
10. Berghoff M, Samsam M, Muller M, Kobsar I, Toyka KV, Kiefer R, Maurer M, Martini R. (2005) Neuroprotective effect of the immune system in a mouse model of severe dysmyelinating hereditary neuropathy: enhanced axonal degeneration following disruption of the RAG-1 gene. *Mol Cell Neurosci.*;28(1):118-127.
11. Kobsar I, Hasenpusch-Theil K, Wessig C, Muller H. W. Martini R. (2005) Evidence for macrophage-mediated myelin disruption in an animal model for CMT1A. *J.Neurosci. Res.*; 81(6):857-864.
12. 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. *Mol. Cell. Neurosci.* (In press)

Weitere 6 wissenschaftliche Publikationen, 31 Vorträge auf 19 Konferenzen in Australien, Kanada, Russland, Ukraine und USA. 1 Patent (Russland) für diagnostische Methode.