

Aus der Neurologischen Klinik und Poliklinik  
der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. Jens Volkmann

**Die Rolle von Makrophagen an der motorischen Endplatte bei  
der Pathogenese neuromuskulärer Erkrankungen am Beispiel  
von Tiermodellen peripherer Neuropathien vom Charcot-Marie-  
Tooth-Typ**

**Inaugural - Dissertation**

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Susanne Regina Kerscher

aus Augsburg

Würzburg, Januar 2018



Referent: Prof. Dr. rer. nat. Rudolf Martini  
Korreferent: Prof. Dr. med. Anna-Leena Sirén  
Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 21.09.2018

Die Promovendin ist Ärztin

"Felix, qui potuit rerum cognoscere causas."

*Vergil*

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1. Neuromuskuläre Endplatte	1
1.1.1. Aufbau und Entwicklung der neuromuskulären Endplatte	1
1.1.2. Neuromuskuläre Transmission	6
1.2. Charcot-Marie-Tooth Erkrankung (CMT)	7
1.2.1. Klassifikation und klinische Aspekte	7
1.2.2. Pathogenese	12
1.2.2.1. Die Rolle von PMP22, P0 und Cx32 bei der Pathogenese der CMT	14
1.2.2.2. Einfluss des Immunsystems auf die Pathogenese der CMT	18
1.2.3. Diagnostik und Behandlungsoptionen	22
1.3. Die neuromuskuläre Endplatte als pathogenetische Zielstruktur in CMT und weiteren neuropathologischen und degenerativen Prozessen	25
1.4. Fragestellung der Arbeit	28
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>29</b>
2.1. Technische Ausstattung, Lösungen, Reagenzien, Chemikalien, Antikörper	29
2.2. Mauslinien und Genotypisierung	29
2.3. Präparation von Mäusen und Gewebeentnahme	30
2.4. Immunhistochemie	31
2.5. Quantitative Analyse	33
2.6. Immunoelektronenmikroskopie	34
2.7. Statistische Analyse	35

<b>3. Ergebnisse</b>	<b>36</b>
3.1. Die Anzahl denervierter neuromuskulärer Endplatten ist erhöht in Myelin Mutanten	36
3.2 Makrophagen sind räumlich assoziiert mit der neuromuskulären Endplatte in Myelin Mutanten	40
3.2.1. Ultrastrukturelle Charakterisierung der Makrophagen-Endplatten- Assoziation	45
3.2.2. Ultrastruktureller Nachweis morphologischer Veränderungen präsynaptischer Terminalien Cx32 defizienter Mutanten	47
3.3. Die Anzahl an Makrophagen ist in den Gesamtmuskeln von Myelin Mutanten im Vergleich zu Wildtypen nicht signifikant verändert	48
3.4. Im Krankheitsverlauf nehmen pathologische Merkmale (Denervation, Makrophagen-Endplatten-Assoziation) an der neuromuskulären Endplatte sowie im Muskel in P0het Mutanten zu	50
3.5. Makrophagen-Endplatten-Assoziation und Denervation von Endplatten nehmen im Rahmen des Alterungsprozesses im Wildtyp zu	53
3.6. CSF-1 Defizienz bewirkt eine Reduktion von Makrophagen im Muskel, an der neuromuskulären Endplatte und von denervierten Endplatten bei Cx32het Myelin Mutanten	55
3.7. Die Reduktion der MCP-1 Expression bewirkt eine Abnahme der Makrophagen-Endplatten Assoziation und Denervation von Endplatten in Cx32def Myelin Mutanten	59
3.8. Defizienz des neurotrophen Faktors CNTF bewirkt eine Zunahme der Makrophagen-Endplatten-Assoziation und eine Zunahme an Denervation	62

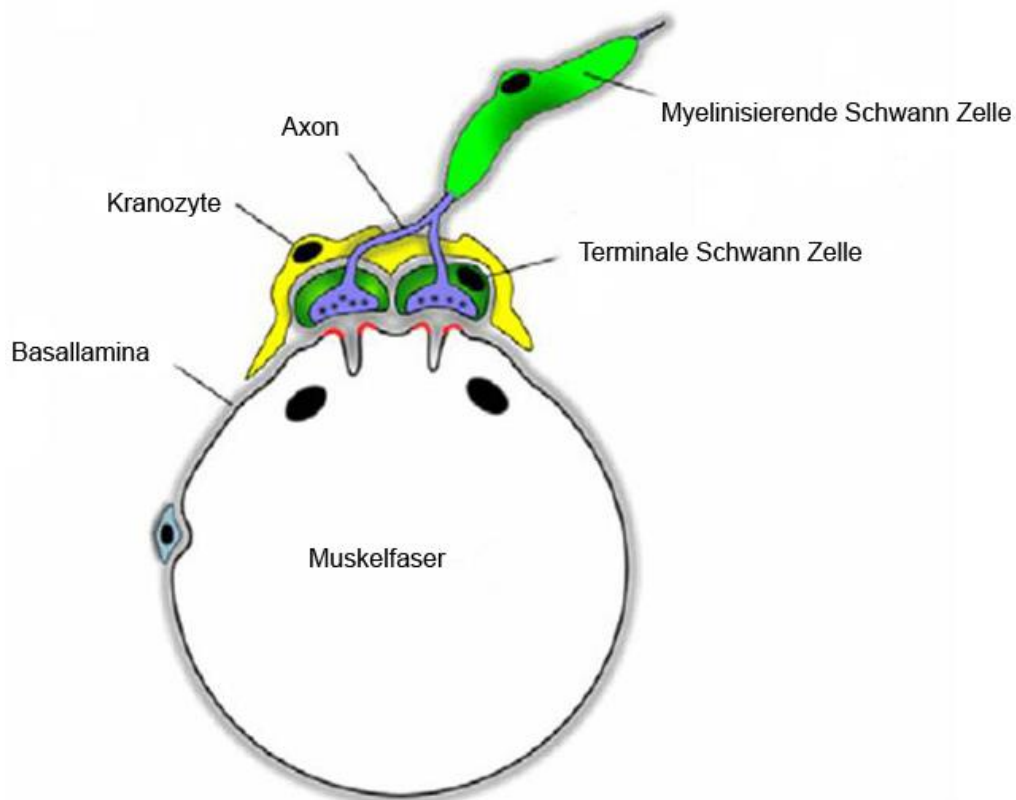
<b>4. Diskussion</b>	<b>65</b>
4.1. Makrophagen als mögliche pathogene Mediatoren an der neuromuskulären Endplatte in Mausmodellen der Charcot-Marie-Tooth Neuropathie	65
4.1.1. Die neuromuskuläre Endplatte ist ein selektives Ziel für die räumliche Assoziation von Makrophagen in CMT	66
4.1.2. Die Assoziation von Makrophagen mit motorischen Endplatten korreliert mit auftretender Denervation	70
4.2. CSF-1 und MCP-1 sind wichtige Mediatoren für Makrophagen-assoziierte Denervation von neuromuskulären Endplatten in Mausmodellen für CMT	74
4.3. Die neuromuskuläre Endplatte als unterschätztes Ziel Makrophagen-assoziiierter Pathogenese in neurodegenerativen Prozessen und neurologischen Erkrankungen	76
4.4. Die Bedeutung von Makrophagen-Endplatten-Assoziation und Denervation von Endplatten im Wildtyp	79
4.5. Schlussfolgerungen für mögliche Therapieoptionen	83
4.6. Synopsis	85
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>88</b>
<b>6. Anhang</b>	<b>90</b>
6.1. Ausstattung und Materialien	90
6.1.1. Technische Ausstattung	90
6.1.2. Lösungen, Reagenzien, Chemikalien	92
6.1.3. Antikörper	94
6.2. Abkürzungsverzeichnis	95
<b>7. Literaturverzeichnis</b>	<b>98</b>
<b>Danksagung</b>	
<b>Lebenslauf</b>	

# 1. Einleitung

## 1.1. Neuromuskuläre Endplatte

### 1.1.1. Aufbau und Entwicklung der neuromuskulären Endplatte

Die neuromuskuläre Endplatte (synonym neuromuskuläre Junction (NMJ), motorische Endplatte) ist eine hoch spezialisierte Struktur, welche die effiziente Übertragung elektrischer Impulse vom motorischen Neuron auf den Skelettmuskel und damit dessen Kontraktion ermöglicht. Aufgrund ihrer leichten experimentellen Zugänglichkeit ist sie die Synapse, die wissenschaftlich am längsten und besten erforscht ist (Dale et al., 1936; Sanes and Lichtman, 1999).



**Abb. 1: Schema einer neuromuskulären Endplatte**

Beziehung zwischen den vier am Aufbau der NMJ beteiligten Zellarten: Muskelfaser, motorische Nervenendigung, terminale Schwann Zelle, Kranozyte.  
Modifiziert nach Court et al., 2008

Die neuromuskuläre Endplatte ist aus drei Hauptkomponenten mit vier verschiedenen zellulären Elementen aufgebaut: (1) der präsynaptischen Nervenendigung eines motorischen Neurons, die von terminalen Schwann Zellen (tSC) (Kang et al., 2003) und Kranozyten (Court et al., 2008b) bedeckt ist, (2) dem synaptischen Spalt und (3) der spezialisierten postsynaptischen Membran des Skelettmuskels.

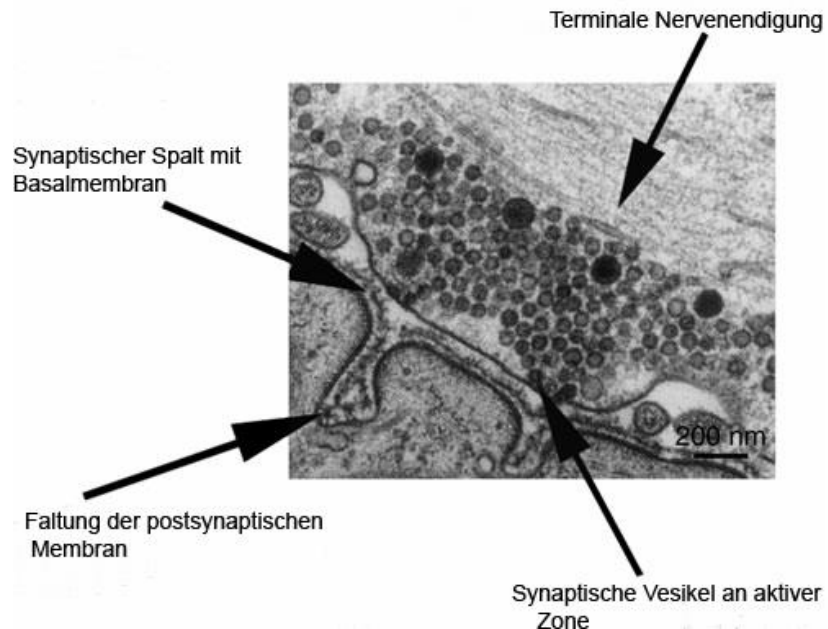
Die Präsynapse wird durch ein motorisches Neuron gebildet, dessen Zellkern im Hirnstamm oder im Vorderhorn des Rückenmarks lokalisiert ist. Jedes Motoneuron besitzt ein myelinisiertes Axon, das innerhalb des jeweiligen peripheren Nerven zum Muskel zieht (Hughes et al., 2006). Die das Axon umgebende Myelinscheide wird von myelinisierenden Schwann Zellen gebildet und dient der schnellen und stabilen Weiterleitung von Aktionspotenzialen (Martini, 2001). An der Stelle, wo das Axon den Muskel erreicht, verzweigt es sich vielfach in feine Äste, bevor es eine Muskelfaser innerviert und mit dieser eine neuromuskuläre Endplatte bildet. Der terminale Abschnitt des Axons ist von einer nicht-myelinisierenden, terminalen Schwann Zelle umgeben (Hughes et al., 2006).

Die terminale Schwann Zelle ist von einer Basallamina bedeckt, die an der Grenze der NMJ mit der Basallamina der Muskelfaser fusioniert (Tintignac et al., 2015) und die Präsynapse von umliegendem Bindegewebe trennt (Birks et al., 1960). Außerdem produzieren tSC den neurotrophen Faktor CNTF (ciliary neurotrophic factor) und tragen dadurch zum Wachstum des terminalen Nervenendes, axonalem Sprouting und Stabilisierung der NMJ bei (Hughes et al., 2006; Simon et al., 2010).

Den tSC liegen Kranozyten auf, die nicht von Basallamina bedeckt sind. Diese CD 34+ Kranozyten wurden bereits im Jahre 1991 von Weis et al. als perisynaptische Fibroblasten charakterisiert, die als Reaktion auf eine Denervation von Muskelfasern große Mengen an Adhäsionsmolekülen wie N-CAM oder Fibronektin produzieren und somit eine Rolle bei synaptischen Regenerationsprozessen spielen können (Weis et al., 1991). Court et al. bezeichneten diese Zellen entsprechend ihrer Lokalisation als Kranozyten



(abgeleitet aus dem Griechischen κρανος = Helm) und beschrieben sie als integrales zelluläres Element der NMJ, das eine bedeutende Rolle in Entwicklung, Aufrechterhaltung und Plastizität der neuromuskulären Synapse spielt (Court et al., 2008b).



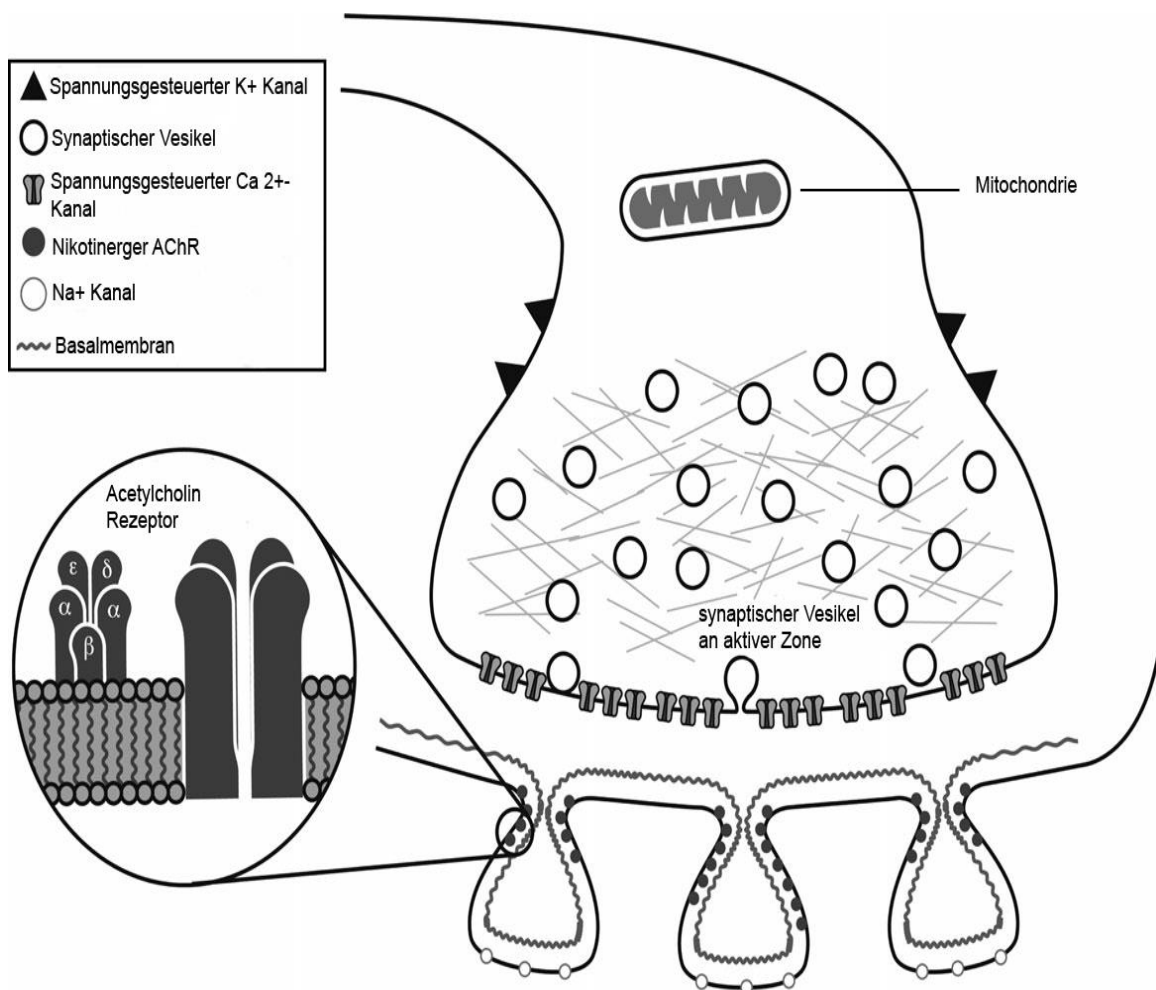
**Abb. 2: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme der NMJ**

Die ultrastrukturelle Darstellung zeigt die präsynaptische Nervenendigung mit synaptischen Vesikeln, dem synaptischen Spalt und der Postsynapse mit charakteristischer Faltung. Modifiziert nach Hirsch, 2007

Die präsynaptische Nervenendigung hat als wesentliche Funktion die Freisetzung von Neurotransmittern und enthält daher als wichtigste Strukturen synaptische Vesikel (Hirsch, 2007). Synaptische Vesikel haben einen Durchmesser von ca. 50 nm und beinhalten jeweils 5 000-10 000 Moleküle des Neurotransmitters Acetylcholin. Diese Vesikel sind präzise im Bereich der sogenannten aktiven Zonen lokalisiert, i.e. Regionen der präsynaptischen Membran, von denen aus die Transmitterfreisetzung erfolgt. Darüber hinaus enthält die terminale Nervenendigung eine Vielzahl an Mitochondrien, welche die Energie für Synthese und Freisetzung von Acetylcholin bereitstellen. Außerdem beinhaltet die präsynaptische Terminalie spezialisierte, für die Transmitterfreisetzung bedeutsame Proteine (Sanes and Lichtman, 1999),

sowie Kalium (K<sup>+</sup>)-, Natrium (Na<sup>+</sup>)- und spannungsgesteuerte Kalzium (Ca<sup>2+</sup>) - Kanäle (Hirsch, 2007).

Als synaptischen Spalt bezeichnet man den Raum zwischen der präsynaptischen Terminalie und der postsynaptischen Membran, der ca. 50-80 nm misst (Tintignac et al., 2015).



**Abb. 3: Komponenten der NMJ**

Die Abbildung zeigt die Präsynapse mit Zellorganellen, Ionen-Kanälen und synaptischen Vesikeln an aktiven Zonen; ebenso ist die Postsynapse mit gefalteter Membran zu sehen und die Lokalisation von Acetylcholinrezeptoren mit charakteristischer Pentamer-Struktur. Modifiziert nach Hirsch, 2007

Im synaptischen Spalt befindet sich die Basallamina, die Strukturproteine wie Laminin und Kollagen beinhaltet sowie die Acetylcholinesterase (AChE)

(Hughes et al., 2006). Außerdem sind innerhalb des synaptischen Spaltes komplexe Proteine wie Agrin und Rapsyn (Naguib et al., 2002) lokalisiert, die an der Steuerung von Integrität, Formation und Gruppierung von postsynaptischen Acetylcholin-Rezeptoren beteiligt sind (Hirsch, 2007).

Die postsynaptische Membran der Skelettmuskelfaser zeigt charakteristische synaptische Faltungen, die der Oberflächenvergrößerung dienen (Tintignac et al., 2015). An der postsynaptischen Membran sind direkt gegenüber der aktiven Zonen der Präsynapse nikotinerge Acetylcholin-Rezeptoren (nAChR) lokalisiert, welche, die Übertragung von ACh von der Präsynapse auf die Postsynapse sicherstellen (Hirsch, 2007).

Die AChR sind in Clustern mit einer Dichte von ca. 10 000 Rezeptoren/ $\mu\text{m}^2$  angeordnet. Nikotinerge AChR gehören zur Familie der Transmembranproteine und sind durch die Bindung von Nikotin aktivierbar, wodurch sie auch ihre Bezeichnung erhielten (Kandel et al., 2013). Es handelt sich um Ionenkanäle, die aus 5 Untereinheiten bestehen ( $\alpha\beta\delta\epsilon$ ). Diese Untereinheiten bilden eine zentral liegende transmembrane Pore und besitzen zwei Bindestellen für ACh (auf der  $\alpha\delta$ -Untereinheit und  $\alpha\epsilon$ -Untereinheit) (Hirsch, 2007). Die Bindung von ACh an den Rezeptor führt zu einer Änderung der Formation der Untereinheiten und somit auch zu einer Änderung der Ionendurchlässigkeit (Kandel et al., 2013).

Die NMJ entwickelt sich bereits während der Embryogenese und stellt zum Zeitpunkt der Geburt eine ausgereifte und funktionierende Struktur dar. Dabei entwickeln sich die verschiedenen Zellarten der NMJ aus unterschiedlichen Vorläuferzellen. Myoblasten, die Vorläufer der Skelettmuskelzellen, gehen aus den Somiten des Mesoderms hervor, motorische Axone aus den Zellkörpern des Neuralrohres und Schwann Zellen aus der Neuralleiste (Sanes and Lichtman, 1999). In den ersten postnatalen Wochen treten Reifungsprozesse wie Elimination von Synapsen auf. Das führt letztlich dazu, dass jede NMJ von einem einzigen Axon innerviert wird. Weitere Reifungsprozesse umfassen

Akkumulation von SV an aktiven Zonen, Myelin Formation und Faltung der Postsynapse. Diese sind zwar mehr struktureller Natur, haben aber starke Auswirkungen auf die korrekte Funktion der Synapsen (Sanes and Lichtman, 1999).

Basierend auf der Entwicklung der NMJ lässt sich schlussfolgern, dass beispielsweise hereditäre Erkrankungen, die eine der Zellarten der NMJ, deren Vorläuferzelle oder Gene betreffen, zu einer frühen Entwicklungsstörung der neuromuskulären Endplatte führen können. Diese Entwicklungsstörung der NMJ kann sich im weiteren Verlauf auf die Funktion des gesamten neuromuskulären Systems auswirken.

### **1.1.2. Neuromuskuläre Transmission**

Der initiale Schritt einer Bewegung besteht in der Generierung eines elektrischen Impulses in Form eines Aktionspotenzials im primären Motoneuron, das im primär motorischen Cortex lokalisiert ist. Dieses Aktionspotenzial wird innerhalb des Axons im Verlauf des Corticospinalen Traktes weitergeleitet und auf das im Vorderhorn des Rückenmarks liegende zweite Motoneuron synaptisch übertragen (Kandel et al., 2013). Das Eintreffen des Aktionspotenzials in der terminalen Nervenendigung bewirkt, dass sich die spannungsgesteuerten  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle, die regelmäßig im Bereich der aktiven Zonen lokalisiert sind, öffnen. Entsprechend eines chemischen und elektrischen Gradienten kommt es zu einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in die präsynaptische Terminalie. Der daraus resultierende Anstieg des freien  $\text{Ca}^{2+}$  führt zu einer Mobilisierung der synaptischen Vesikel (SV) vom Zytoskelett, einer Fusion der SV mit der Zellmembran im Bereich der aktiven Zonen und einer Freisetzung von ACh in den synaptischen Spalt (Tintignac et al., 2015). An diesem Prozess der Mobilisierung und Fusion der SV sind spezialisierte Proteine wie Synapsin und der sog. SNARE-Komplex (soluble N-Ethylmaleimide sensitive factor attachment receptor) beteiligt. Im Rahmen eines Aktionspotenzials werden in der Regel ca. 50-300 SV aus der Präsynapse entleert (Hirsch, 2007).

Das präsynaptisch freigesetzte ACh diffundiert durch den synaptischen Spalt zur postsynaptischen Membran (Tintignac et al., 2015). AChE ist in relativ hohen Konzentrationen im synaptischen Spalt vorhanden, um durch Hydrolyse von ACh zu verhindern, dass die postsynaptischen AChR mehr als einmal durch das im Rahmen eines Aktionspotenzials freigesetzte ACh aktiviert werden (Tintignac et al., 2015).

Sobald jede der beiden o.g. Untereinheiten des AChR ein ACh-Molekül gebunden hat, öffnet sich die zentrale Ionenpore und Natrium gelangt in das Innere der postsynaptischen Muskelfaser (Hirsch, 2007). Daraufhin wird die Depolarisation der Zellmembran ausgelöst, weitere Na<sup>+</sup>-Kanäle öffnen sich und das Aktionspotenzial wird entlang der Muskeloberfläche weitergeleitet. Die elektrische Aktivität breitet sich auf die umliegenden Muskelfasern aus und resultiert schließlich über die elektromechanische Kopplung in der Kontraktion des Muskels (Hirsch, 2007).

## **1.2. Charcot-Marie-Tooth Erkrankung (CMT)**

### **1.2.1. Klassifikation und klinische Aspekte**

Die Charcot-Marie-Tooth Erkrankung (CMT), die auch als hereditäre motorisch sensorische Neuropathie (HMSN) bezeichnet wird, ist die häufigste, erbliche neurologische Erkrankung. Ihre Prävalenz in der Bevölkerung liegt bei 1:2500 (Skre, 1974). Benannt wurde die Erkrankung nach den Neurologen Jean-Martin Charcot und Pierre Marie aus Frankreich (Charcot and Marie, 1886) sowie Howard Tooth aus England (Tooth, 1886), welche die pathologische Entität der CMT erstmals und voneinander unabhängig im Jahre 1886 beschrieben haben. In den folgenden Jahrzehnten folgte eine Vielzahl an klinischen und pathologischen Beschreibungen von hereditären sensorischen und motorischen Neuropathien. In den 1970er/1980er Jahren konnten Patienten mit Hilfe elektrophysiologischer Messung der Nervenleitgeschwindigkeit (NLG) erstmals zwei verschiedenen Gruppen von CMT zugeordnet werden. Patienten mit einer verlangsamten NLG (< 38m/s) wurden der Form CMT1 zugeordnet, während

Patienten mit normaler oder moderat reduzierter NLG, aber verringerten Muskelsummenaktionspotenzialen, der CMT2 zugeordnet wurden (Dyck and Lambert, 1968; Harding and Thomas, 1980b). Als neuropathologische Unterschiede treten bei CMT1 segmentale Demyelinisierung und hypertrophe Veränderungen auf, bei CMT2 kommt es zu einer axonalen Degeneration.

Aufgrund der ausgeprägten genotypischen und phänotypischen Heterogenität, ist eine Einteilung der HMSN kompliziert. Basierend auf der Art der Vererbung, dem mutierten Gen und elektrophysiologischen Auffälligkeiten werden die HMSN in folgende Hauptformen eingeteilt: die autosomal-dominante/ x-chromosomale, demyelinisierende CMT1, autosomal-dominante, axonale CMT2, CMT3 (umfasst das Dejerine-Sottas-Syndrom und die kongenitale hypomyelinisierende Neuropathie) sowie die autosomal-rezessive CMT4. In Europa und großen Teilen der USA folgen mehr als 90% der CMT-Fälle einem autosomal-dominanten oder x-chromosomalen Erbgang, wobei die Prävalenz dominanter Fälle überwiegt (Braathen, 2012). Die demyelinisierende CMT1 ist mit > 60% die häufigste Form, gefolgt von der axonalen CMT (Gess et al., 2013; Rossor et al., 2013). Im Folgenden werden die häufigsten Formen der CMT genauer beschrieben. Weitere, seltene Unterformen sind der **Tabelle 1** zu entnehmen.

CMT1A stellt mit ca. 80% aller CMT1 Patienten die häufigste Form der CMT dar (Saporta et al., 2011). CMT1A wird durch eine 1.5-Mb Duplikation auf Chromosom 17 verursacht, die ein Gen beinhaltet, das für das periphere Myelin Protein PMP 22 kodiert. Etwa 10% der CMT1A Fälle treten sporadisch auf (Reilly and Shy, 2009). Die Mehrheit der CMT1A Patienten präsentieren einen "klassischen CMT Phänotyp", der einen symmetrischen und langsam progressiven Verlauf zeigt. Patienten mit klassischer CMT lernen normalerweise zeitgerecht mit 12-15 Monaten zu Laufen und entwickeln in den ersten beiden Lebensdekaden eine distal betonte Muskelschwäche und distal betonte Sensibilitätsausfälle (Harding and Thomas, 1980a; Saporta et al., 2011). Im weiteren Verlauf kommt es zu Gangstörungen (Steppergang) und

Stürzen aufgrund der Muskelschwäche sowie distal betonter Muskelatrophie. Die obere Extremität ist typischerweise erst später im Krankheitsverlauf betroffen und kann das Bild der sog. Krallenhand präsentieren. 20-30% der Patienten beklagen muskuloskeletale, neuropathische Schmerzsymptome oder Muskelkrämpfe. Weitere Charakteristika sind verminderte oder fehlende Muskeleigenreflexe, Ataxie, Tremor und Skelettdeformitäten wie Hammerzehe, Krallenzehe, Skoliose und Pes Cavus (siehe **Abb. 4**). Viele Patienten benötigen im Langzeitverlauf zwar Hilfsmittel wie Fuß-Orthesen, eine Rollstuhlpflichtigkeit ergibt sich aber nur in seltenen Fällen. Die motorische NLG liegt bei unter 38m/s (Tazir et al., 2014). In Nervenbiopsaten, die durch Fortschritte der molekular-genetischen Techniken kaum noch durchgeführt werden, findet man Zeichen der Demyelinisierung und abnorme Myelinisierung wie "Zwiebelschalen-Formation", die auf überzählige Schwann-Zellen zurückzuführen ist (Braathen, 2012).



**Abb. 4: Muskuloskeletale Charakteristika der Charcot-Marie-Tooth Erkrankung**  
(A) und (B) Fußdeformitäten eines CMT1A Patienten: Pes Cavus, Hammerzehen und Kallusbildung, (C) Krallenhandbildung durch Atrophie der intrinsischen Handmuskeln

(D) Thenar,-und Hypothenaratrophie, (E) Pes Cavus und Atrophie der Wadenmuskulatur, (F) Fußheberschwäche und Atrophie der Wadenmuskulatur (Pareyson et al., 2006)

CMT1B ist auf eine Mutation des Myelin Proteins Zero (MPZ/P0) zurückzuführen und tritt mit einer Häufigkeit von ca. 5% auf. Für diese Form sind verschiedene Verläufe bekannt. Bei etwa der Hälfte der Patienten treten erste Symptome im Erwachsenenalter auf und die Erkrankung verläuft mild bei annähernd normaler motorischer NLG. Etwa 35% der Patienten leiden an einer early-onset Form mit Beginn der Symptomatik im frühen Kindesalter und deutlich reduzierter motorischer NLG (< 15m/s). Diese Patienten beginnen normalerweise verspätet zu Laufen und sind so schwer beeinträchtigt, dass sie häufig im Alter von 20 Jahren bereits auf Gehstützen oder einen Rollstuhl angewiesen sind. Ein kleiner Teil der Patienten (ca. 15%) präsentieren einen "klassischen CMT Phänotyp" (Saporta et al., 2011).

CMT1X ist mit ca. 12% die zweit häufigste Form von CMT (Saporta et al., 2011). CMT1X folgt einem x-chromosomalen Erbgang und wird durch eine Mutation des *Gap Junction Protein Beta 1 (GJB1)* Gens verursacht, das für Connexin 32 (Cx32) kodiert. Männer sind typischerweise schwerer betroffen als Frauen. Mehr als die Hälfte der Patienten präsentieren den "klassischen CMT Phänotyp" und haben eine intermediäre motorische NLG zwischen 30 und 45 m/s. Da Cx32 nicht nur von myelinisierenden Schwann Zellen, sondern auch von Oligodendrozyten exprimiert wird, kann bei CMT1X Patienten in seltenen Fällen auch eine Beteiligung des Zentralnervensystems auftreten, wie milde Schwerhörigkeit, abnorme evozierte Hirnstammpotenziale, Ataxie und Dysarthrie (Reilly and Shy, 2009).

Die CMT2 sind eine Gruppe von Erkrankungen, die einem autosomal-dominanten Erbgang folgen und durch Mutationen verschiedener Gene hervorgerufen werden (siehe **Tabelle 1**). Patienten mit CMT2 zeigen typischerweise normale bzw. moderat reduzierte NLG in der elektrophysiologischen Untersuchung und Zeichen der axonalen Degeneration



in der Nervenbiopsie. Der Zeitpunkt der Krankheitsmanifestation variiert sehr stark und in Abhängigkeit des betroffenen Gens und kann in den ersten sechs Lebensmonaten liegen (CMT2A und 2C) oder auch im späten Erwachsenenalter (CMT2F und 2J). Auch die phänotypische Erscheinung variiert abhängig vom entsprechenden Genotyp. Patienten mit CMT2F und G präsentieren einen "klassischen CMT-Phänotyp", während beispielsweise die CMT2B einen ausgeprägten Sensibilitätsverlust nach sich zieht, der zu Fußulzerationen, Arthropathie bis hin zu Amputationen führt. Bei Patienten mit CMT2A kommt es zu Beteiligung des Nervus opticus und des Zentralnervensystems, während bei CMT2C eher das motorische System beeinträchtigt ist mit Beteiligung der Stimmbänder, des Zwerchfells und der respiratorischen Funktion (Tazir et al., 2014).

CMT3 umfasst das Dejerine-Sottas-Syndrom (DSS) sowie die kongenitale hypomyelinisierende Neuropathie (CHN). CMT3 folgt in den meisten Fällen einem autosomal-rezessiven Erbgang (dann nach neuer Definition als CMT4 bezeichnet), jedoch gehen auch viele Fälle von DSS und CHN auf autosomal-dominante de novo Mutationen zurück (Reilly and Shy, 2009). Als Ursache sind u.a. Mutationen der Myelin Proteine P0, PMP22 und Periaxin zu nennen. Die Erkrankungen DSS und CHN sind assoziiert mit einem Erkrankungsbeginn in der frühen Kindheit mit meist schwerem Verlauf. Bei den meisten Patienten tritt frühzeitig eine deutliche Einschränkung der Gehfähigkeit bis hin zur Rollstuhlpflichtigkeit auf sowie eine respiratorische Insuffizienz. Die Nervenleitgeschwindigkeit liegt in der Regel bei < 15 m/s (Tazir et al., 2014).

Die autosomal-rezessive CMT4 macht weniger als 10% der CMT Erkrankungen aus. In den meisten Fällen handelt es sich um demyelinisierende Erkrankungen, jedoch können auch axonale Verlaufsformen vorkommen (Bernard et al., 2006). CMT4 manifestiert sich häufig bereits in der frühen Kindheit und zeigt einen schweren Verlauf mit frühzeitigen Paresen der proximalen Muskulatur und Verlust der Gehfähigkeit. Typisch ist außerdem das Auftreten von Skelettdeformitäten wie Skoliose. In manchen Fällen kann es zur

Entstehung einer respiratorischen Insuffizienz, eines Glaukoms oder einer Neutropenie kommen (Pareyson et al., 2006; Reilly and Shy, 2009; Tazir et al., 2014)

### 1.2.2. Pathogenese

Die Charcot-Marie-Tooth Neuropathien sind auf Mutationen verschiedener Gene zurückzuführen (s. Tabelle 1). Mittlerweile wurden über 80 Gene als Ursache der CMT Neuropathien identifiziert (Brennan et al., 2015). Entsprechende Genprodukte umfassen Moleküle, die an der Aufrechterhaltung der normalen Funktion peripherer Nerven beteiligt sind. Molekulare Interaktionswege, die eine Rolle an der Pathogenese der CMT spielen, sind Regulation der Transkription, Protein-Umsatz, Schwann-Zell-Axon-Interaktion, axonaler Transport, mitochondriale Fusion und Teilung sowie chronische Inflammationsprozesse (Patzko and Shy, 2011).

<b>CMT-Form</b>	<b>Unterform</b>	<b>Gen</b>	<b>Chromosom</b>	<b>Lokalisation des Genprodukts</b>
Autosomal-dominant demyelisierende CMT (CMT1)	CMT1A	PMP22	17p11	Myelin
	CMT1B	MPZ	1q22	Myelin
	CMT1C	LITAF	16p13	Zytoplasma (S)
	CMT1D	EGR2	10q21	Zellkern (S)
	CMT1E	PMP22	17p11	Myelin
	CMT1F	NEFL	8q21	Axon
x-chromosomal demyelisierende CMT (CMT1)	CMT1X	GJB1	Xq13	Gap Junction
	CMTX2		Xq22	
	CMTX3		Xq26	
	CMTX4		Xq24-26	
	CMTX5		Xq22-24	
Autosomal-dominant axonale CMT (CMT2)	CMT2A	MFN2	1q36	Mitochondrien (N)
	CMT2B	RAB7	3q21	Zytoplasma (N)
	CMT2C	TRPV4	12q23-24	Kanal (N)
	CMT2D	GARS	7p15	Zellkern (N)
	CMT2E	NEFL	8p21	Axon

	CMT2F	HSP27	7q11	Proteasom (N)
	CMT2G		12q12-13.3	
	CMT2J	MPZ	1q22	Myelin
Autosomal-rezessiv demyelinisierende CMT (CMT4)	CMT4A	GDAP1	8q13	Mitochondrien (N+S)
	CMT4B1	MTMR2	11q22	Zytoplasma (S)
	CMT4B2	MITMR13	11p15	Zytoplasma (S)
	CMT4C	SH3TC2	5q32	Zytoplasma (S)
	CMT4D	NDRG1	8q24	Zytoplasma (S)
	CMT4E	ERG2	10q21	Zellkern (S)
	CMT4F	Periaxin	19q13	Zytoskelett (S)
	CMT4H	FGD4	12p11.21	Zytoskelett (S)
	CMT4J	FIG4	6q21	Zytoplasma (S)
Dominant intermediäre CMT (DI-CMT)	CMTA		10q24.1-25.1	
	CMTB	DNM2	19p12	Zytoplasma (N+S)
	CMTC	YARS	1p34	Zellkern (N)

**Tabelle 1: Klassifikation der Charcot-Marie-Tooth Erkrankung (CMT)**

Auswahl mutierter Gene, Genloki und zellulärer Lokalisation der Genprodukte  
 Abkürzungen: N=Neuron, S= Schwann Zelle, übrige Abkürzungen siehe Anhang  
 (Reilly and Hanna, 2002) (Rossor et al., 2013)

Einige der kausalen Genmutationen betreffen PNS-spezifische Proteine wie PMP22, P0 und Periaxin, während andere Genprodukte nicht ausschließlich im PNS exprimiert werden, wie z.B. Cx32, GARS und HSP27. Darüber hinaus sind Mutationen bekannt, die sowohl zu demyelinisierenden als auch zu axonalen Neuropathien führen können (P0 und GJB1). Durch die Tatsache, dass alle demyelinisierenden CMT-Formen auch mit einer Schädigung von Axonen einhergehen, wird die große Bedeutung der Myelinscheide bzw. der Schwann Zell Integrität für die axonale Funktion und Unversehrtheit deutlich (Martini, 2001) (Patzko and Shy, 2011).

Mehr als 90% der genetisch getesteten Patienten weisen Mutationen in einem der folgenden Gene auf: PMP22, GJB1 und MPZ (Brennan et al., 2015) . Daher wurde in der vorliegenden Arbeit der Fokus auf diese Mutationen gelegt und auch die nachfolgenden Beschreibungen beziehen sich in erster Linie auf die demyelinisierenden Formen der CMT.

### **1.2.2.1. Die Rolle von PMP22, P0 und Cx32 bei der Pathogenese der CMT**

Die meisten peripheren Nerven sind gemischte Nerven und enthalten sowohl sensorische wie auch motorische Axone, die ihrer Länge nach von einer Myelinscheide umhüllt sind (Brennan et al., 2015). Bei der Myelinscheide handelt es sich um eine Spirale spezialisierter Zellmembranen, die ein Segment eines Axons umhüllt, das einen Durchmesser von mehr als 1  $\mu\text{m}$  hat. Im peripheren Nervensystem sind Schwann Zellen die myelinisierende Zellart (Suter and Scherer, 2003). Die Hauptfunktion des Myelins ist die Erhöhung der Nervenleitgeschwindigkeit des Axons bei möglichst geringem Axondurchmesser (Brennan et al., 2015). Myelin fungiert hierbei als elektrischer Isolator, wodurch der Prozess der saltatorischen Erregungsleitung ermöglicht wird. Hierbei springt die Erregung der Nerven zwischen elektrisch erregbaren, unmyelinisierten Regionen des Axons. Diese Regionen werden als Ranvier'sche Schnürringe bezeichnet und befinden sich zwischen myelinisierten axonalen Regionen. Die Myelinscheide besteht aus zwei verschiedenen Regionen, die sich in der Zusammensetzung ihrer Proteine unterscheiden: kompaktes und nicht-kompaktes Myelin (Scherer and Wrabetz, 2008; Brennan et al., 2015). Kompaktes Myelin ist aus eng gepackten Membranen zusammengesetzt und besteht in erster Linie aus Lipiden v.a. Cholesterol, Sphingolipiden, außerdem Galaktozerebroside und Sulfatide. Darüber hinaus beinhaltet kompaktes Myelin die Strukturproteine PMP22, P0 und MBP. Nicht-kompaktes Myelin ist im Bereich der Schmidt-Lantermann-Einkerbungen und um die paranodale Region, d.h. in Bereichen, die sich unmittelbar an den Ranvier'schen Schnürring anschließen, herum lokalisiert und ist aus Cx32 und Myelin-assoziiertem Glykoprotein (MAG) zusammengesetzt. Diese Strukturproteine des Myelins sind an Schwann-Zell-Axon oder an Schwann-Zell-Schwann-Zell Interaktionen beteiligt und bewirken eine elektrische Isolation der nodalen Region. Zwischen Schwann Zellen und deren zugehörigen Axonen existiert eine kontinuierliche Kommunikation, die für die Initiierung und Aufrechterhaltung der normalen Myelinisierung sorgt. (Scherer and Wrabetz, 2008; Brennan et al., 2015). Die komplexe zelluläre Verbindung zwischen Schwann Zellen und Axonen kann in vielerlei Hinsicht mit der neuromuskulären Endplatte verglichen werden. In

beiden Fällen handelt es sich um hoch entwickelte Systeme, die durch die Interaktion verschiedener Zellkomponenten entstehen und eine spezifische biologische Funktion im Bereich der Neurotransmission erfüllen (Shy et al., 2002). Sind im Rahmen genetischer Mutationen Strukturproteine des Myelins verändert, so entsteht das molekulare und klinische Bild einer hereditären Neuropathie.

PMP22 ist ein hydrophobes 22-kDa Membran-Glykoprotein des kompakten Myelins und besteht aus 160 Aminosäuren. Es ist aus 4 transmembranären Domänen aufgebaut und macht 2-5% des Myelins des PNS aus. PMP22 spielt eine essentielle Rolle in der Synthese und Stabilisierung von Myelin und bereits geringfügige Veränderungen dessen korrekter Stöchiometrie führen zu einer Störung der Myelinintegrität (Brennan et al., 2015). PMP22 ist zudem an der Modulation von Wachstumsprozessen während der Myelinisierung beteiligt, indem es Zellproliferation, Zelldifferenzierung sowie den kontrollierten Zelltod reguliert (Brancolini et al., 1999; Brancolini et al., 2000). Darüber hinaus wird die Expression von PMP22 während der Proliferation von Schwann Zellen hoch reguliert und ist offenbar an der Steuerung des Zellzyklus und der DNA Replikation beteiligt (Giambonini-Brugnoli et al., 2005) (Watila and Balarabe, 2015). Patienten mit CMT1A besitzen größere Mengen an PMP22 in ihrem peripheren Myelin, wodurch eine strukturell instabile Myelinscheide entsteht (Shy et al., 2002). Der Grund, weswegen eine Duplikation von PMP22 den charakteristischen Phänotyp der CMT1A hervorruft, ist ein Effekt der Gen-Dosis. Eine toxische Funktionsverstärkung ("*toxic gain of function*") scheint verantwortlich für Demyelinisierung und Funktionsstörung peripherer Nerven zu sein. In Experimenten sowohl mit tierischen wie auch mit menschlichen Schwann Zellen, wirkt sich die PMP22 Überexpression und Akkumulation hemmend auf verschiedene molekulare Signalwege aus. Dies resultiert in einer Funktionsstörung verschiedener Zellorganellen wie Proteasomen, Lysosomen und endoplasmatisches Retikulum, was zur Akkumulation von abnormen Proteinaggregaten in betroffene Nerven und autolysosomalen Abbauprozessen führt (Notterpek et al., 1999; Fortun et al., 2006). Diese Mechanismen bewirken

eine gestörte Synthese von Schwann Zellen, verfrühte Schwann Zell Apoptose und letztlich Instabilisierung und Verlust von funktionierendem Myelin (Watila and Balarabe, 2015).

Es sind verschiedene Tiermutanten bekannt, die generiert wurden um die Funktion von PMP22 zu untersuchen. Transgene Tiere, die zusätzliche Kopien des PMP22 Gens tragen, entwickeln eine demyelinisierende Neuropathie unterschiedlicher Ausprägung je nach Gendosis. In unseren Experimenten wurden transgene, PMP22 überexprimierende Mäuse (PMP22tg) des C61 Stammes verwendet. Diese Tiere tragen 4 Kopien des PMP22 Gens und zeigen sowohl bei elektronenmikroskopischer, elektrophysiologischer und auch bei histologischer Untersuchung vergleichbare pathologische Merkmale der Demyelinisierung wie CMT1A Patienten. Zu den histopathologischen Auffälligkeiten zählen dünnes Myelin, demyelinisierte Axone, überzählige Schwann Zellen und eine milde Hypermyelinisierung (Kobsar et al., 2005).

Punktmutationen des Gens, das für das Myelin Protein P0 kodiert und auf Chromosom 1 lokalisiert ist, können CMT1B und das schwerer verlaufende Dejerine-Sottas-Syndrom verursachen (Shy et al., 2002). Myelin Protein Zero (MPZ/P0) ist das Hauptprotein des PNS Myelins und macht 50-70% der Gesamtmenge an Myelin Protein aus (Greenfield et al., 1973; Wiggins et al., 1975). Es ist ein integrales Membran-Glykoprotein bestehend aus 219 Aminosäuren mit einer einzelnen transmembranären Domäne und einer molekularen Masse von 28 kDa. P0 wird von myelinisierenden Schwann Zellen exprimiert und ist Bestandteil des kompakten Myelins (Garbay et al., 2000). Das P0 Protein spielt eine Rolle als Zell-Adhäsions Molekül und außerdem fördert und erhält es die Formation des Myelins und die sehr enge Verdichtung des Myelins über homophile Interaktionen (Filbin et al., 1990). Die Funktion von P0 ist offenbar dosisabhängig und die meisten P0 Mutationen sind ähnlich wie PMP22 Mutationen mit einer toxischen Funktionsverstärkung ("*toxic gain of function*") oder einem Überwiegen negativer Effekte assoziiert. Ein reiner Funktionsverlust scheint nicht der ausschlaggebende Faktor in der Pathogenese P0-Defizienz assoziierter Erkrankungen zu sein (Berger et al., 2002).

Durch Giese et al. wurde 1992 das endogene P0 Gen auf Chromosom 1 von Mäusen durch inaktiviertes P0 Gen via homologer Rekombination in embryonalen Stammzellen ersetzt (Giese et al., 1992). Die daraus hervorgegangen homozygoten knockout Mäuse (P0def) entwickelten innerhalb der dritten postnatalen Woche einen pathologischen Phänotyp mit motorischen Koordinationsdefiziten, Tremor und gelegentlichen Krämpfen. In unserer Studie wurden heterozygote knockout Mäuse (P0het) als Modell für CMT1B verwendet. Diese zeigen zunächst eine normale Entwicklung und bilden schließlich nach dem vierten postnatalen Monat eine progressive Neuropathie mit Demyelinisierung und reduzierter Nervenleitgeschwindigkeit aus (Martini et al., 1995).

Cx32 ist ein Gap Junction Protein mit einer molekularen Masse von 32 kDa und vier hydrophoben Transmembran-Domänen. Es bildet hoch organisierte Hexamere (Connexone) in der Zellmembran von Schwann Zellen aus, die sich mit Connexonen gegenüberliegender Membranen verbinden und eine Pore formen. Diese Poren dienen zum Austausch von Ionen und kleinen Molekülen und mehrere solcher Poren zusammen bilden *gap junctions* aus (Martini and Schachner, 1997). Cx32 wird von unterschiedlichen Zellen exprimiert u.a. von Schwann Zellen, Hepatozyten und Oligodendrozyten (Scherer et al., 1995). Sein Gesamtanteil an allen Myelin Proteinen macht weniger als 0,5% aus und im peripheren Nervensystem ist es überwiegend in paranodalen Bereichen und in Schmidt-Lantermann Einkerbungen lokalisiert. Bei diesen handelt es sich um periodische Unterbrechungen des PNS Myelins (Scherer et al., 1995). Cx32 spielt durch den o.g. Mechanismus des Austauschs von Mikronährstoffen und Ionen eine Rolle bei der Myelinformation und -erhaltung. Möglicherweise wird über diesen Mechanismus auch das Axon mitversorgt, was die Kombination aus Demyelinisierung und axonaler Degeneration, die im Rahmen von Cx32 Mutationen bei CMT1X gemeinsam auftritt, erklären könnte (Bergoffen et al., 1993). Obwohl Cx32 in verschiedenen Organen vorkommt, leiden CMT1X Patienten nur unter Symptomen die das PNS betreffen. Dies könnte darauf

hindeuten, dass in anderen Organen die Funktion von Cx32 durch andere Connexine kompensiert wird (Martini and Schachner, 1997).

In unseren Experimenten wurden Cx32 defiziente Mäuse (Cx32def) als Modell für CMT1X verwendet (Nelles et al., 1996). Cx32def Mäuse entwickeln etwa im Alter von drei Monaten eine progressive Neuropathie mit vergleichbaren pathologischen Auffälligkeiten wie CMT1X Patienten. Zu diesen pathologischen Merkmalen zählen dünn myelinisierte oder demyelinisierte Axone und Schwann Zell Proliferation. Außerdem zeigen sich Myelin-Vakuolen und ausgeprägte Neurofilament Verdichtungen in Axonen als Zeichen der axonalen Degeneration (Kobsar et al., 2003).

#### **1.2.2.2. Einfluss des Immunsystems auf die Pathogenese der CMT**

Obwohl die verschiedenen Subtypen der demyelinisierenden Charcot-Marie-Tooth Neuropathien auf unterschiedliche genetische Mutationen zurückzuführen sind, findet man bei allen Subtypen ähnliche pathogenetische Merkmale wie Demyelinisierung, axonale Schädigung und Proliferation von Schwann Zellen, die zwiebelschalen-ähnliche Formationen ausbilden (sogenannte "*onion bulbs*") (Ip et al., 2006). Dies ist darauf zurückzuführen, dass durch die beschriebenen Genmutationen Zellen des Immunsystems aktiviert werden, die schließlich über eine gemeinsame pathogenetische Endstrecke zu einem ähnlichen Krankheitsbild führen. In Mausmodellen für CMT1 (PMP22tg, Cx32def und P0het Mutanten) kann ein deutlicher Anstieg von CD8+ T-Lymphozyten und Makrophagen in endoneuralen Strukturen gefunden werden (Ip et al., 2006). Im Rahmen des Krankheitsverlaufs der demyelinisierenden Neuropathie zeigt sich zudem eine weitere Zunahme dieser Immunzellen (Shy et al., 1997; Schmid et al., 2000; Kobsar et al., 2002; Kobsar et al., 2005). Um die Funktion der Lymphozyten zu untersuchen, wurden Myelin Mutanten mit RAG-1-defizienten Mäusen gekreuzt, die keine reifen B- und T-Lymphozyten besitzen (Mombaerts et al., 1992). Hierbei konnte beobachtet werden, dass das Fehlen von Lymphozyten eine deutliche Verbesserung der Demyelinisierung und Axonopathie bei Cx32def und P0het Mutanten bewirkt.



(Schmid et al., 2000; Kobsar et al., 2003; Ip et al., 2006). In PMP22tg Tieren zeigte sich jedoch keine Verbesserung.

In Myelin Mutanten wurde außerdem die Rolle von Makrophagen bei der Pathogenese von erblicher Demyelinisierung untersucht. Hierbei zeigen immunhistochemische Untersuchungen eine deutlich erhöhte Anzahl an Makrophagen in den peripheren Nerven in o.g. Mausmodellen für CMT1 im Vergleich zu Wildtyp Mäusen (Ip et al., 2006). Die Makrophagen befinden sich, wie immunoelektronenmikroskopische Aufnahmen demonstrieren, nicht nur im Endoneurium entsprechender Nerven, sondern innerhalb der Schwann Zell Basallaminae. (Carenini et al., 2001). Sie weisen häufig Myelin Reste in ihrem Zellkörper auf, was auf eine Phagozytose von Myelin seitens der Makrophagen hindeutet ("*foamy macrophages*"). Dabei zeigen Makrophagen bei Cx32def Tieren ausschließlich zu demyelinisierten Axonen und degeneriertem Myelin eine enge räumliche Assoziation (Kobsar et al., 2002). Im Unterschied dazu sind Makrophagen bei PMP22tg Mäusen (Kobsar et al., 2005) und P0het Mutanten (Carenini et al., 2001) auch mit morphologisch gänzlich unauffälligen Myelinscheiden räumlich eng verbunden und phagozytieren scheinbar intaktes Myelin. Das deutet darauf hin, dass bei Cx32 Defizienz ein etwas anderer pathogenetischer Signalweg an der Demyelinisierung involviert ist, als bei den beiden anderen Mutanten. Dennoch findet sich in allen drei CMT1 Mausmodellen ein einheitlicher pathogenetischer Prozess, der die Invasion von Immunzellen in Nervenstrukturen beinhaltet (Martini et al., 2008). Das weist darauf hin, dass unterschiedliche Myelinmutationen zu ähnlichen molekularen Reaktionen von Schwann Zellen führen, die ihrerseits wiederum eine Aktivierung und Einwanderung von Makrophagen ins Endoneurium bewirken. Somit scheinen Makrophagen eine aktive Rolle an der Demyelinisierung peripherer Nerven zu spielen (Carenini et al., 2001; Maurer et al., 2002). Von beschriebener Pathologie sind interessanterweise in erster Linie motorische Nerven betroffen, während sensorische Äste insgesamt deutlich weniger und höchstens milde Auffälligkeiten zeigen (Martini et al., 1995). Darüber hinaus findet man in sensorischen Nerven auch keine erhöhte Makrophagen Anzahl.

Studien unserer Arbeitsgruppe haben zudem gezeigt, dass Cx32def Mäuse im Vergleich zu Wildtyp Mäusen eine deutlich erhöhte Anzahl an denervierten neuromuskulären Endplatten besitzen (Groh et al., 2010; Groh et al., 2012). Ob und inwieweit Makrophagen an der Denervation beteiligt sind, und ob sich ähnliche Phänomene in anderen Myelin Mutanten nachweisen lassen, ist zum Zeitpunkt o.g. Studien nicht klar.

Es stellt sich die Frage welche Signale letztlich dazu führen, dass Makrophagen in die Nerven einwandern und aktiviert werden. Da Makrophagen die ersten Immunzellen sind, die in erhöhter Anzahl in beeinträchtigten Nerven von Myelin Mutanten nachweisbar sind, kann man annehmen, dass mutierte Schwann Zellen über spezifische Signale den Einstrom und die Aktivierung von Makrophagen vermitteln (Martini et al., 2008).

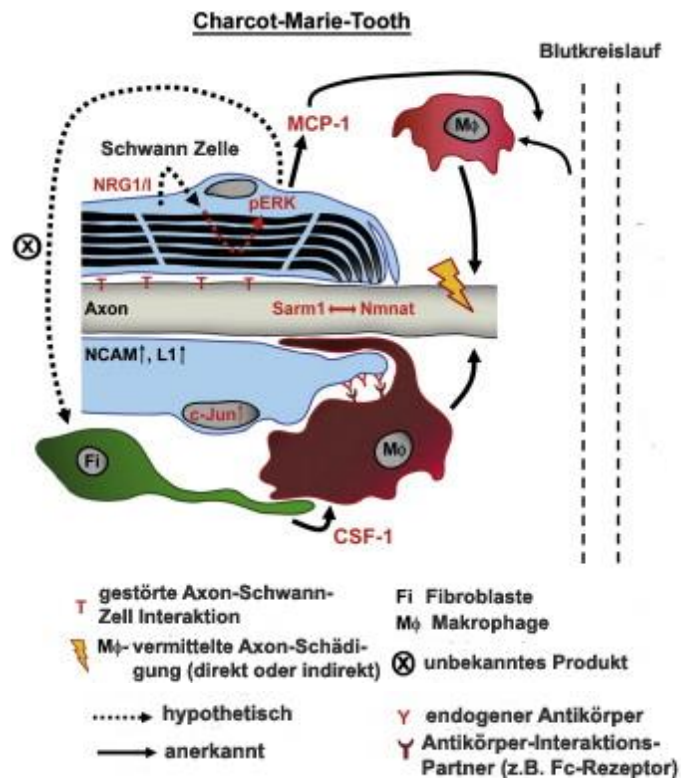
Als bedeutendes, vermittelndes Signal hat sich hierbei das Chemokin *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1/CCL2) erwiesen. MCP-1 kann in verschiedenen pathologischen Situationen Makrophagen stimulieren und aktivieren (Martini et al., 2008) und wird vor allem von Schwann Zellen exprimiert (Fischer et al., 2008b; Groh et al., 2010). In Experimenten mit Myelin Mutanten, die mit MCP-1 defizienten Mäusen gekreuzt wurden, konnte MCP-1 als wichtiger Mediator der Makrophagen-vermittelten Pathogenese identifiziert werden. In Mausmodellen für CMT1A (Kohl et al., 2010), CMT1B (Fischer et al., 2008b) und CMT1X (Groh et al., 2010) findet sich eine erhöhte Expression von MCP-1 sowie vermehrt Makrophagen in peripheren Nerven. Die heterozygote Inaktivierung von MCP-1 führt zu einer Reduktion der Anzahl an Makrophagen und zu einer deutlichen Verbesserung der pathologischen Merkmale. Entsprechend doppelmutante Mäuse zeigen eine verminderte Demyelinisierung und Axonschädigung. Cx32def Mutanten weisen zudem eine Zunahme der Muskelkraft sowie eine Reduktion der Muskelatrophie und Denervation von neuromuskulären Synapsen auf (Groh et al., 2010). Das deutet darauf hin, dass Makrophagen hier eine destruktive Rolle spielen und nicht nur als „harmlose“ Phagozyten von zellulären Überresten fungieren. Interessanterweise führt die

homozygote MCP-1 Deletion nur zu einer lediglich sehr geringen Abnahme von Makrophagen und zu keiner Verbesserung der pathologischen Merkmale. Dieses Phänomen ist möglicherweise auf eine kompensatorische Erhöhung von anderen Makrophagen-stimulierenden Zytokinen und eine kompensatorische Proliferation residenter Makrophagen zurückzuführen (Martini et al., 2008; Groh et al., 2010).

Die Ursache für die erhöhte MCP-1 Expression scheint in allen drei Myelin Mutanten eine Aktivierung der MEK-ERK Signalkaskade zu sein (Fischer et al., 2008a; Martini et al., 2013) (Abb. 5).

Ein weiterer wichtiger Makrophagen-Aktivator, der in CMT1B (Carenini et al., 2001) und CMT1X (Groh et al., 2012) Mäusen identifiziert werden konnte, ist das Zytokin *colony-stimulating factor (CSF)-1*. CSF-1 wird von endoneuralen Fibroblasten produziert, die ausgeprägte Zell-Zell Kontakte mit Makrophagen ausbilden (Maurer et al., 2003; Groh et al., 2012). Um die Rolle von CSF-1 bei demyelinisierenden Neuropathien zu untersuchen, wurden Myelin Mutanten mit osteopetrotischen Mäusen (op) gekreuzt, einer spontanen Mutation mit CSF-1-Defizienz (Yoshida et al., 1990). Während P0het-Mutanten erhöhte Anzahlen an Makrophagen und eine gesteigerte Demyelinisierung aufweisen, zeigen P0het-op Doppelmutanten normale Makrophagenanzahlen und eine deutlich reduzierte Demyelinisierung (Carenini et al., 2001). In Cx32def Mäuse (Groh et al., 2012) konnten erhöhte CSF-1 Level und Makrophagen-Anzahlen in den peripheren Nerven nachgewiesen werden, während Cx32def-op Doppelmutanten eine verminderte Ausprägung der Axonopathie und weniger denervierte motorische Endplatten zeigten. Außerdem kann man in Cx32def-op Doppelmutanten bei Abwesenheit von CSF-1 aktivierten Makrophagen eine Verminderung der Schwann Zell Dysfunktion und Dedifferenzierung sehen, bei gleich bleibend hoher ERK-Phosphorylierung mit gesteigerten MCP-1 Werten (Groh et al., 2015). Das heißt, dass CSF-1 der entscheidende Mediator der Schwann Zell Dysfunktion ist und MCP-1 allein einen milderen, transienten Einfluss auf die intakte Morphologie und Funktion der Schwann Zelle hat. Welche Signale in Myelin Mutanten Fibroblasten letztlich zur Sekretion von

CSF-1 anregen, ist noch nicht hinreichend geklärt. Es ist vorstellbar, dass nachgeschaltete Moleküle aus dem MEK-ERK Signalweg der mutierten Schwann Zelle die CSF-1 Expression durch Fibroblasten stimulieren (Abb. 5) (Martini et al., 2013).



**Abb. 5: Zelluläre und molekulare Interaktionen in Modellen demyelinisierender CMT** Modifiziert nach Martini et al., 2013

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass durch das Wissen um zelluläre und molekulare Signalwege, die an der Pathogenese demyelinisierender CMT Neuropathien beteiligt sind, mögliche und wichtige Therapieansätze eröffnet werden.

### 1.2.3. Diagnostik und Behandlungsoptionen

Wesentliche diagnostische Schritte bei Verdacht auf eine hereditäre periphere Neuropathie umfassen die exakte Erfassung des klinischen Phänotyps, die

Messung der Nervenleitgeschwindigkeit und die Nervenbiopsie, bevorzugt des Nervus suralis sowie eine genetische Testung.

Charcot-Marie-Tooth Neuropathien sind eine Gruppe von Erkrankungen, die einen progredienten Verlauf zeigen und die Lebensqualität der betroffenen Patienten massiv einschränken. Es existiert noch immer keine Möglichkeit der kausalen Behandlung oder Heilung dieser Erkrankungen. An Behandlungsoptionen stehen symptomatische Möglichkeiten zur Verfügung, wie Physiotherapie, rehabilitative Maßnahmen und Anwendung von orthopädischen Hilfsmitteln. Patienten mit Extremitäten- oder Wirbelsäulendeformierung benötigen häufig korrigierende orthopädische Operationen (Tazir et al., 2014). Als pharmakologische Behandlungsoptionen erwiesen sich sowohl hochdosierte Ascorbinsäure (Vitamin C) (Micallef et al., 2009; Pareyson et al., 2011) als auch Progesteron Antagonisten (Sereda et al., 2003) im experimentellen, PMP22 überexprimierenden Tiermodell für CMT1A Erfolg versprechend. Leider zeigte Vitamin C bei CMT1A Patienten keinen positiven Effekt auf den Krankheitsverlauf, während der eingesetzte Progesteron Antagonist sogar toxische Effekte im Menschen verursachte, sodass beide Substanzen keine Option zur Behandlung von CMT darstellen (Saporta and Shy, 2013).

Einen vielversprechenden Behandlungsansatz stellt außerdem die Gentherapie dar. Dies ist eine Behandlungsmöglichkeit, mit deren Hilfe genetisches Material (Gene oder Proteine) in betroffene Körperzellen übertragen wird (Patzko and Shy, 2011). Am häufigsten werden virale Vektoren oder DNA Plasmide als Überträger des genetischen Materials genutzt. In einem CMT1X-Modell konnte die intrathekale Verabreichung des GJB1 Gens, das für Cx32 kodiert, eine deutliche histopathologische und funktionelle Verbesserung des Krankheitsbildes bewirken, wenn auch noch nicht auf das Niveau gesunder Wildtyp Mäuse (Kagiava et al., 2016).

Virale Vektoren führen allerdings zu immunologischen Nebenwirkungen, was ihren Einsatz stark limitiert. DNA Plasmide hingegen sind aus immunologischer Sicht zwar besser verträglich, allerdings zeigen sie durch nur kurzfristige

Expression entsprechend transferierter Genprodukte in den Zielzellen nur eine geringe Effizienz (Patzko and Shy, 2011).

Eine interessante, zukünftige Behandlungsoption könnte der Einsatz von Stammzellen sein (Leal et al., 2008). Eingesetzte Stammzellen müssten sich entweder in Neurone differenzieren oder in myelinisierende Schwann Zellen oder in Zellen, die trophische Faktoren zur Regeneration der erkrankten Nerven produzieren. Bis Stammzellen zur Therapie von CMT eingesetzt werden können, bedarf es allerdings noch einer Menge Forschungsarbeit.

Ein weiterer vielversprechender Therapieansatz ist die Blockade von Zytokinen, die eine Aktivierung von Makrophagen herbeiführen. In zwei verschiedenen Mausmodellen der CMT1 (Cx32def, P0het) konnte durch die orale Behandlung der Mäuse mit einem spezifischen CSF-1-Rezeptor Inhibitor eine deutliche Abnahme an Makrophagen sowie eine Verbesserung der klinischen und neuropathologischen Merkmale bewirkt werden (Klein et al., 2015). Nebenwirkungen wurden nicht beobachtet. In einer weiteren Studie wurde Neuregulin-1, ein Inhibitor der MEK-ERK Signalkaskade, in einem Rattenmodell der CMT1 systemisch appliziert. Aus in-vitro Versuchen ist bekannt, dass die Blockade der MEK-ERK- Kaskade mit einer Reduktion an neuronaler Dedifferenzierung einhergeht. Bei den untersuchten CMT1 Ratten resultierte die Gabe von Neuregulin-1 in einer Verbesserung der Myelinisierung und Axonintegrität (Martini, 2014). Die Anwendung von Neuregulin-1 in CMT1 Patienten ist jedoch dadurch limitiert, dass die Applikation zur optimalen Wirkung in einem sehr engen postnatalen Zeitfenster erfolgen muss. Außerdem ist ein gewisses Neoplasie-induzierendes Potenzial bei Neuregulin-1 bekannt, welches seinen Einsatz ebenfalls stark begrenzt, v.a. bei der Therapie einer nicht-tödlichen Erkrankung.

Da nach wie vor keine effektive und kausale Behandlungsmöglichkeit für CMT Patienten existiert, ist die weitere und intensive Erforschung pathogenetischer Mechanismen von immenser Bedeutung.

### **1.3. Die neuromuskuläre Endplatte als pathogenetische Zielstruktur in CMT und weiteren neuropathologischen und degenerativen Prozessen**

Die neuromuskuläre Endplatte ist nicht nur ein integraler Bestandteil des motorischen Systems, sie ist auch eine Struktur, die sich als besonders anfällig für Degeneration bzw. Affektion im Rahmen physiologischer und pathologischer Prozesse erweist. Sie kann daher auch als "Achillesferse" des neuromuskulären Apparates betrachtet werden.

In Mausmodellen der Charcot-Marie-Tooth Erkrankung (CMT) Typ 2D, die eine axonale Form der hereditären, motorischen und sensorischen Neuropathien (HMSN) darstellt, zeigen NMJs einen deutlichen Defekt ihrer Entwicklung und Reifung (Sleigh et al., 2014). In dieser Studie tritt als Folge dieser Entwicklungsstörung eine Denervation der Endplatten bei unveränderter Anzahl an motorischen Neuronen im Rückenmark auf. Dies spricht dafür, dass die NMJ ein bedeutendes Ziel selektiver und früher Pathogenese dieser Erkrankung darstellt.

Auch in demyelinisierenden Formen von CMT zeigen sich Auffälligkeiten im Bereich der motorischen Synapsen. In einem Mausmodell der CMT4F, einer rezessiven Form, treten im Zuge der Demyelinisierung neben axonalen Defekten wie präterminale Schwellung und Ausdünnung der Axone auch morphologische Veränderungen der NMJ auf (Court et al., 2008a). Die Endplatten entsprechend mutanter Mäuse dieser Studie zeigen auffällige präterminale Axonverzweigungen, die ihren Ursprung in demyelinisierten Axonbereichen nehmen (Court et al., 2008a).

In einem Mausmodell der CMT1X, einer x-chromosomal vererbten Form zeigt sich neben abnormer Myelinisierung und Schädigung von Axonen ebenfalls eine deutliche Zunahme an denervierten Endplatten (Groh et al., 2010; Groh et al., 2012).

Der Einfluss von fehlerhafter Myelinisierung auf Struktur und Funktion von Endplatten konnte auch anhand von Mäusen, die P0 überexprimieren, gezeigt werden (Yin et al., 2004). Tiere dieser Studie zeigen eine Dysmyelinisierung ihrer Axone und strukturelle sowie funktionelle Veränderungen der NMJs. Es treten einerseits gehäuft partiell denervierte Endplatten als Zeichen des Verlustes von funktionierenden Nervenendigungen auf, andererseits findet innerhalb der NMJs ein axonales Sprouting statt und die synaptische Transmission verläuft fehlerhaft. Die Tatsache, dass P0-überexprimierende Mäuse eine Korrelation zwischen Denervation von NMJs und Dysmyelinisierung erkennen lassen, führt zu der Annahme, dass Dysmyelinisierung die primäre Ursache der Denervation in diesen Mutanten darstellt (Yin et al., 2004).

Die besondere Bedeutung der neuromuskulären Endplatte bei neurodegenerativen Prozessen und insbesondere ihre sehr frühe Affektion in der Pathogenese zeigt sich auch bei der amyotrophen Lateralsklerose (ALS). Die ALS ist eine Erkrankung, bei der es zum Untergang primärer und sekundärer Motoneurone kommt. Untersuchungen im Tiermodell (transgene  $SOD1^{G93A}$  überexprimierende Maus) wie auch von Patienten konnten aufzeigen, dass die Pathogenese der ALS einer Art "dying back"- Mechanismus folgt (Fischer et al., 2004). Der "dying back"- Mechanismus ist zu verstehen als distale Axonopathie, bei der der primäre Pathomechanismus im distalen Bereich des Axons (also z.B. auch an der NMJ) stattfindet und sich retrograd in Richtung proximaler Axonanteile und neuronale Zellkörper ausbreitet (Ozturk et al., 2013). Als Ursache für die primäre Denervation von NMJs bei der ALS sind u.a. distale Akkumulationen toxischer oder unlöslicher Proteine beschrieben (Fischer et al., 2004).

Auch in der pmn-Maus (progressive motoneuropathy) (Frey et al., 2000) sowie in einem Mausmodell der spinalen Muskelatrophie ( $smn+/-$ ) (Simon et al., 2010) ist der Verlust der Präsynapse der neuromuskulären Endplatte das primäre pathogenetische Merkmal, bevor es im weiteren Verlauf zur Schädigung des motoneuronalen Axons und zum Zelltod kommt.



Die Degeneration der neuromuskulären Endplatte spielt nicht nur bei der Entstehung von Krankheiten eine Rolle, sondern auch im natürlichen Alterungsprozess, der typischerweise mit Sarkopenie und muskulärer Dysfunktion einhergeht (Gonzalez-Freire et al., 2014). Auch in diesem Fall scheinen morphologische Veränderungen der NMJ dem Verlust motorischer Neurone voranzugehen. Als primäre Ursachen, die im Rahmen degenerativer Alterungsprozesse zu Veränderungen der NMJ führen, werden in o.g. Veröffentlichung in erster Linie inflammatorische und neurodegenerative Ereignisse sowie mitochondriale Dysfunktion und oxidativer Stress genannt. Als Veränderungen der NMJ im Alter sind laut Gonzalez-Freire et al. eine Abnahme von Nerventerminalien, postsynaptischen Faltungen und synaptischen Vesikeln, Einschränkung des Sproutings und regenerativer Funktionen zu bezeichnen. Diese Veränderungen führen zu einer funktionellen Beeinträchtigung der Endplatte. Während in jugendlichem Alter eine ausgeprägte Fähigkeit zur Reinnervation und Sprouting vorliegt, kommt es im Rahmen des Alterungsprozesses zu einer Einschränkung der genannten Funktionen mit zunehmender Muskelschwäche und Muskelatrophie (Gonzalez-Freire et al., 2014).

Auch im Rahmen der Entwicklung der NMJ, in der früh-postnatalen Periode, laufen zahlreiche Prozesse ab, die zur korrekten Funktion der neuromuskulären Endplatte beitragen. Beispielsweise werden überzählige Axone durch Schwann Zellen mittels Phagozytose eliminiert und dadurch die hohe Anzahl an Axonterminalien pro Muskelfaser, die für die post-embryonale NMJ typisch ist, deutlich reduziert (Bishop et al., 2004). Fehlerhafte Abläufe können also schon in sehr frühen Phasen der Entwicklung zu Dysfunktion der NMJ führen.

Zusammenfassend lässt sich die neuromuskuläre Endplatte als Schwachstelle des neuromuskulären Systems verstehen. Dadurch wird sie zu einem selektiven und bislang unterschätzten Ziel pathogenetischer Prozesse sowohl

bei diversen neurologischen Erkrankungen wie auch bei physiologischen Degenerationsprozessen.

#### **1.4. Fragestellung der Arbeit**

Die oben beschriebenen Studien konnten zeigen, dass die neuromuskuläre Endplatte ein frühes und selektives pathogenetisches Ziel in zahlreichen verschiedenen neurologischen Erkrankungen ist. In unserer Arbeitsgruppe wurde festgestellt, dass in erblichen, demyelinisierenden Neuropathien vom CMT1 Typ nicht nur ein Makrophagen-vermittelter axonaler Schaden auftritt, sondern auch eine Zunahme der Denervation neuromuskulärer Endplatten entsteht. Dabei geht die genetische Inaktivierung der Makrophagen-Stimulation mit einer Verminderung der Denervation einher. Ob Makrophagen eine direkte Rolle bei der Denervation der Endplatten spielen ist unklar. Ziel der vorliegenden Arbeit ist daher zu analysieren, ob in etablierten Myelin Mutanten

1. Makrophagen mit motorischen Endplatten assoziiert sind
2. die räumliche Assoziation von Makrophagen und Endplatten mit gesteigerter Denervation von Endplatten einhergeht
3. CSF-1 und MCP-1 als Mediatoren für den Makrophagen-Endplatten-Kontakt und eine Makrophagen-vermittelte Denervation fungieren
4. die genetische Blockade der Makrophagen-Aktivierung eine Veränderung der pathogenetischen Merkmale an der neuromuskulären Endplatte bewirkt.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Technische Ausstattung, Lösungen, Reagenzien, Chemikalien, Antikörper**

Die technische Ausstattung (Anhang 6.1.1.), Lösungen, Reagenzien, Chemikalien (Anhang 6.1.2.) sowie Antikörper (Anhang 6.1.3.) für die Immunhistochemie sind im Anhang detailliert aufgelistet und beschrieben.

### **2.2. Mauslinien und Genotypisierung**

Alle Tiere, die für diese Studie verwendet wurden, wurden unter Barriere Bedingungen, gemäß der geltenden Richtlinien, mit freiem Zugang zu Wasser und Futter in einem 12h/12h Tag-Nacht-Rhythmus in der Tierhaltung der Neurologischen Klinik der Universität Würzburg gehalten. Die Tierexperimente wurden durch die Regierung von Unterfranken genehmigt (Tierversuchsantrags Nr. 55.2-2531.01-03/14; 55.2DMS-2532-2-1).

Es wurden Mäuse mit folgendem Genotyp untersucht: Heterozygot P0-defiziente (P0het) (Giese et al., 1992) Connexin32-defiziente (Cx32def) und heterozygot Connexin32-defiziente (Cx32het) (Nelles et al., 1996) Mäuse, transgene PMP22-überexprimierende (PMP22tg) Mäuse aus dem C61 Stamm (Huxley et al., 1998) und Wildtyp (Wt) Kontrollen. Alle in die Untersuchung eingeschlossenen Tiere wurden für mehr als 20 Generationen auf einem genetischen C57/Bl6 Hintergrund gezüchtet.

Außerdem wurden folgende doppel-mutante Mäuse in die Studie mit einbezogen:

Heterozygot Connexin32-defiziente/osteopetroische (Cx32het/op) Mäuse:

Hierbei handelt es sich um eine Kreuzung zwischen heterozygot Connexin32-defizienten und osteopetroischen (op) Mäusen (Yoshida et al., 1990), die eine

CSF-1-Defizienz aufweisen. Die heterozygot Connexin32-defizient Tiere weisen ein genetisches Mosaik auf durch zufällige X-Inaktivierung. Die Mäuse hatten einen gemischten genetischen C57/Bl6 × 129Sv Hintergrund.

Connexin32-defiziente /MCP-1-defiziente (Cx32def/MCP-1def) Mäuse:

Cx32def Mäuse wurden mit MCP-1-defizienten Mäusen (Lu et al., 1998; Groh et al., 2010) gekreuzt. Die Tiere wiesen einen gemischten genetischen C57/Bl6 × 129Sv Hintergrund auf.

Für ergänzende Zusatzuntersuchungen kamen folgende Mausmutanten zum Einsatz:

Ciliary-Neurotrophic-Factor (CNTF)-defiziente Mäuse (CNTFdef) mit genetisch einheitlichem C57/Bl6 Hintergrund. Diese Tiere wurden uns vom Institut für Klinische Neurobiologie, Universität Würzburg (Prof. M. Sendtner) zur Verfügung gestellt.

Die Genotypisierung der Tiere erfolgte anhand einer konventionellen Polymerasekettenreaktion (PCR) durch medizinisch-technische Assistenten der Arbeitsgruppe. Hierfür wurde DNA Material entsprechender Mäuse verwendet, das durch Proben aus Ohrbiopsien gewonnen wurde.

### **2.3. Präparation von Mäusen und Gewebeentnahme**

Die Mäuse wurden mittels Asphyxie durch Anwendung von CO<sub>2</sub> getötet und transkardial mit PBS/Heparin perfundiert. Hierfür wurde der Thorax eröffnet, das Herz aufgesucht und die Perfusionsnadel in den linken Ventrikel eingelegt. Der rechte Vorhof wurde durch einen Schnitt eröffnet um den Abfluss des Blutes zu gewährleisten.

Im Anschluss an die Perfusion erfolgte die Präparation der beiden hinteren Extremitäten. Nach Präparation der Haut von der Fußsohle, folgte die

Entfernung des direkt subkutan gelegenen M. flexor digitorum longus, wodurch der tiefer gelegene M. flexor digitorum brevis (FDB) sichtbar wurde. Dieser wurde inklusive der Ursprungs- und Ansatzsehnen entfernt, in TissueTek eingebettet und in mit flüssigem Stickstoff gekühltem Methylbutan gefroren.

Für immunhistochemische Untersuchungen wurden 10µm dicke Querschnitte des Muskels an einem Kryostat hergestellt und anschließend bei -20° C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

Für immunoelektronenmikroskopische Untersuchungen wurden die Tiere transkardial mit 4% PFA und 2% GA in einem 0.1 M CaCo Puffer für 25 Minuten perfundiert und das präparierte Gewebe anschließend in derselben Lösung über Nacht postfixiert.

#### **2.4. Immunhistochemie**

Zur Färbung von Makrophagen wurde ein Antikörper gegen das Oberflächenprotein F4/80 angewendet. F4/80 ist ein extrazelluläres Antigen, das zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren EGF-TM7 gehört und von reifen Makrophagen exprimiert wird (Austyn and Gordon, 1981; Gordon et al., 2011). Die präsynaptischen Terminalien wurden mit einem Synaptophysin-Antikörper dargestellt und die postsynaptische Region mit Fluoreszenzgekoppeltem  $\alpha$ -Bungarotoxin, das spezifisch an Acetylcholin-Rezeptoren bindet.

##### F4/80 - $\alpha$ -Bungarotoxin

Die gefrorenen Kryo-Schnitte wurden aufgetaut, mit einem Pap-Pen umrandet und anschließend für 5 Minuten in 1xPBS gewaschen. Um unspezifische Bindestellen zu blockieren, wurden die Schnitte bei Raumtemperatur (RT) für 30 Minuten in 5% BSA/PBS inkubiert. Anschließend wurde der primäre Makrophagen Antikörper Ratte-anti-Maus F4/80 (Verdünnung: 1:300) in 1%BSA/PBS verdünnt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Schnitte 3x5 Minuten in 1xPBS gewaschen und schließlich mit dem sekundären Antikörper Ziege-anti-Ratte-Cy3 (Verdünnung: 1:300) und  $\alpha$ -

Bungarotoxin konjugiert an Alexa Fluor 488 (Verdünnung: 1:400) in 1%BSA/PBS verdünnt und 60 Minuten bei Raumtemperatur in Dunkelheit inkubiert. Daraufhin wurden die Schnitte wieder 3x5 Minuten in 1xPBS gewaschen. Um die Zellkerne zu färben, wurde DAPI (Verdünnung 1:200 000) in 1%BSA/PBS für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen der Schnitte für 3x5 Minuten in 1xPBS wurden die Schnitte abschließend in DABCO oder Aqua-Poly/Mount eingebettet und mit Vitro-Clud umrandet.

#### F4/80 - Synaptophysin - $\alpha$ -Bungarotoxin

Die Muskel-Schnitte wurden nach dem Auftauen mit einem Pap-Pen umrandet und für 5 Minuten in 1xPBS gewaschen. Um unspezifische Bindestellen zu blockieren erfolgte die Inkubation der Schnitte in 5% BSA/PBS bei RT für 30 Minuten. Dann wurde der primäre Antikörper Ratte-anti-Maus F4/80 (1:300 verdünnt in 1%BSA/PBS) über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Schnitte 3x10 Minuten in 1xPBS auf dem Schüttler gewaschen und mögliche unspezifisch gebunden Antikörper zu entfernen. Dann wurde der biotinylierte, sekundäre Antikörper Kaninchen-anti-Ratte (Verdünnung: 1:100 in 1%BSA/PBS) für 1 Stunde bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte das Waschen der Schnitte für 3x5 Minuten in 1xPBS auf dem Schüttler und Inkubation eines Avidin-Biotin-Peroxidase Komplexes für 30 Minuten bei RT. Dann wurden die Schnitte erneut 3x5 Minuten in 1xPBS gewaschen und Diaminobenzidin (DAB-Tablette in 10 ml Aqua dest. gelöst und mit 10µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aktiviert) für 1 Minute inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte in Aqua dest. für 2x5 Minuten und in 1xPBS für 5 Minuten gewaschen. Schließlich folgte eine erneute Blockierung unspezifischer Bindestellen mit 5%BSA/PBS und 0,3% Triton-X 100 für 30 Minuten bei RT. Der Zusatz von Triton bewirkt eine Permeabilisierung der Zellen/des Gewebes und ermöglichte dadurch, dass innerhalb der Präsynapse befindliche Synaptophysin anzufärben. Dann wurde der primäre Antikörper Meerschweinchen-anti-Maus Synaptophysin (1:500 verdünnt in 1%BSA/PBS und 0,3% Triton-X 100) bei 4°C über Nacht inkubiert.

Am folgenden Tag wurden die Schnitte zunächst 3x5 Minuten in 1xPBS gewaschen und der sekundäre Antikörper Esel-anti-Meerschweinchen-Cy3 (1:300 verdünnt in 1%BSA/PBS und 0,3% Triton) und  $\alpha$ -Bungarotoxin konjugiert an Alexa Fluor 488 (verdünnt 1:400 in 1%BSA/PBS) für 1 Stunde bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte 3x5 Minuten in 1xPBS gewaschen und zur Darstellung der Zellkerne, DAPI (Verdünnung 1:200 000 in 1%BSA/PBS) für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zuletzt wurden die Schnitte noch einmal 3x5 Minuten in 1xPBS gewaschen, in Aqua-Poly/Mount eingebettet und mit Vitro-Clud umrandet.

## **2.5. Quantitative Analyse**

Durchlichtmikroskopische und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen wurden mit Hilfe eines Axiophot 2 Mikroskops (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) gemacht, das mit einer CCD Kamera ausgestattet ist.

Für die quantitative Analyse wurde die 3-fach Färbung gegen F4/80+ Makrophagen, präsynapsen-spezifisches Synaptophysin und postsynapsen-spezifische Acetylcholin-Rezeptoren angewandt. Die Quantifizierung wurde bei 40-facher Vergrößerung durchgeführt.

Es wurden pro Maus jeweils 100 Synapsen untersucht. Für die Analyse der Rate an denervierten Synapsen wurden folgende Kriterien festgelegt: Eine Synapse galt als innerviert, wenn das präsynaptische Signal mit dem Signal der Postsynapse korrespondierte; als partiell denerviert wurden Synapsen klassifiziert, die ein deutlich schwächeres oder teilweise fehlendes präsynaptisches Signal in Relation zur Postsynapse aufwiesen; bei vollständig fehlendem präsynaptischen Signal wurde eine Synapse als denerviert bezeichnet. Für die Rate an Assoziation wurde der Prozentsatz von F4/80+ Makrophagen, die in direktem räumlichem Kontakt zu einer Synapse standen in Relation zu allen untersuchten Synapsen quantifiziert. Außerdem wurde die Anzahl an F4/80+ Makrophagen pro mm<sup>2</sup> Muskelgewebe quantifiziert. Die Ausmessung von Flächen und die manuellen Auszählungen wurden mit Hilfe der Software Image J durchgeführt. Sämtliche Analysen erfolgten unter

geblindeten Umständen ohne Kenntnisse des Untersuchers über die jeweiligen Maus-Genotypen.

## **2.6. Immunoelektronenmikroskopie**

Zur Färbung von Makrophagen wurde ein Antikörper gegen CD68 verwendet. CD68 ist ein transmembranes Glykoprotein, das eine Homologie zur Familie der lysosomal-assoziierten Glykoproteine zeigt und wird überwiegend intrazellulär in lysosomalen bzw. endosomalen Granula von Gewebemakrophagen exprimiert (Holness and Simmons, 1993).

Zur Darstellung von Fibroblasten wurde ein Antikörper gegen CD34 eingesetzt. Die gefärbten Zellen lassen sich durch Immunoelektronenmikroskopie eindeutig identifizieren, da die Antigen-Antikörper-Reaktion durch ein elektronendichtes DAB-Präzipitat sichtbar gemacht wird.

Nach Perfusion der Tiere und Postfixation des präparierten Gewebes über Nacht, wie oben beschrieben, wurden die Muskeln einmalig in einem 0,1 M CaCo Puffer gewaschen und anschließend in 6% Agarose eingebettet. Mit Hilfe eines Vibratoms (Leica VL 1200) wurden 50µm dicke Querschnitte angefertigt und freischwimmend mit CaCo Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte 2 Stunden bei RT in 1%BSA/PBS geblockt und danach zunächst für 15 Minuten in 0,1 M NaIO<sub>3</sub> in PBS und danach für 10 Minuten in 5% DMSO in PBS inkubiert. Dann wurden primäre Antikörper Ratte-anti-Maus-CD68 (1:400 in 1%BSA/PBS) bzw. Ratte-anti-Maus-CD34 (1:500 in 1%BSA/PBS) über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach 3× 25 Minuten waschen in 1×PBS wurde der sekundäre, biotinylierte Antikörper Kaninchen-anti-Ratte (1:50 in 1%BSA/PBS) bei RT für 3 Stunden auf dem Schüttler inkubiert. Daraufhin erfolgte 3× 20 Minuten waschen in 1×PBS, die Inkubation eines Avidin-Biotin-Peroxidase Komplexes (1:50 in 1%BSA/PBS) für 1 Stunde bei RT und schließlich 3× 15 Minuten waschen in 1×PBS. Dann wurden die Schnitte 2-5 Minuten in Diaminobenzidin (DAB-Tablette in 10 ml Aqua dest. gelöst und mit 10µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aktiviert) inkubiert. Anschließend erfolgte die Osmifikation der Muskelschnitte



mit 2% OsO<sub>4</sub> in 0,1 M CaCo Puffer und danach die schrittweise Dehydratation für je 3 Minuten in 30%, 50%,70%,90% und 3x in 100% Aceton. Dann wurde das Gewebe in einem 2:1 verdünntem 100% Aceton/Spurr Gemisch für 1 Stunde und folgend in 1:2 verdünntem 100% Aceton/Spurr Gemisch 1 Stunde eingebettet. Daraufhin wurde das Gewebe über Nacht in 100% Spurr's Medium eingelegt. Am folgenden Tag wurden die Schnitte bei einer Temperatur von 70°C über Nacht polymerisiert.

Mit Hilfe eines Mikrotoms (Utracut E) wurden schließlich 80 nm dicke Querschnitte der Muskeln angefertigt und nach Behandlung mit Chloroform auf Kupfer-Grids übertragen. Zur Erhöhung des Kontrasts erfolgte abschließend eine Behandlung mit Bleicitrat für 4 Minuten.

Die Analyse wurde am Elektronenmikroskop Leo 906 E (Zeiss, Oberkochen, Deutschland), das mit einer ProScan Slow Scan CCD Kamera (Lagerlefeld, Deutschland) und der Software iTEM ausgestattet ist, durchgeführt.

## **2.7. Statistische Analyse**

Sämtliche statistische Auswertungen wurden mit der Software PASW Statistics 18 (SPSS, IBM) durchgeführt. Die Werte der Daten wurden in Form von Mittelwert + SEM (Standard error of the mean) angegeben. Signifikanzniveaus wurden folgendermaßen festgelegt: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$

Um die Datenmenge auf Normalverteilung zu untersuchen, wurde der Shapiro-Wilk Test angewandt. Normalverteilte Daten wurden mit dem one-way ANOVA Test gefolgt von Games-Howell's oder Tukey's post hoc Tests analysiert. Bei nicht normalverteilten Daten kam der Kruskal-Wallis Test gefolgt vom Man-Whitney-U Test zur Anwendung.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Die Anzahl denervierter neuromuskulärer Endplatten ist erhöht in Myelin Mutanten

In unserer Arbeitsgruppe konnte bereits gezeigt werden, dass in Mausmodellen für CMT, als pathologisches Merkmal, eine Zunahme der Denervation von neuromuskulären Endplatten auftritt (Groh et al., 2010; Groh et al., 2012). Diese vermehrte Denervation scheint Makrophagen-assoziiert zu sein, da eine genetische Inaktivierung der Makrophagen-Stimulation unter anderem zur einer Abnahme der Anzahl an Makrophagen und gleichzeitiger Reduktion denervierter Endplatten führt. Ob Makrophagen eine pathogenetische Rolle an der Denervation neuromuskulärer Endplatten spielen, konnte bis dato nicht geklärt werden. Daher wurde in dieser Arbeit zunächst die Anzahl an denervierten Endplatten in verschiedenen Myelin Mutanten quantifiziert.

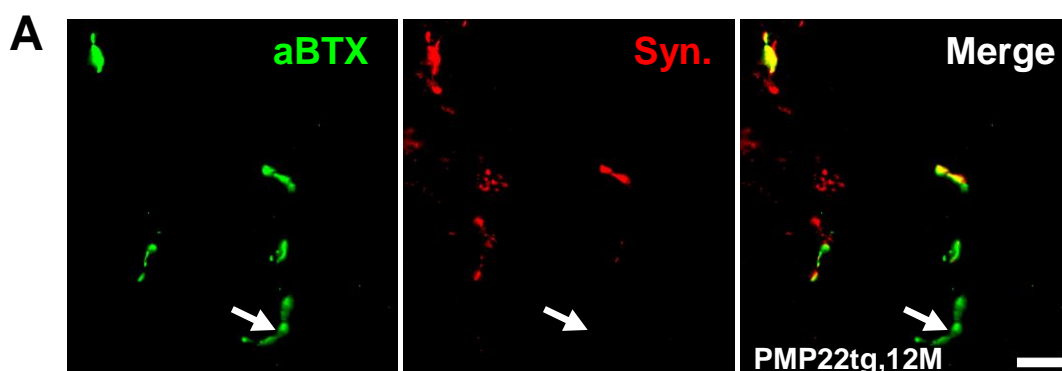
Hierfür wurden Myelin Mutanten und Wildtyp (Wt)-Kontrollen im Alter von 6 und 12 Monaten verwendet. Es wurden Querschnitte des M. flexor digitorum brevis zur Darstellung von Makrophagen gegen F4/80 und zur Darstellung der Präsynapse gegen Synaptophysin gefärbt. Die Postsynapse wurde mittels Färbung von Acetylcholinrezeptoren mit Alpha-Bungarotoxin dargestellt.

Bei der Untersuchung von 6 Monate alten Tieren (Abb. 6B) zeigten sich im Wildtyp ca. 1% der NMJs denerviert, i.e. die Postsynapse ist nachweisbar gewesen bei vollständig fehlender Präsynapse. 2% der Synapsen im Wildtyp waren partiell denerviert, d.h. die zur Postsynapse korrespondierende Präsynapse war entweder sehr schwach oder nur teilweise sichtbar. Bei den 6 Monate alten Myelin Mutanten fand sich für P0het und PMP22tg Mutanten eine Zunahme denervierter Endplatten, wobei diese Zunahme am deutlichsten ausgeprägt war bei P0-Mutanten, bei leicht reduzierter partieller Denervation. Demgegenüber ließen sich in den 6 Monate alten Cx32def Mutanten deutlich weniger denervierte Endplatten nachweisen, bei erhöhter Rate an partieller

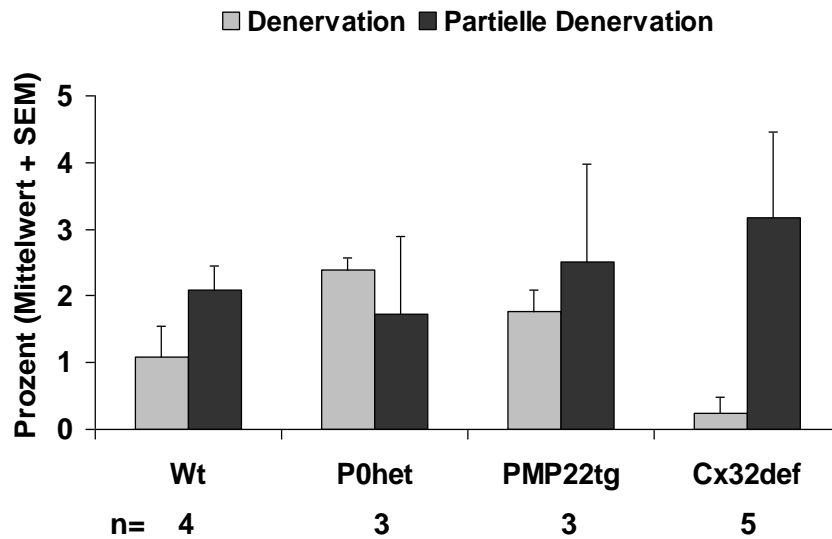
Denervation im Vergleich zum Wildtyp und den übrigen Myelin Mutanten. Insgesamt fanden sich bei dieser Untersuchung bei allen 6 Monate alten Mäusen stärkere Schwankungen, was auch die fehlende Signifikanz erklärt.

Bei 12 Monate alten Mäusen (Abb. 6C) zeigte sich bei allen Myelin Mutanten eine deutliche Erhöhung sowohl an denervierten wie auch an partiell denervierten Endplatten im Vergleich zum Wildtyp. Bei 12 Monate alten P0het Mutanten war im Vergleich zu den 6 Monate alten Tieren nahezu kein Unterschied an Denervation feststellbar, während sich bei den PMP22tg und den Cx32def Mutanten im Verlauf von 6 zu 12 Monaten eine Zunahme an Denervation/partieller Denervation fand. Der stärkste Anstieg war bei Cx32def Mutanten detektierbar. Im Wildtyp zeigte sich im Verlauf von 6 zu 12 Monaten keine Veränderung hinsichtlich der Denervation/ partieller Denervation.

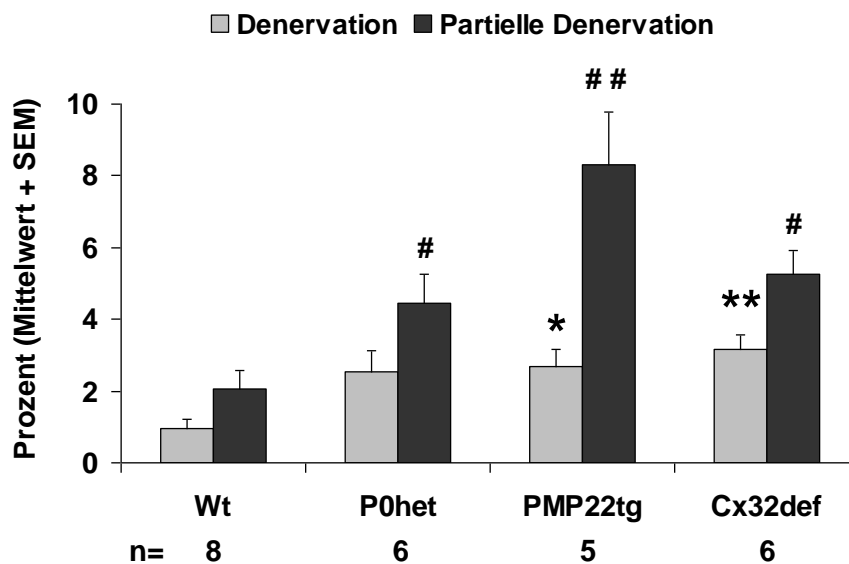
In beiden Altersgruppen war zudem sowohl im Wildtyp wie auch in Myelin Mutanten keine einzige der denervierten Endplatten mit einer Makrophage räumlich assoziiert. Bei 12 Monate alten Tieren fanden sich in der Gruppe der PMP22tg und Cx32def Mutanten vereinzelt partiell denervierte NMJs in Assoziation mit einer Makrophage.

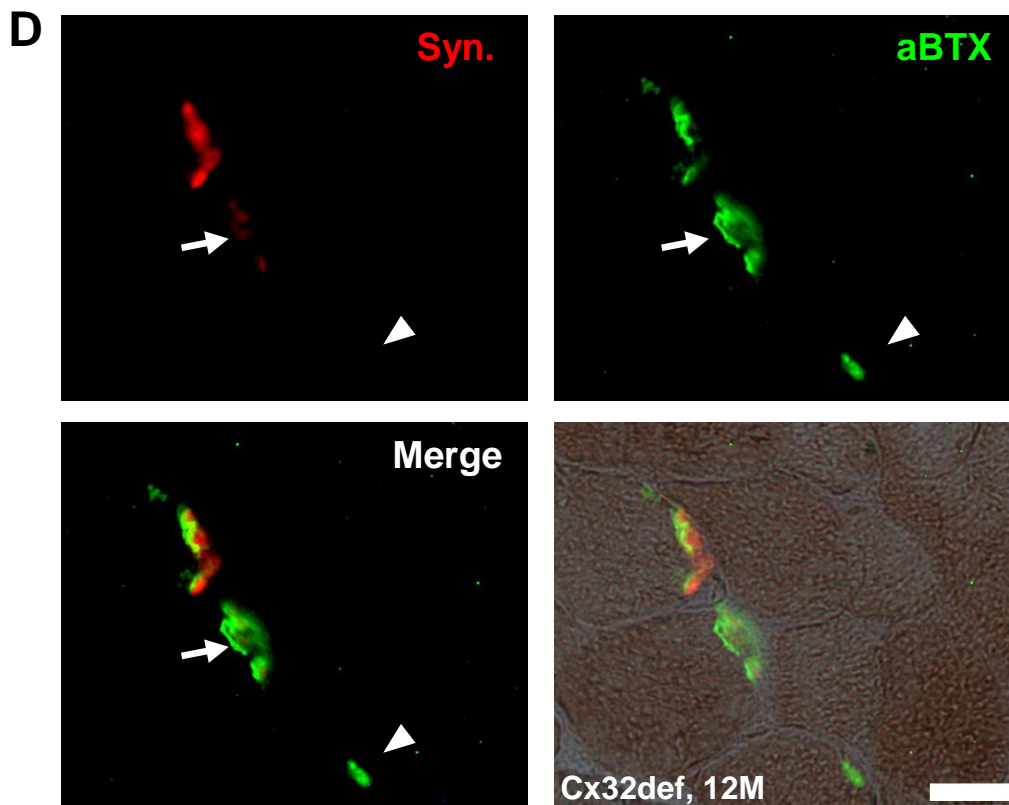


## B Denervation/Partielle Denervation neuromuskulärer Synapsen; 6 Monate



## C Denervation/Partielle Denervation neuromuskulärer Synapsen; 12 Monate





**Abb. 6: Denervation/partielle Denervation neuromuskulärer Synapsen in Myelin Mutanten**

(A) Repräsentative immunohistochemische Darstellung der Präsynapsen (Synaptophysin, rot) und Postsynapsen (Alpha-Bungarotoxin, grün) von neuromuskulären Endplatten im Querschnitt des M. flexor digitorum brevis einer 12 Monate alten PMP22tg Mutanten. Der Pfeil markiert eine vollständig denervierte Endplatte. Über dieser zeigt sich eine partiell denervierte Endplatte mit nur minimalem präsynaptischen Signal. Maßstab=20µm (B) Quantifizierung denervierter/partiell denervierter NMJs in 6 Monate alten Tieren. Es zeigt sich eine Tendenz, jedoch kein signifikanter Unterschied. Pro Tier wurden 100 Synapsen untersucht. (C) Die Quantifizierung denervierter/partiell denervierter NMJs in 12 Monate alten Tieren zeigt eine signifikante Zunahme an Denervation und partieller Denervation in Myelin Mutanten im Vergleich zum Wildtyp. Pro Tier wurden 100 Synapsen untersucht. Man beachte die unterschiedliche Skalierung der Ordinaten bei den verschiedenen Altersstufen. \* /\*\* markiert einen signifikanten Unterschied an Denervation zwischen Wildtyp und Myelin Mutanten.  $p < 0,05 = *$ ,  $p < 0,01 = **$ . ### markiert einen signifikanten Unterschied an partieller Denervation zwischen Wildtyp und Myelin Mutanten.  $p < 0,05 = \#$ ,  $p < 0,01 = \#\#$  (D) Repräsentative Darstellung einer immunohistochemischen Färbung der Präsynapsen (Synaptophysin, rot) und Postsynapsen (Alpha-Bungarotoxin, grün) von NMJs sowie durchlichtmikroskopische Darstellung eines Muskelquerschnitts (Diaminobenzidin-Präzipitat, braun). Abgebildet ist ein Querschnitt des M. flexor digitorum brevis einer 12 Monate alten Cx32def Mutanten. Die Abbildung zeigt 3 neuromuskuläre Endplatten. Die oberste ist regulär innerviert mit korrespondierender Prä- und Postsynapse. Die mittlere NMJ (Pfeil) zeigt ein schwaches Synaptophysin-

Signal und entspricht einer partiellen Denervation, während die unterste NMJ (Pfeilkopf) keine Präsynapse aufweist und daher vollständig denerviert ist. Die durchlichtmikroskopische Darstellung zeigt die Lokalisation der NMJs an der entsprechenden Muskelfaser. Maßstab=20µm

### **3.2. Makrophagen sind räumlich assoziiert mit der neuromuskulären Endplatte in Myelin Mutanten**

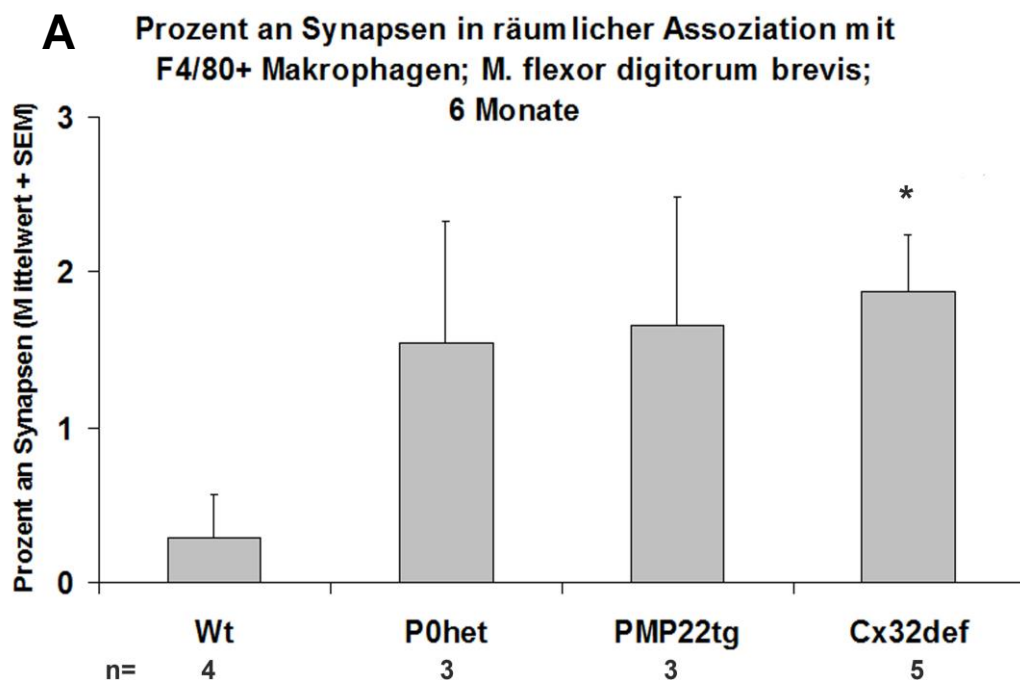
Als nächstes wurde untersucht, ob in P0het, PMP22tg und Cx32def myelinmutanten Mäusen Makrophagen räumlich mit neuromuskulären Endplatten assoziiert sind und ob Makrophagen-Assoziation und Denervation der Endplatten gemeinsam auftreten bzw. in einer Wechselbeziehung stehen.

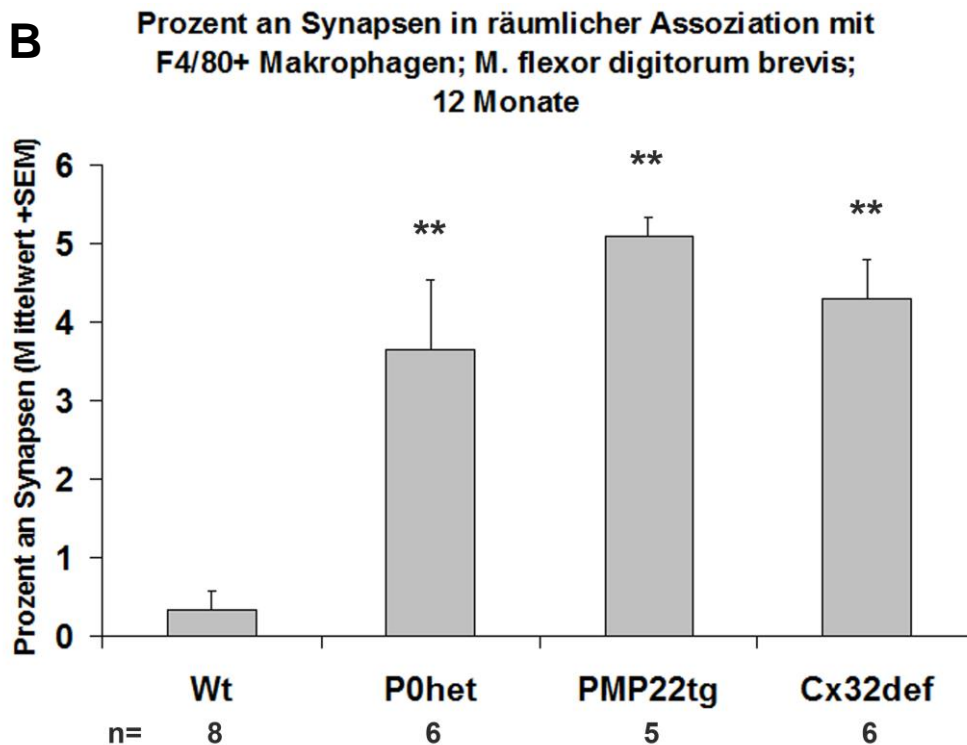
Hierfür wurden die gleichen Mäuse verwendet, wie für das vorangehende Experiment und Querschnitte des Musculus flexor digitorum brevis gegen den präsynaptischen Marker Synaptophysin und gegen das Makrophagen-Oberflächenprotein F4/80 gefärbt. Acetylcholinrezeptoren der Postsynapse wurden mittels  $\alpha$ -Bungarotoxin dargestellt und Zellkerne mittels DAPI.

Bei den Untersuchungen zeigte sich bei allen 6 Monate alten Wildtypen 0,25% der Endplatten in Assoziation mit Makrophagen. In 6 Monate alten Myelin Mutanten fiel eine deutliche Zunahme der Anzahl an neuromuskulären Synapsen in räumlicher Assoziation mit Makrophagen auf (Abb. 7A). Dabei ließen sich für entsprechende Synapsen ausnahmslos sowohl jeweils eine vollständige präsynaptische Terminalie wie auch eine korrespondierende Postsynapse nachweisen. Diese Synapsen können also nach bildmorphologischen Kriterien als innerviert angesehen werden.

Die Untersuchung 12 Monate alter Tiere ergab ebenfalls einen deutlich erhöhten Prozentsatz an Synapsen, die mit einer Makrophage räumlich in Verbindung standen, verglichen mit gleichaltrigen Wildtyp-Tieren (Abb. 7B). Analog zum Wildtyp im Alter von 6 Monaten, fand man auch bei 12 Monate alten Wildtypen ca. 0,25% Endplatten assoziiert mit Makrophagen. Auch bei

diesen Tieren waren die mit Makrophagen räumlich assoziierte Synapsen fast zu 100% von einer korrespondierenden Präsynapse innerviert (Abb. 8). Diese Ergebnisse korrelieren mit den Vorangegangenen aus 3.1. Interessant ist hier allerdings folgender Sachverhalt: der mittlere Prozentsatz an innervierten und mit Makrophagen assoziierten Endplatten (in 6 Monate alten Myelin Mutanten: 1,6%; in 12 Monate alten Myelin Mutanten: 4,3%) ist in beiden Altersgruppen nahezu identisch zum mittleren Prozentsatz an denervierten/partiell denervierten Endplatten, die nicht mit Makrophagen assoziiert sind (in 6 Monate alten Myelin Mutanten: 1,9%; in 12 Monate alten Myelin Mutanten: 4,35%). Dieser Sachverhalt kann Rückschlüsse auf die Rolle der Makrophagen an der NMJ geben, wenn angenommen wird, dass Makrophagen an innervierte NMJs assoziieren (da denervierte NMJs keine Assoziation zeigen) und im Verlauf wieder dissoziieren. Da sich letztlich die Anzahl an denervierten Endplatten ohne assoziierte Makrophagen identisch zeigt zur Anzahl an innervierten NMJs mit Makrophagen, kann angenommen werden, dass die Denervation der Endplatten mit der Assoziation von Makrophagen zusammenhängt.



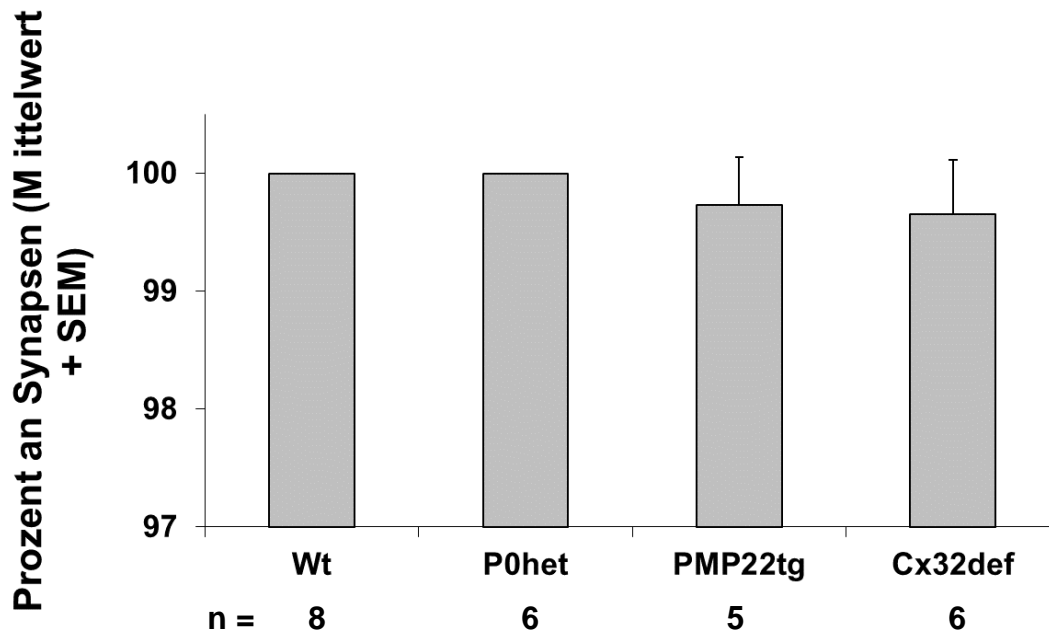


**Abb.7: Räumliche Assoziation von Makrophagen mit neuromuskulären Endplatten in Myelin Mutanten**

(A) Quantifizierung von neuromuskulären Endplatten, die mit Makrophagen assoziiert sind in 6 Monate alten Myelin Mutanten und Wildtyp Mäusen. In allen Myelin Mutanten fiel eine Zunahme der mit Makrophagen assoziierten Synapsen im Vergleich zum Wildtyp auf. (B) Quantifizierung der mit Makrophagen räumlich assoziierten Synapsen in 12 Monate alten Myelin Mutanten und Wildtyp Mäusen. Die Myelin Mutanten zeigten signifikant höhere Assoziationen als die Wildtyp Tiere. In 12 Monate alten Myelin Mutanten fanden sich fast doppelt so viele mit Makrophagen assoziierte Synapsen verglichen mit 6 Monate alten Mutanten, während im Wildtyp diesbezüglich kein Unterschied erkennbar war.  $p < 0,05 = *$ ,  $p < 0,01 = **$



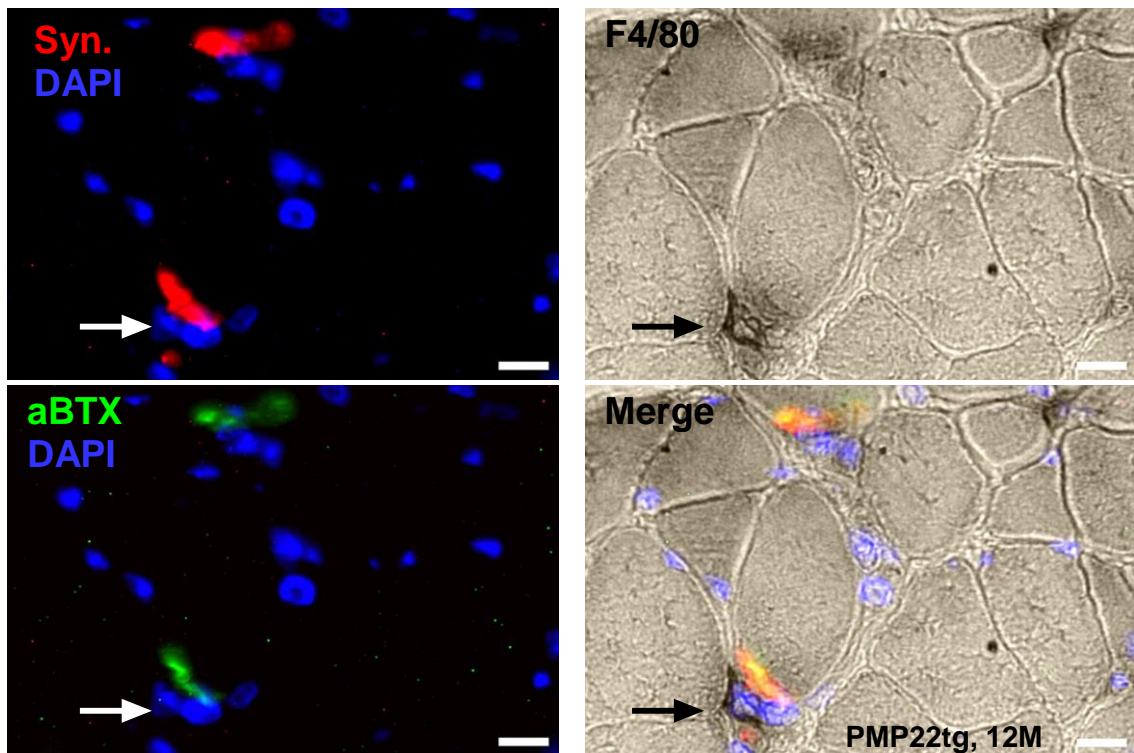
**Innervation von F4/80+ Makrophagen- assoziierten  
Synapsen  
M. flexor digitorum brevis; 12 Monate**



**Abb. 8: Die mit Makrophagen assoziierten Synapsen sind sowohl in Myelin Mutanten wie auch im Wildtyp fast zu 100% innerviert**

Quantifizierung von neuromuskulären Endplatten, die gleichzeitig mit einer Makrophage räumlich assoziiert und durch eine Präsynapse innerviert sind; sowohl im Wildtyp wie auch in den untersuchten Myelin Mutanten zeigten sich nahezu alle mit Makrophagen assoziierte Synapsen vollständig innerviert. Lediglich PMP22tg und Cx32def Mäuse wiesen vereinzelte Synapsen mit partieller Denervation auf, jedoch nie vollständig denervierte Endplatten.

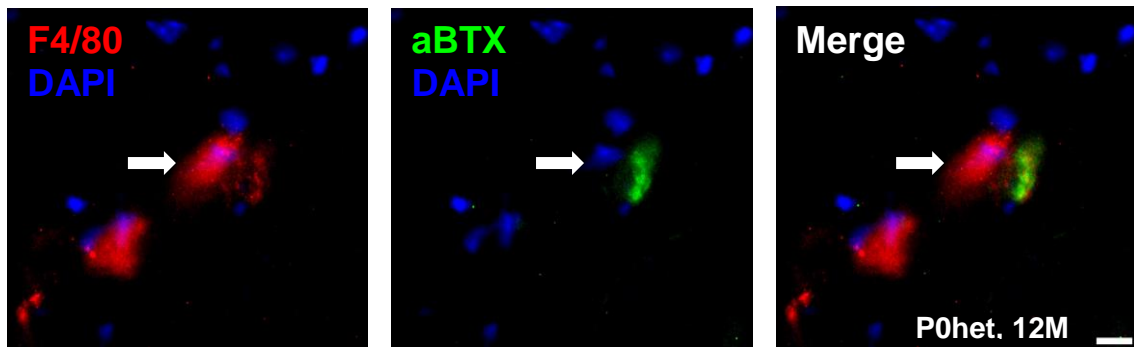
Bei der Untersuchung war weiterhin auffällig, dass in der Gruppe der 12 Monate alten Mäuse der Prozentsatz an mit Makrophagen assoziierten Synapsen teilweise doppelt so hoch war wie in der Gruppe der 6 Monaten alten Tiere. Dies konnte allerdings nicht bei Wildtyp Mäusen beobachtet werden. Darüber hinaus fiel eine höhere Signifikanz der Ergebnisse in der 12-Monats Altersgruppe auf.



**Abb. 9: Räumliche Assoziation von Makrophagen mit der neuromuskulären Endplatte in 12 Monate alten PMP22tg Mutanten**

Immunohistochemische Darstellung der präsynaptischen Endigung (Synaptophysin, rot), der Postsynapse (Alpha-Bungarotoxin, grün) und F4/80-positiver Makrophagen (Diaminobenzidin-Präzipitat, braun) auf einem Querschnitt des M. flexor digitorum brevis einer 12 Monate alten PMP22tg Mutanten. Auf der Abbildung zeigen sich zwei neuromuskuläre Endplatten, wobei die untere einen räumlich sehr engen Kontakt mit einer F4/80+ Makrophage ausbildet (siehe Pfeile). Diese Endplatte ist außerdem eindeutig durch eine Präsynapse innerviert. Zellkerne sind mittels DAPI angefärbt und stellen sich als blaue Profile dar. Maßstab = 10µm.

Als zusätzliche Untersuchung, wurden 3fach-Immunfluoreszenz-Färbungen an Muskelquerschnitten durchgeführt (Abb. 10). Hier wurde die neuromuskuläre Endplatte nur durch Färbung der Postsynapse mittels a-BTX dargestellt, Makrophagen durch Färbung gegen F4/80 und Zellkerne mittels DAPI. Bei diesen Untersuchungen konnten ebenfalls gezeigt werden, dass Makrophagen bei Myelin Mutanten eine deutlich erhöhte Assoziation zur neuromuskulären Endplatte aufweisen.



**Abb. 10: Räumliche Assoziation von Makrophagen mit der neuromuskulären Endplatte in 12 Monate alten P0het Mutanten**

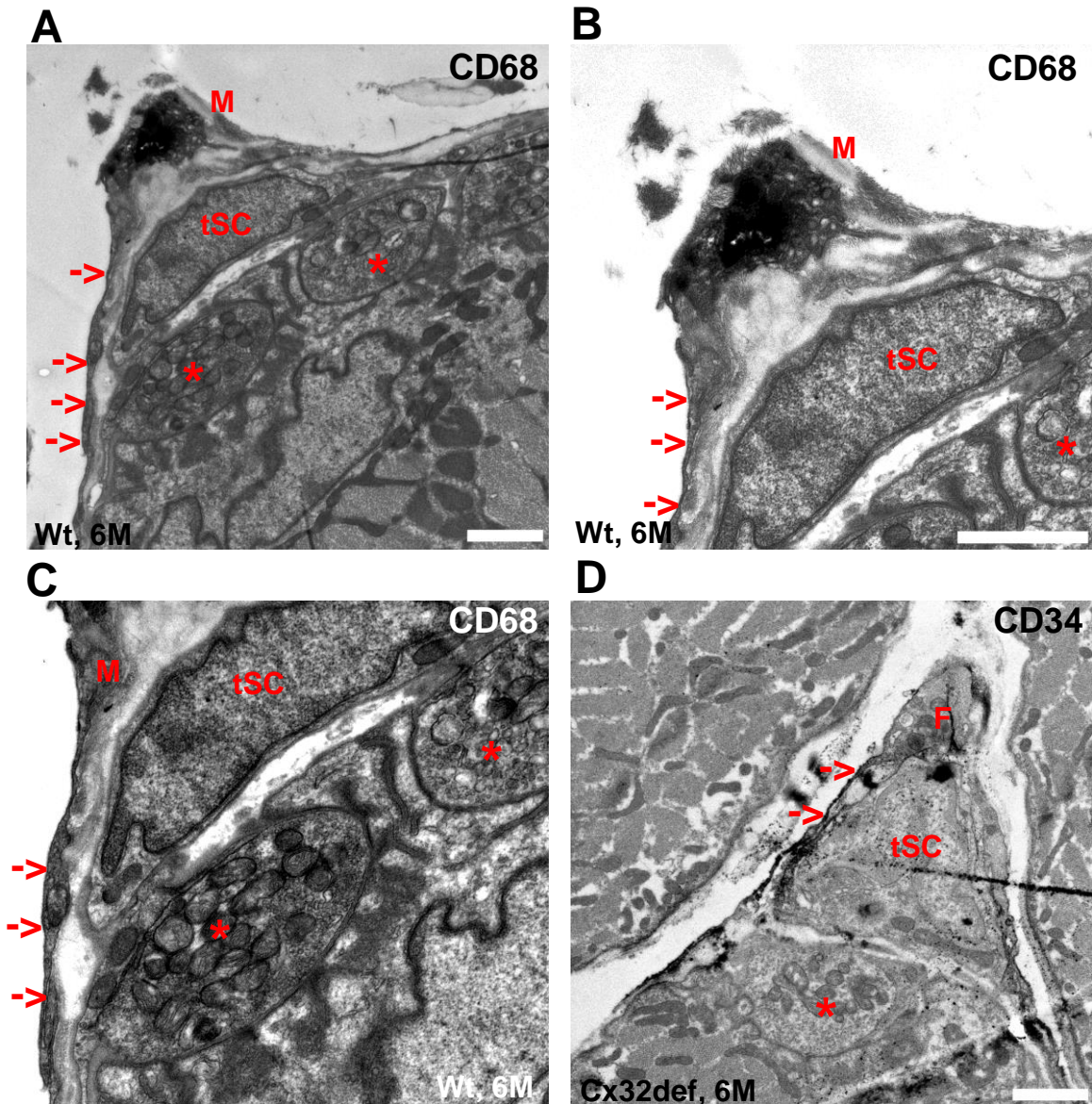
Repräsentative immunhistochemische Färbung von Alpha-Bungarotoxin (aBTX, grün) zur Detektion der Postsynapse von neuromuskulären Endplatten sowie Färbung von F4/80 (rot) zur Darstellung von Makrophagen in einem Querschnitt des *M. flexor digitorum brevis* einer 12 Monate alten P0het Mutanten. Zellkerne sind mittels DAPI angefärbt und zeigen sich als blaue Profile. Die Pfeile stellen eine F4/80 positive Makrophage in enger räumlicher Assoziation zur Postsynapse einer neuromuskulären Endplatte dar. Daneben ist eine weitere F4/80 positive Makrophage ohne Kontakt zur Endplatte sichtbar. Maßstab = 10µm

**3.2.1. Ultrastrukturelle Charakterisierung der Makrophagen-Endplatten-Assoziation**

Im nächsten Schritt wurde die räumliche Verbindung zwischen Makrophagen und neuromuskulären Endplatten auf ultrastruktureller Ebene analysiert, um einen detaillierten Eindruck der Assoziation zu bekommen. Hierfür wurden immunhistochemisch gefärbte Muskelquerschnitte von Myelin Mutanten und Wildtyp Mäusen mit Hilfe des Elektronenmikroskops untersucht. Zur Darstellung von Makrophagen wurde ein Antikörper gegen das lysosomale Makrophagen-Antigen CD68 verwendet. Des Weiteren wurden in diesem Versuch Fibroblasten mit einem Antikörper gegen CD34 gefärbt.

In dieser Untersuchung konnte eine sehr enge räumliche Assoziation von Makrophagen mit neuromuskulären Endplatten gezeigt werden (Abb. 11A-C). Die Makrophagen bildeten räumlich dichte Zellkontakte insbesondere mit dem neuronalen Anteil der neuromuskulären Synapse aus.

Analog zu Court et al. (Court et al., 2008b) konnten mit dieser Untersuchung außerdem die Lokalisation von Fibroblasten an der NMJ und deren integrale Zugehörigkeit zur physiologischen NMJ dargestellt werden (Abb. 11D).



**Abb. 11: Elektronenmikroskopische Darstellung der räumlichen Assoziation von Makrophagen und Fibroblasten mit neuromuskulären Endplatten**

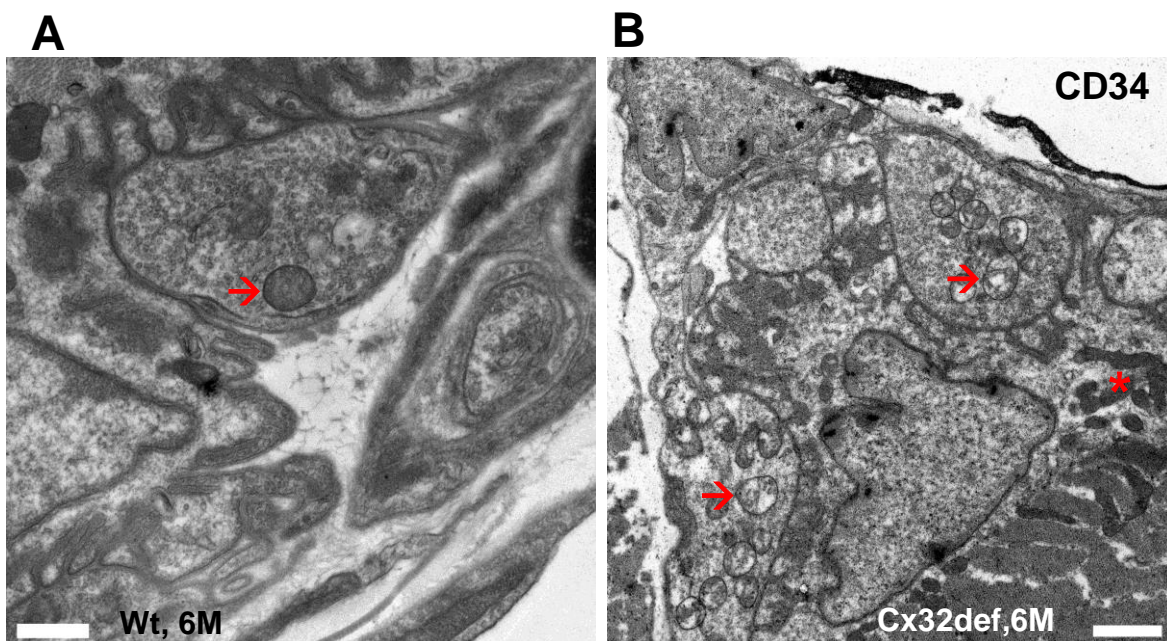
(A) Repräsentative elektronenmikroskopische Darstellung der räumlichen Assoziation einer CD68+ Makrophage (M) mit der Präsynapse einer NMJ in einem Querschnitt des M. flexor digitorum brevis einer 6 Monate alten Wildtyp Maus. Hier zeigt sich deutlich wie die Makrophage mit Hilfe ihrer Zellfortsätze (Pfeile) einen direkten Zell-Zellkontakt zur terminalen Schwann Zelle (tSC) und terminalen Nervenendigung (Stern) herstellt. Die perisynaptische Fibroblaste, die man zwischen Makrophage und terminaler Schwann Zelle erwartet, wird in dieser Abbildung nur angedeutet sichtbar. (B) zeigt einen vergrößerten Ausschnitt aus Abbildung A mit Darstellung einer CD68+

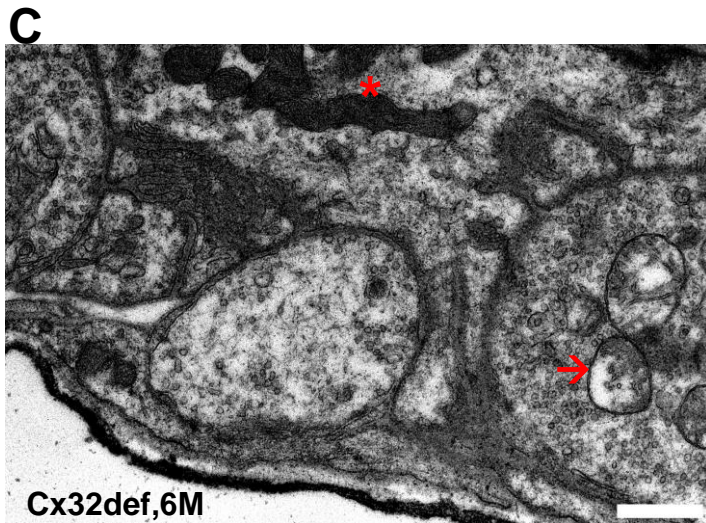


Makrophage (M) in räumlicher Assoziation zur terminalen Schwann Zelle (tSC) einer Präsynapse. Hier zeigt sich ein direkter Kontakt zwischen dem Fortsatz der Makrophage (Pfeil) und der terminalen Schwann Zelle. Man beachte außerdem, charakteristisch für den lysosomalen CD68 Antikörper, eine Färbung des Zellinneren der Makrophage. (C) zeigt einen vergrößerten Ausschnitt aus Abbildung A. Hier stellt sich eine CD68+ Makrophage (M) dar, die über Zellfortsätze (Pfeile) engen Kontakt zur terminalen Schwann Zelle (tSC) und zur präsynaptischen Terminalie (Stern) herstellt. (D) Repräsentative elektronenmikroskopische Darstellung einer CD34+ Fibroblaste (F) als integraler Bestandteil der Präsynapse einer neuromuskulären Endplatte im Querschnitt des M. flexor digitorum brevis einer 6 Monate alten Cx32def Mutanten. Charakteristisch für CD34 Antikörper ist hier die Zelloberfläche der Fibroblaste gefärbt. Die Fibroblaste stellt über ihren Zellfortsatz (Pfeile) einen direkten Kontakt zur terminalen Schwann Zelle (tSC) sowie zur terminalen Nervenendigung (Stern) her. Man beachte zum Vergleich das Schema auf Abb. 1, S.1. Maßstab= 5µm.

### 3.2.2. Ultrastruktureller Nachweis morphologischer Veränderungen präsynaptischer Terminalien Cx32 defizienter Mutanten

Des Weiteren war im Rahmen der elektronenmikroskopischen Untersuchungen auffällig, dass Cx32def Mutanten im Vergleich zum Wildtyp strukturelle Veränderungen der Morphologie ihrer neuronalen Mitochondrien aufwiesen. Diese Veränderungen waren nur an Mitochondrien der Präsynapse detektierbar und entsprechende Mitochondrien imponierten geschwollen und balloniert (Abb. 12B,C). Die Mitochondrien in den Muskelfasern der Cx32def Mutanten hingegen zeigten keinen morphologischen Unterschied zu jenen im Wildtyp.





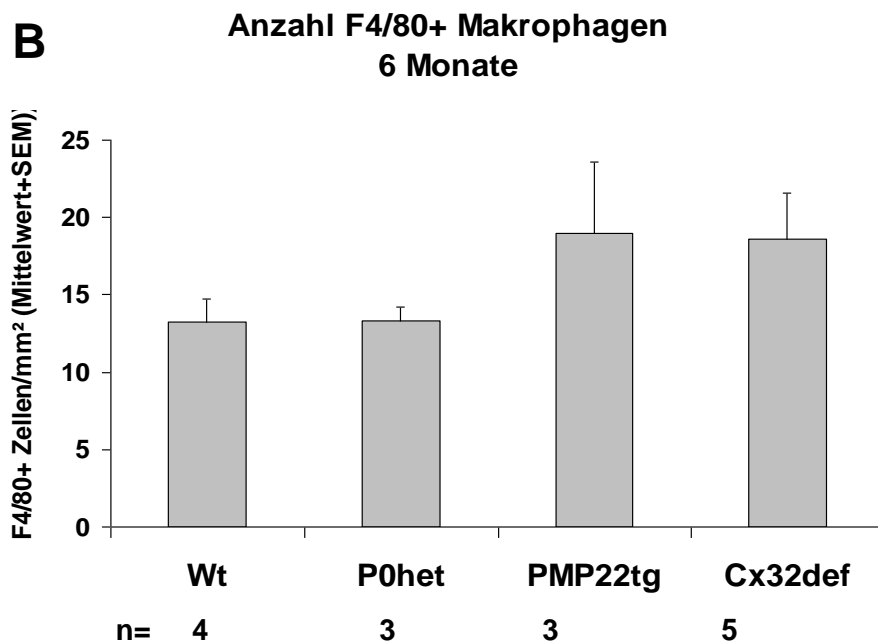
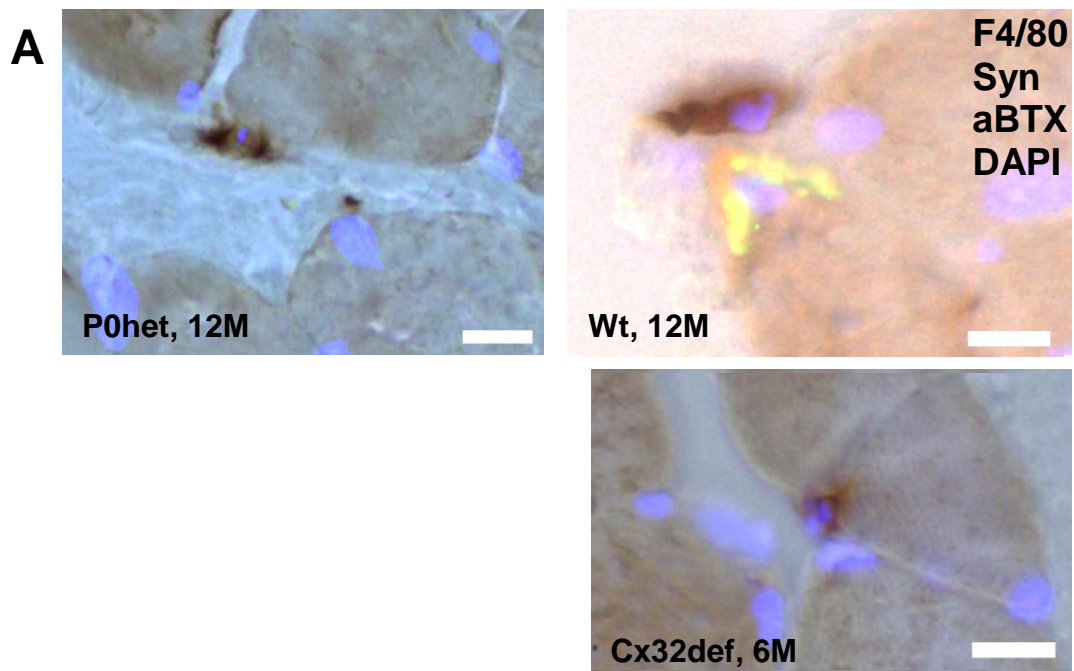
**Abb. 12: Elektronenmikroskopische Darstellung präsynaptischer Terminalien von Wildtyp und Cx32def Mäusen**

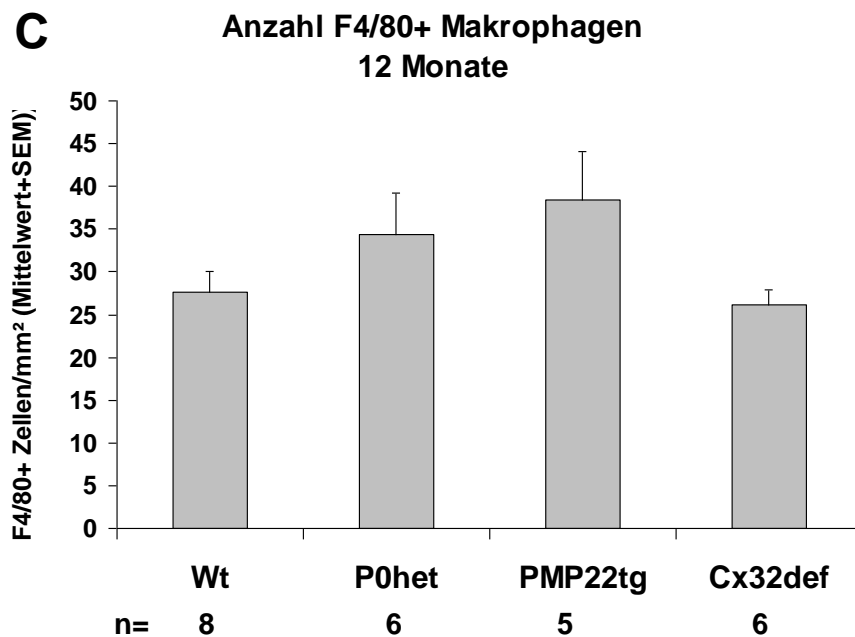
(A) Repräsentative elektronenmikroskopische Darstellung der Präsynapse einer 6 Monate alten Wildtyp Maus in einem Querschnitt des *M. flexor digitorum brevis*. Der rote Pfeil markiert eine Mitochondrie in der Nerventerminalie. Maßstab=1 $\mu$ m (B) und (C) Elektronenmikroskopische Darstellung von Präsynapsen einer 6 Monate alten Cx32def Mutanten in einem Querschnitt des *M. flexor digitorum brevis*. Die präsynaptischen Mitochondrien (Pfeil) sind im Vergleich zum Wildtyp deutlich vergrößert, geschwollen und erschienen balloniert. Man beachte auch, dass die Mitochondrien in den Muskelfasern (Stern) keine derartige Morphologie aufweisen, sondern vergleichbar sind mit muskulären Mitochondrien im Wildtyp. Maßstab in B= 2  $\mu$ m, Maßstab in C= 1 $\mu$ m

**3.3. Die Anzahl an Makrophagen ist in den Gesamtmuskeln von Myelin Mutanten im Vergleich zu Wildtypen nicht signifikant verändert**

Um zu untersuchen ob Makrophagen selektiv an der neuromuskulären Endplatte zahlenmäßig zunehmen oder im Rahmen pathologischer Prozesse im gesamten Muskel häufiger vorkommen, wurde im nächsten Schritt die Anzahl an Makrophagen im Gesamtmuskel von Wildtyp und Myelin Mutanten im Alter von 6 und 12 Monaten bestimmt. Es wurden Querschnitte des *M. flexor digitorum brevis* untersucht und Makrophagen mittels eines Antikörpers gegen F4/80 gefärbt. Die Makrophagen wurden durchlichtmikroskopisch anhand eines braunen Diaminobenzidin (DAB)-Präzipitats und korrespondierender Zellkerne (mit DAPI blau gefärbt) identifiziert.

Bei dieser Untersuchung zeigte sich in Myelin Mutanten beider Altersgruppen kein signifikanter Unterschied der Anzahl an Makrophagen im Muskelquerschnitt verglichen mit dem Wildtyp (Abb. 13B,C). Vergleicht man die Gruppe der 6 Monate alten mit den 12 Monate alten Mäusen, fällt ein Anstieg der Makrophagen im Muskel sowohl im Wildtyp als auch in den Myelin Mutanten um fast 100% auf. Daraus lässt sich somit ein am ehesten altersbedingter Anstieg an Makrophagen in den Muskeln schlussfolgern.





**Abb. 13: Anzahl von F4/80+ Makrophagen im Muskelquerschnitt von Wildtyp und Myelin Mutanten Mäusen**

(A) Repräsentative Darstellungen von F4/80+ Makrophagen (durch DAB-Präzipitat braun gefärbt) auf Querschnitten des *M. flexor digitorum brevis* von Myelin Mutanten und Wildtypen. Die Makrophagen sind jeweils durch einen Pfeil markiert. Zellkerne sind mittels DAPI blau gefärbt. Auf der Abbildung oben rechts (Wt, 12M) ist neben einer Makrophage zusätzlich eine NMJ (Synaptophysin und aBTX positiv) abgebildet. Die Makrophage ist räumlich mit der NMJ assoziiert. Maßstab= 10µm. (B) und (C) Quantifizierung von F4/80+ Makrophagen auf Muskelquerschnitten von 6 und 12 Monate alten Wildtypen und Myelin Mutanten. Es wurden jeweils Makrophagen pro mm<sup>2</sup> bestimmt.

### **3.4. Im Krankheitsverlauf nehmen pathologische Merkmale (Denervation, Makrophagen-Endplatten-Assoziation) an der neuromuskulären Endplatte sowie im Muskel in P0het Mutanten zu**

Bei Erkrankungen, wie der CMT Neuropathie, die einen klinisch progressiven Verlauf zeigen, erwartet man auch hinsichtlich pathogenetischer Merkmale eine Progredienz. In den vorangegangenen Experimenten war bereits aufgefallen, dass die untersuchten pathologischen Merkmale Denervation, Assoziation und Zunahme von Makrophagen im Muskel bei 12 Monate alten Myelin Mutanten im

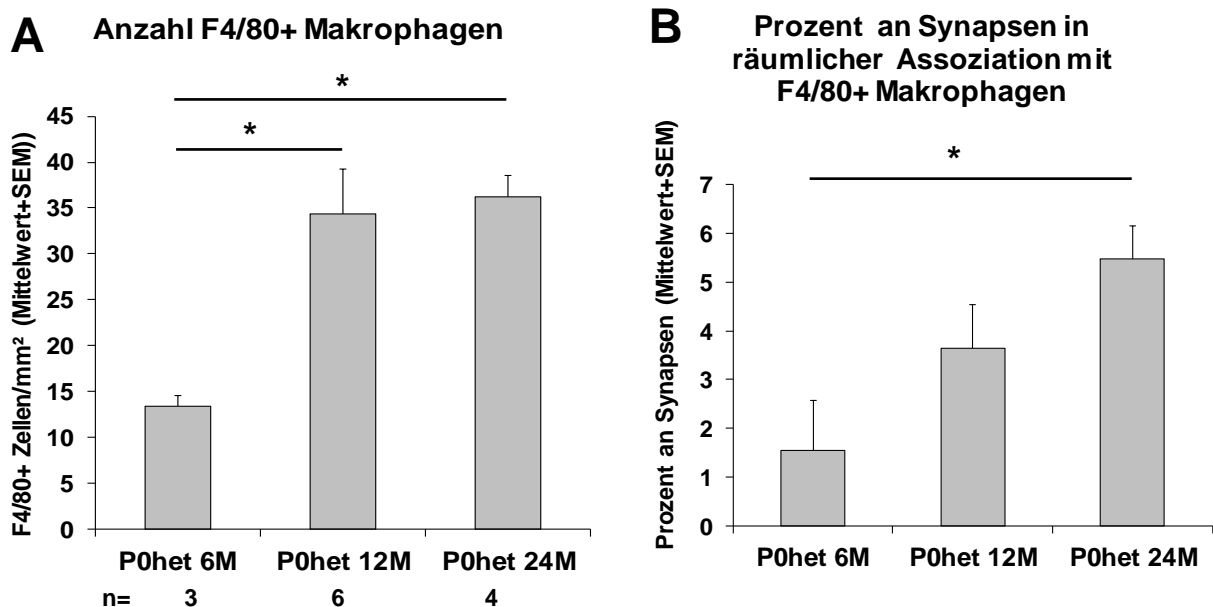


Vergleich zu 6 Monaten alten Mäusen anstiegen. Daher sollte im nächsten Schritt untersucht werden, ob es im weiteren Verlauf der Erkrankung zu einer weiteren Zunahme dieser neuropathologischen Merkmale kommt.

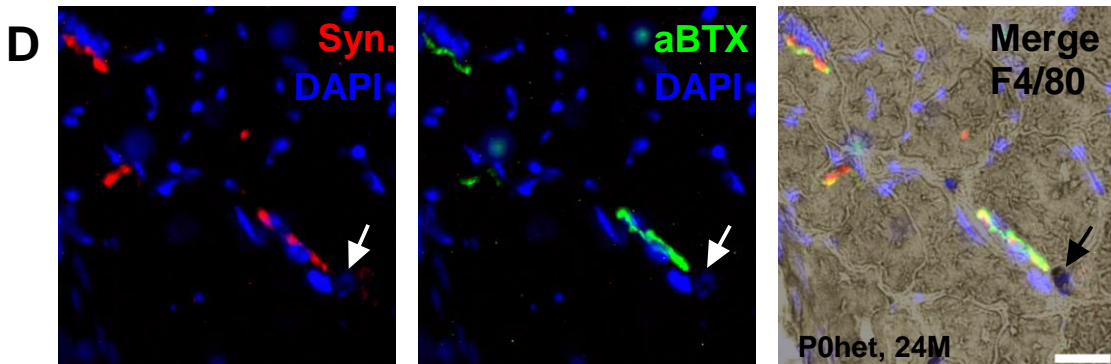
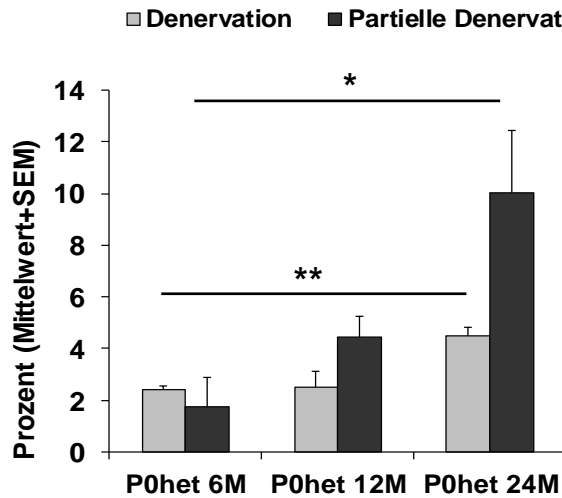
Für diese Untersuchungen wurden 24 Monate alte P0het Mutanten verwendet und die Ergebnisse mit den Untersuchungen der 6 und 12 Monate alten P0het Mutanten verglichen. Es wurde wieder jeweils der *M. flexor digitorum brevis* verwendet und identische Färbungen durchgeführt wie oben beschrieben.

Hier konnte im Verlauf von 6 zu 24 Monaten ein signifikanter Anstieg der Anzahl an Makrophagen im Gesamtmuskel festgestellt werden (Abb. 14A). Am deutlichsten zeigte sich der Anstieg zwischen 6 Monate und 12 Monate alten Tieren, wobei die Anzahl an Makrophagen zwischen 12 und 24 Monaten nahezu gleichbleibend war. Des Weiteren war auch eine deutliche Zunahme der Synapsen, die mit einer Makrophage räumlich assoziiert waren zu beobachten (Abb. 14B). Auch bei 24 Monate alten P0het Mutanten waren allen Synapsen, die mit einer Makrophage assoziiert waren, innerviert.

Die Quantifizierung denervierter/partiell denervierter Endplatten zeigte ebenso einen kontinuierlichen Anstieg zwischen 6, 12 und 24 Monate alten Mutanten (Abb. 14C). Auch in diesem Fall ist zu beachten, dass die Anzahl an denervierten Endplatten (bei 24 Monate alten P0 Mutanten: 4,48%) nahezu mit der Anzahl an Synapsen, die mit einer Makrophage assoziiert sind (bei 24 Monate alten P0 Mutanten: 5,48%) übereinstimmt.



### C Denervation/partielle Denervation neuromuskulärer Synapsen



### Abb. 14: Anstieg von Makrophagen an der NMJ und im Muskel sowie Zunahme der Denervation im Krankheitsverlauf in P0het Myelin Mutanten

(A) Quantifizierung der Anzahl F4/80+ Makrophagen pro mm<sup>2</sup> im Querschnitt des M. flexor digitorum brevis von 6, 12 und 24 Monate alten P0het Mutanten. Es findet sich ein signifikanter Anstieg von 6 auf 12 und von 6 auf 24 Monate.  $p < 0,05 = *$ ,  $p < 0,01 = **$   
 (B) Quantifizierung der neuromuskulären Synapsen die mit Makrophagen räumlich assoziiert sind in Prozent. Hier zeigt sich ein kontinuierlicher Anstieg im Krankheitsverlauf.  $p < 0,05 = *$   
 (C) Quantifizierung der denervierten/partiell denervierten neuromuskulären Endplatten in Prozent. Auch hier zeigt sich insbesondere im Verlauf von 6 zu 24 Monaten eine signifikante Zunahme denervierter/partiell denervierter Endplatten.  $p < 0,05 = *$ ,  $p < 0,01 = **$   
 (D) Repräsentative immunohistochemische Darstellung einer innervierten NMJ in räumlicher Assoziation mit einer F4/80+ Makrophage (Pfeil) auf dem Querschnitt des M. flexor digitorum brevis einer 24 Monate alten P0het Myelin Mutanten. Zellkerne sind mit DAPI gefärbt und als blaue Profile zu sehen. Maßstab=20µm

### **3.5. Makrophagen-Endplatten-Assoziation und Denervation von Endplatten nehmen im Rahmen des Alterungsprozesses im Wildtyp zu**

In vorangegangenen Experimenten dieser Arbeit ist aufgefallen, dass die untersuchten pathogenetischen Merkmale (Makrophagen-Endplatten-Assoziation, Denervation, erhöhte Makrophagenanzahlen im Muskel) nicht nur in entsprechenden Myelin Mutanten, sondern in geringerem Umfang auch im Wildtyp nachweisbar waren. Des Weiteren wurde 2014 durch Gonzalez-Freire et al. beschrieben, dass es im Rahmen physiologischer Alterungsprozesse auch zu degenerativen Veränderungen und Beeinträchtigungen der neuromuskulären Endplatten kommt (Gonzalez-Freire et al., 2014). Vor diesem Hintergrund wurde im nächsten Schritt dieser Arbeit untersucht ob und wie sich Denervation, Makrophagen-Endplatten-Assoziation und Anzahl an Makrophagen im Gesamtmuskel im Verlauf der physiologischen Alterung verändern.

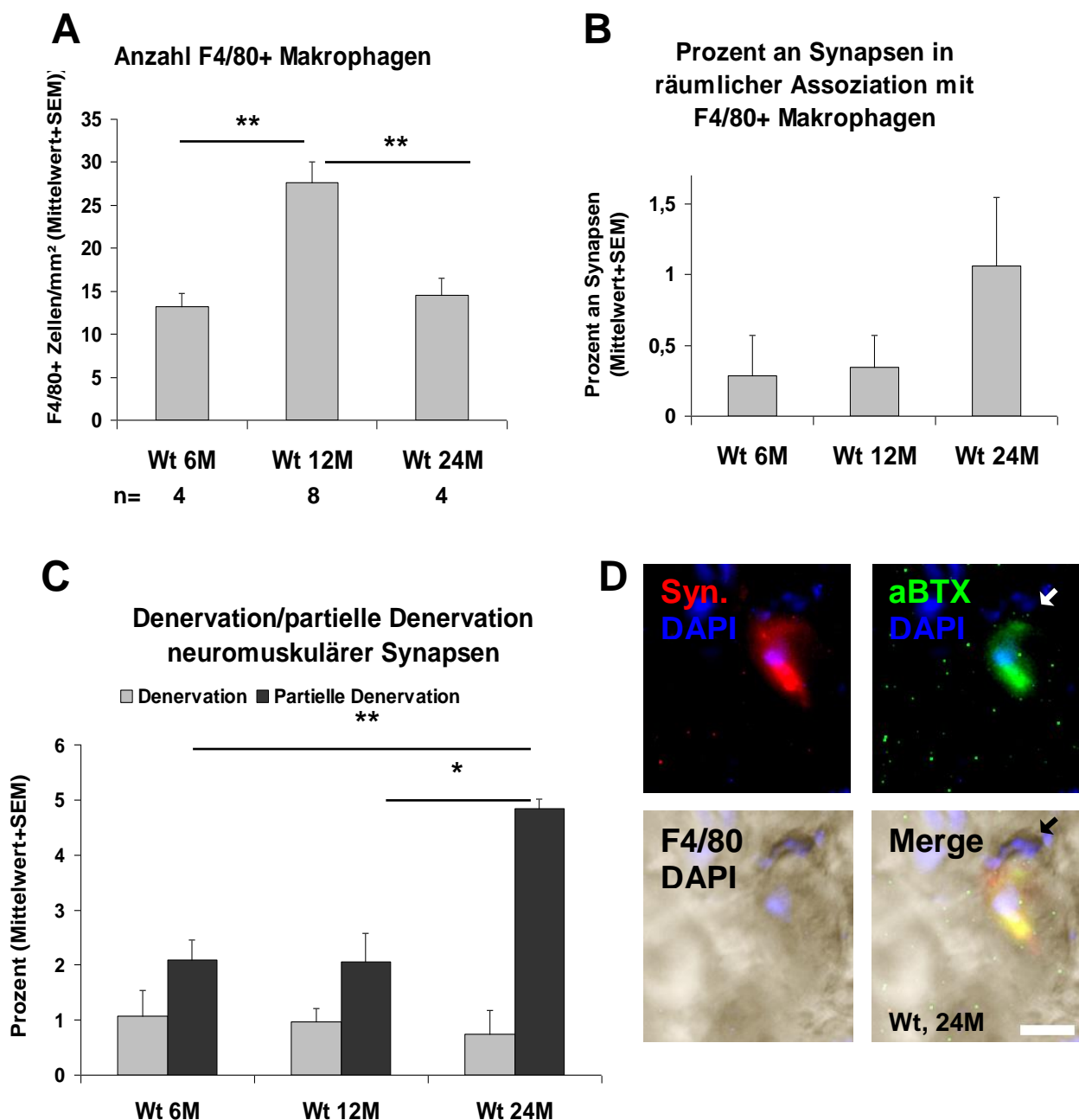
Für diese Untersuchungen wurden zusätzlich 24 Monate alte Wildtyp Mäuse verwendet und jeweils der *M. flexor digitorum brevis* wie oben beschrieben behandelt und immunhistochemisch gefärbt. Die Ergebnisse der Auswertung wurden mit den bereits vorliegenden Ergebnissen der 6 und 12 Monate alten Wildtypen verglichen.

Hierbei zeigte sich ein deutlicher Anstieg der Anzahl an Makrophagen im Muskelquerschnitt von 12 Monate alten Wildtypen in Vergleich zu 6 Monate alten Tieren, wobei die Anzahl an F4/80+ Zellen interessanterweise in den 24 Monate alten Wildtyp Mäusen wieder nahezu auf den initial erhobenen Wert bei 6 Monate alten Tieren rückläufig war (Abb. 15A).

Die Quantifizierung der Anzahl an Synapsen in Assoziation mit Makrophagen ergab für 6 und 12 Monate alte Tiere nahezu identische niedrige Werte von 0,28% für 6 Monate alte Wildtypen und 0,34% für 12 Monate alte Tiere. Im Verlauf von 12 zu 24 Monaten zeigte sich jedoch ein deutlicher Anstieg an Endplatten, die mit Makrophagen räumlich assoziiert waren auf 1,1% in 24

Monate alten Wildtypen (Abb. 15B). Entsprechende Endplatten zeigten sich auch hier stets innerviert.

Die Auswertung der Denervation ergab ein ähnliches Bild mit nahezu identischen Werten hinsichtlich Denervation/partieller Denervation für 6 und 12 Monate alte Tiere. Die 24 Monate alten Wildtypen zeigten leicht rückläufige Anzahlen an denervierten Endplatten, jedoch war die Anzahl an partiell denervierten Endplatten signifikant erhöht im Vergleich zu 6 und 12 Monate alten Tieren (Abb. 15C).



**Abb. 15: Im Rahmen des Alterungsprozesses nehmen Makrophagen-Endplatten - Assoziation und partielle Denervation von Synapsen im Wildtyp zu**

(A) Quantifizierung von F4/80+ Makrophagen im Querschnitt des M. flexor digitorum brevis von 6-24 Monate alten Wildtypen. Die Anzahl an Makrophagen ist in 12 Monate alten Tieren signifikant erhöht im Vergleich zu 6 Monate alten Tieren, wobei sich bei 24 Monate alten Tieren eine Abnahme der Makrophagen zeigt mit einem Wert nahezu identisch zu 6 Monate alten Wildtypen. (B) Quantifizierung der Synapsen die räumlich mit Makrophagen assoziiert sind. Hier zeigt sich eine deutliche Zunahme bei 24 Monate alten Wildtypen im Vergleich zu 6 und 12 Monaten. (C) Die Auswertung der Anzahl an denervierten/partiell denervierten NMJs zeigt eine signifikante Zunahme der partiell denervierten Endplatten bei 24 Monate alten Wildtypen verglichen mit 6 und 12 Monate alten Tieren.  $p < 0,05 = *$ ,  $p < 0,01 = **$  (D) Repräsentative immunhistochemische Darstellung einer F4/80+ Makrophage (Pfeil), die in räumlichem Kontakt zu einer innervierten neuromuskulären Endplatte steht. Es handelt sich hier um einen Querschnitt des M.flexor digitorum brevis einer 24 Monate alten Wildtyp Maus. Die Präsynapse ist mittels Synaptophysin (rot), die Postsynapse mit alpha-Bungarotoxin (grün) gefärbt. Zellkerne sind als blaue Profile zu erkennen. Maßstab=10µm.

Auch bei dieser Untersuchung war auffällig, dass in 24 Monate alten Tieren sowohl ein Anstieg an NMJs, die mit Makrophagen assoziiert waren zu verzeichnen war ebenso wie eine Zunahme an partiell denervierten Endplatten, während die Gesamtzahl an Makrophagen im Muskel rückläufig war. Dies deutet darauf hin, dass Denervation und partielle Denervation von neuromuskulären Synapsen von der Anzahl an Makrophagen im Gesamtmuskel eher unabhängig sind. Es scheint vielmehr ein Zusammenhang zu bestehen zwischen Makrophagen, die mit Endplatten räumlich assoziiert sind und der Denervation von Endplatten.

**3.6. CSF-1 Defizienz bewirkt eine Reduktion von Makrophagen im Muskel, an der neuromuskulären Endplatte und von denervierten Endplatten bei Cx32het Myelin Mutanten**

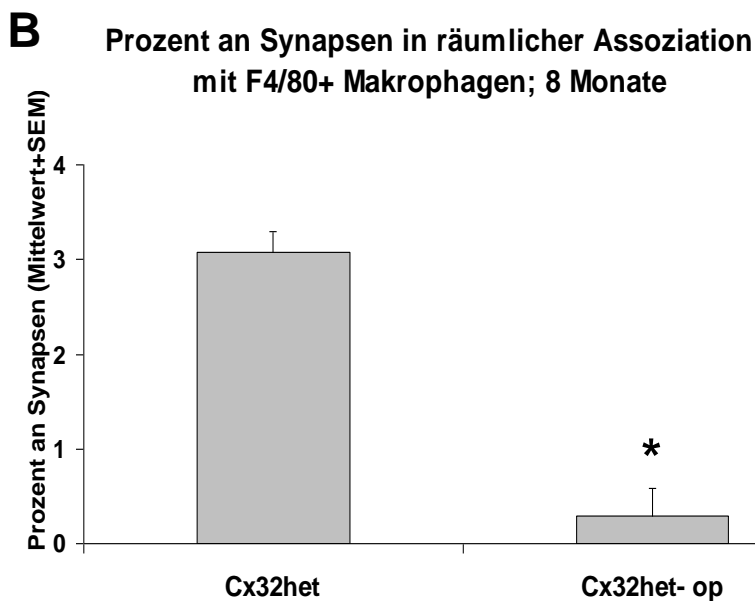
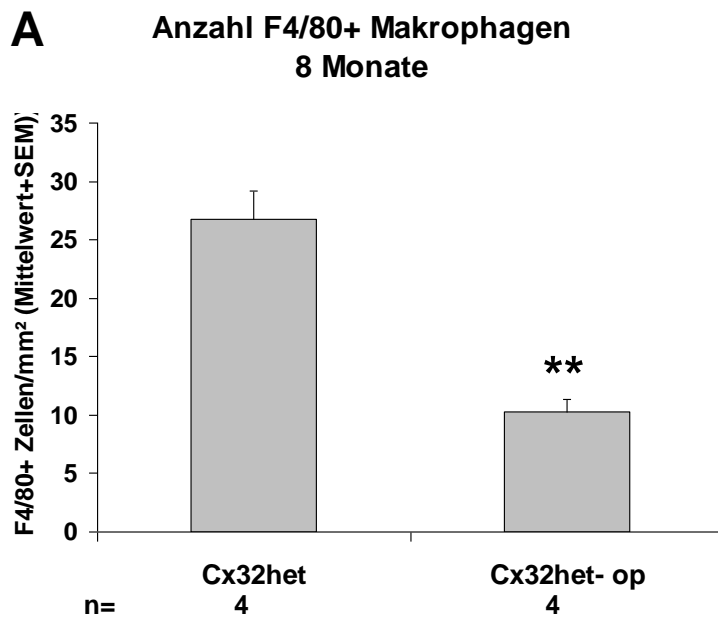
Als nächstes wurde untersucht, welche molekularen Signalwege an den bereits aufgezeigten pathogenetischen Veränderungen an der neuromuskulären Synapse in CMT Mutanten beteiligt sein könnten. In vorangegangenen Experimenten unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass CSF-1 Defizienz bei Myelin Mutanten nicht nur zu einer Verringerung der Anzahl an

Makrophagen und des neuronalen Schadens führt, sondern auch zu einer Abnahme der Denervation (Groh et al., 2012). So entstand die Vermutung, dass CSF-1 auch im Muskel bzw. an der neuromuskulären Endplatte als Mediator für Makrophagen-assoziierte pathologische Vorgänge fungiert. Um dies zu untersuchen wurden Cx32het Mutanten, die mit osteopetrotischen (op) Mäusen gekreuzt wurden, verwendet. Osteopetrotische Mutanten exprimieren kein CSF-1, sodass bei diesen Tieren formal eine CSF-1 Defizienz vorliegt. Wie bei allen vorangegangenen Experimenten wurde der M. flexor digitorum brevis von, in diesem Fall 8 Monate alten, Cx32het-op-Doppelmutanten wie oben beschrieben behandelt. Als Kontrollgruppe dienten 8 Monate alte Cx32het Mutanten ohne CSF-1 Defizienz. Bei diesen Experimenten wurde aus Gründen der Verfügbarkeit auf heterozygot Connexin32-defiziente Mäuse zurückgegriffen. Bei diesen Tieren liegt durch zufällige Inaktivierung des X-Chromosoms ein genetisches Mosaik vor.

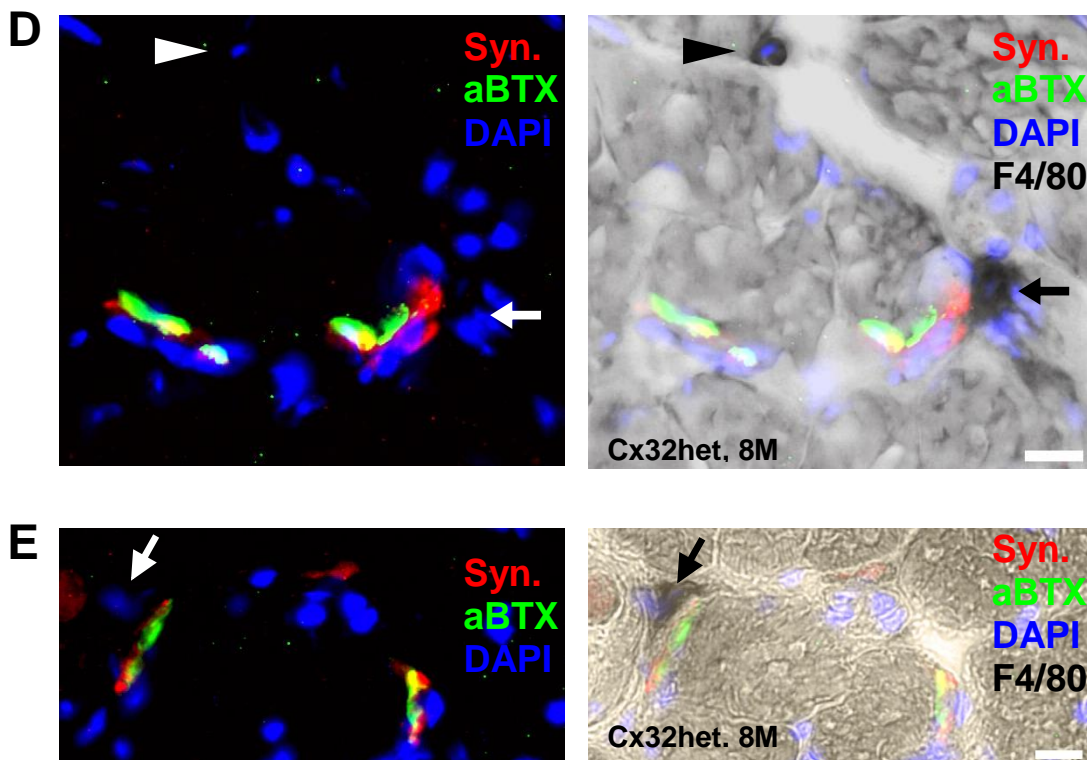
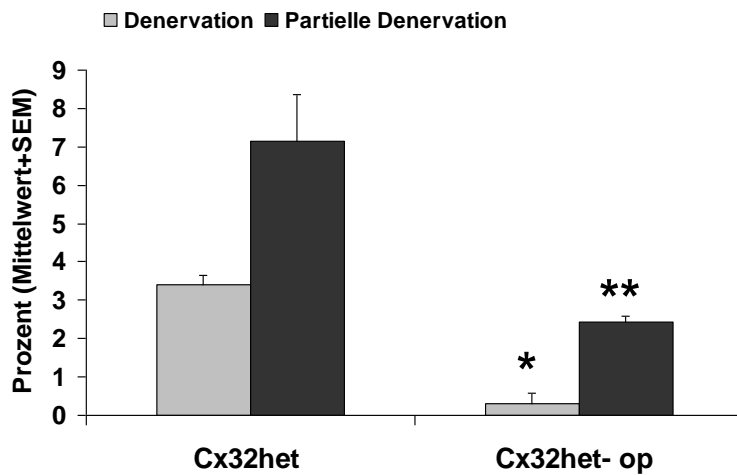
Die Quantifizierung der Anzahl an Makrophagen im Gesamtmuskel ergab im Durchschnitt 26 F4/80+ Zellen/mm<sup>2</sup> Muskel bei 8 Monate alten Cx32het Mutanten und 10 F4/80+ Makrophagen/mm<sup>2</sup> bei 8 Monate alten Cx32-op Mutanten (Abb. 16A). Dies entspricht einer signifikanten Reduktion der Anzahl an Makrophagen im Muskel bei Cx32het Myelin Mutanten mit gleichzeitig vorliegender CSF-1 Defizienz.

Als nächstes wurden Synapsen in Assoziation mit Makrophagen ausgewertet (Abb. 16B). Hier zeigte sich eine signifikante Reduktion von im Mittel 3% Synapsen assoziiert mit Makrophagen bei Cx32het Mutanten auf 0,3% bei Cx32het-op Mutanten. Bei den Cx32het Mutanten fand sich in einem Tier eine einzelne Synapse in Assoziation mit einer Makrophage, die gleichzeitig partiell denerviert war. Alle anderen Synapsen, die eine räumliche Assoziation mit Makrophagen zeigten, waren regelrecht innerviert. CSF-1 Defizienz führt also auch zu einer deutlichen Abnahme an neuromuskulären Synapsen, die mit Makrophagen assoziiert sind.

Schließlich erfolgte die Quantifizierung an denervierten/partiell denervierten Endplatten (Abb. 16C). Cx32het Mutanten zeigten ca. 3,4% denervierte und 7% partiell denervierte Endplatten, während man bei Cx32het-op Mutanten im Mittel 0,3% Denervation und 2,5% partielle Denervation fand. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass CSF-1 Defizienz zu einer signifikanten Reduktion an denervierten/partiell denervierten Endplatten in Cx32het Myelin Mutanten führt.



**C** Denervation/partielle Denervation neuromuskulärer Synapsen; 8 Monate



**Abb. 16: CSF-1 Defizienz bewirkt eine Reduktion der Makrophagen-assoziierten pathologischen Vorgänge an der neuromuskulären Endplatte in Cx32het Myelin Mutanten**

(A) Die Quantifizierung von F4/80+ Makrophagen im Querschnitt des M. flexor digitorum brevis zeigt eine signifikante Reduktion bei Cx32het-op Doppelmutanten im Vergleich zu Cx32het Mutanten im Alter von 8 Monaten. (B) Quantifizierung der Anzahl an Synapsen in räumlicher Assoziation mit F4/80+ Makrophagen. Auch hier findet sich eine deutliche Abnahme bei Cx32het-op Doppelmutanten verglichen mit Cx32het



Mutanten. (C) Die Auswertung der Anzahl an denervierten/partiell denervierten NMJs zeigt eine signifikante Abnahme bei Cx32het-op Mutanten mit vorliegender CSF-1 Defizienz im Vergleich zu Cx32het Mutanten.  $p < 0,05 = *$ ,  $p < 0,01 = **$  (D) und (E) Repräsentative immunhistochemische Darstellung von F4/80+ Makrophagen (Pfeile) in räumlicher Assoziation zur Endplatte (die Präsynapse ist mittels Synaptophysin rot gefärbt, die Postsynapse mittels alpha-Bungarotoxin grün dargestellt) im Querschnitt des M. flexor digitorum brevis von 8 Monate alten Cx32het Mutanten. Die weißen Pfeile markieren die zur Makrophage gehörigen Zellkerne (mittels DAPI als blaue Profile dargestellt). Die Pfeilspitzen in Abb. D markieren je eine weitere Makrophage ohne Kontakt zur Endplatte. Maßstab=10µm

### **3.7. Die Reduktion der MCP-1 Expression bewirkt eine Abnahme der Makrophagen-Endplatten Assoziation und Denervation von Endplatten in Cx32def Myelin Mutanten**

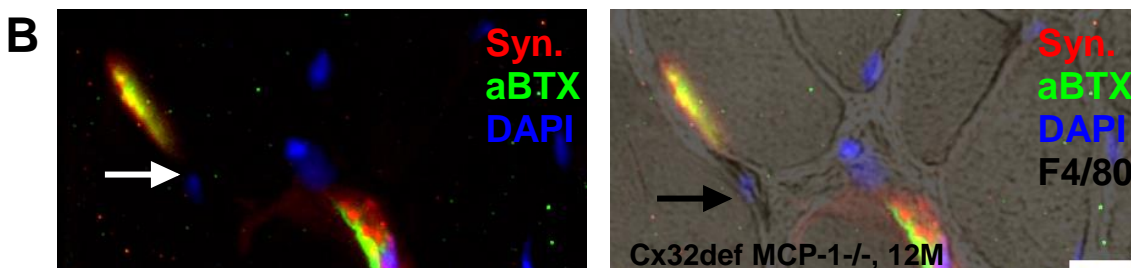
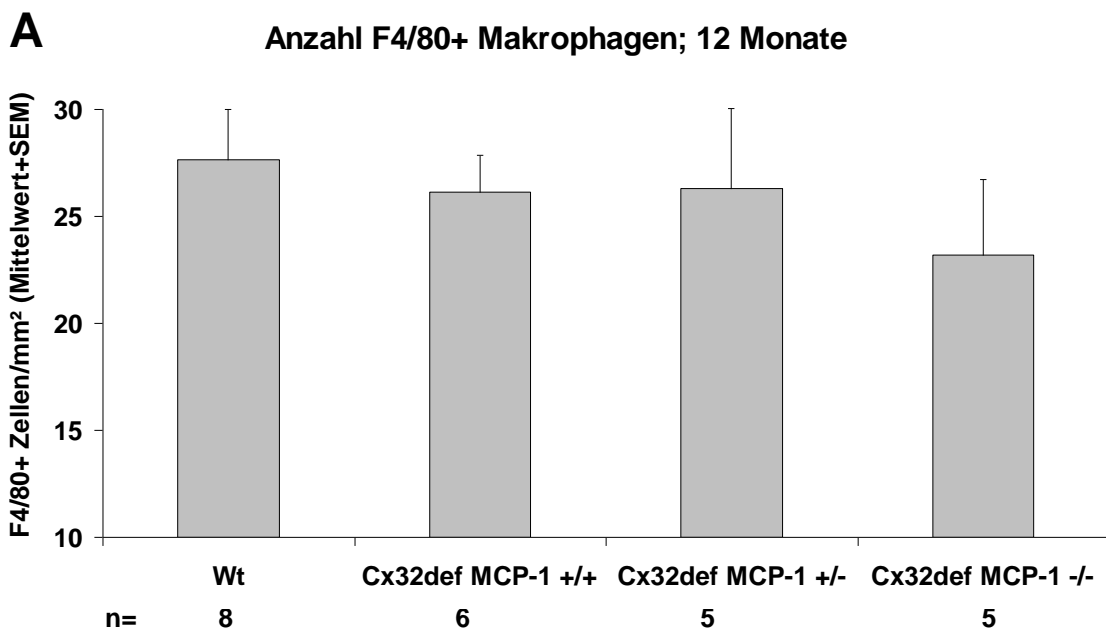
Da in unserer Arbeitsgruppe neben CSF-1 auch MCP-1 als wichtiger Mediator für Makrophagen-assoziierten neuronalen Schaden identifiziert werden konnte (Fischer et al., 2008b; Fischer et al., 2008a; Groh et al., 2010), wurde im nächsten Schritt dieser Arbeit untersucht ob MCP-1 auch an der neuromuskulären Endplatte als Makrophagen-Aktivator eine Rolle spielt. Für diese Untersuchungen wurden 12 Monate alte Cx32def Mutanten verwendet, die mit heterozygot bzw. homozygot MCP-1 defizienten Mäusen gekreuzt wurden. Die Experimente wurden wie bereits vorher beschrieben durchgeführt. Als Kontrollgruppe dienten 12 Monate alte Cx32def Mutanten ohne MCP-1 Defizienz.

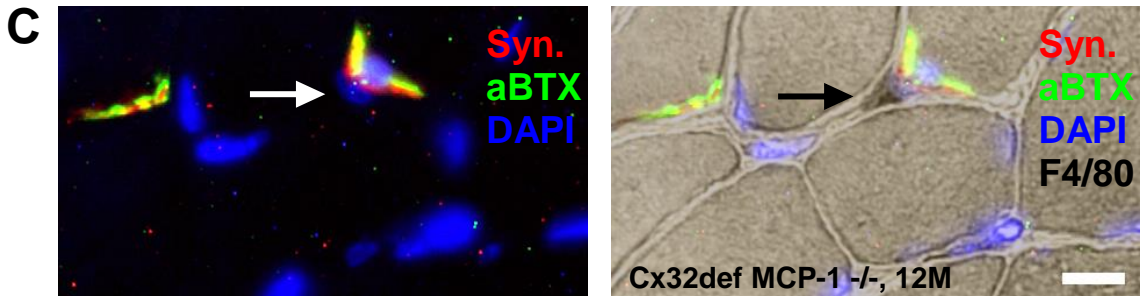
Die Quantifizierung der Anzahl an F4/80+ Makrophagen pro mm<sup>2</sup> Muskel ergab interessanterweise keinen Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen (Abb. 17A). Dies deutet darauf hin, dass die Anzahl an Makrophagen im Muskel durch MCP-1 im Wesentlichen unbeeinflusst ist und diesbezüglich ein anderer Mediator (z.B. CSF-1) bedeutsam ist.

Bei der Auswertung der Synapsen, die räumlich mit Makrophagen assoziiert sind, zeigten die Cx32def Mutanten mit gleichzeitig heterozygoter MCP-1 Defizienz eine signifikante Reduktion, während die Anzahl an Synapsen in

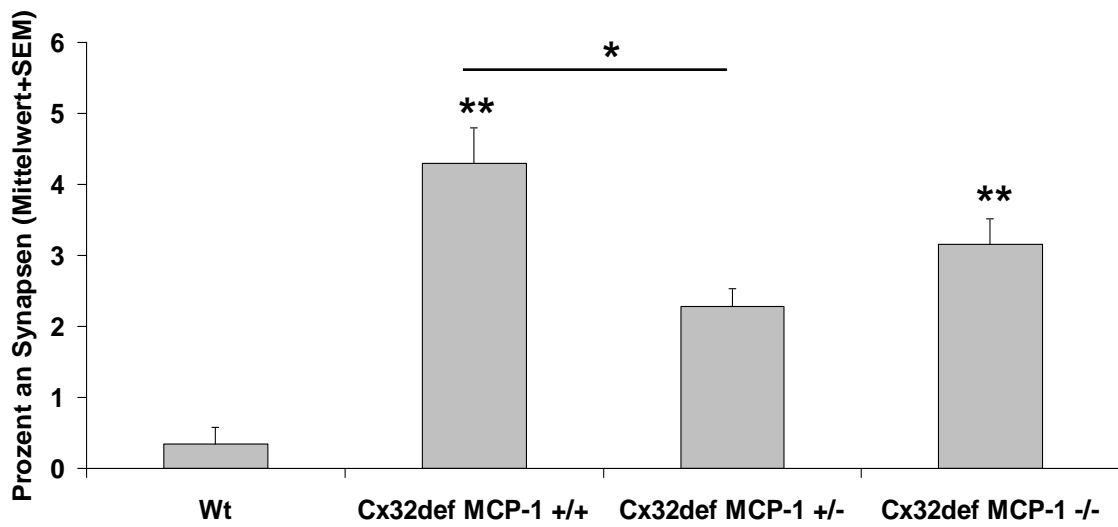
Assoziation mit Makrophagen bei homozygot MCP-1 defizienten Doppelmutanten deutlich zunahm (Abb. 17D). Synapsen, die in räumlicher Assoziation mit Makrophagen waren, zeigten sich erneut alle vollständig innerviert.

Die Quantifizierung an denervierten/partiell denervierten neuromuskulären Synapsen zeigte für heterozygot MCP-1 defiziente Doppelmutanten eine deutliche Reduktion im Vergleich zu Cx32def Mutanten, während die Anzahl an denervierten/partiell denervierten NMJs bei homozygot MCP-1 defizienten Doppelmutanten signifikant zunahm (Abb. 17E). Zusammenfassend lässt sich also zeigen, dass eine Reduktion der MCP-1 Expression eine Verminderung der räumlichen Assoziation von Makrophagen mit neuromuskulären Endplatten bewirkt sowie eine Abnahme an Denervation von Endplatten.

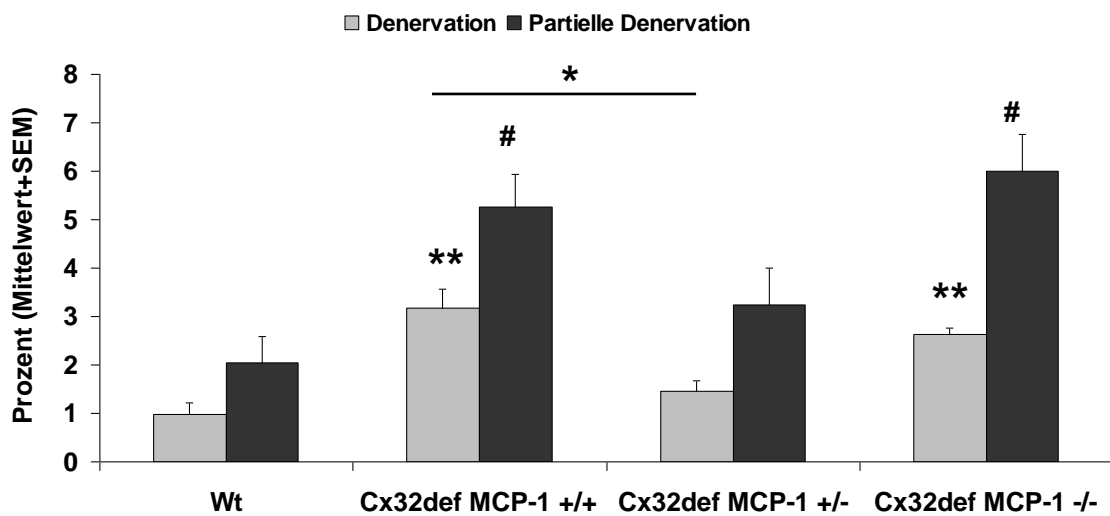




**D** Prozent an Synapsen in räumlicher Assoziation mit F4/80+ Makrophagen; 12 Monate



**E** Denervation/partielle Denervation neuromuskulärer Synapsen; 12 Monate



**Abb.17: Reduktion der MCP-1 Expression bewirkt eine Abnahme der Denervation sowie Makrophagen-Endplatten-Assoziation in 12 Monate alten Cx32def Mutanten**

(A) Die Quantifizierung der Anzahl an F4/80+ Makrophagen im Muskelquerschnitt ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen Wildtypen und Doppelmutanten Mäusen. (B) und (C) zeigen repräsentative Darstellungen immunhistochemischer Färbungen von Querschnitten des M. flexor digitorum brevis 12 Monate alter Cx32def MCP-1def Doppelmutanten. In beiden Abbildungen zeigt sich eine F4/80+ Makrophage (schwarzer Pfeil) in räumlicher Assoziation mit einer neuromuskulären Endplatte (Synaptophysin (rot)+ und  $\alpha$ -Bungarotoxin (grün)+). Zellkerne sind mittels DAPI als blaue Profile zu erkennen. Zu Makrophagen gehörige Zellkerne sind mit weißen Pfeilen bzw. schwarz in Überlagerung markiert. Maßstab=10 $\mu$ m (D) Die Quantifizierung von neuromuskulären Synapsen, die räumlich mit F4/80+ Makrophagen assoziiert sind ergab einen signifikanten Anstieg bei Cx32def MCP1wt Mutanten im Vergleich zum Wildtyp. Cx32def Mutanten mit heterozygoter Defizienz für MCP-1 hingegen zeigten eine signifikante Reduktion an Endplatten-Makrophagen-Assoziation im Vergleich zu Cx32def MCP-1wt Mutanten. Cx32def Mutanten mit homozygoter MCP-1 Defizienz zeigen im Vergleich zum Wildtyp signifikant mehr Synapsen in Assoziation mit Makrophagen. Außerdem präsentieren diese Doppelmutanten auch einen deutlichen Anstieg in Vergleich zu Cx32def Tieren mit heterozygoter MCP-1 Defizienz.  $p < 0,05 = *$ ,  $p < 0,01 = **$  (E) Quantifizierung von denervierten/partiell denervierten NMJs in 12 Monate alten Cx32MCP-1 Doppelmutanten. Cx32def MCP-1wt und Cx32def MCP-1def Mutanten zeigen eine signifikante Zunahme an Denervation/partieller Denervation verglichen mit dem Wildtyp, während sich bei Cx32def Mutanten mit heterozygoter MCP-1 Defizienz eine deutlich verminderte Anzahl an denervierten Endplatten fand im Vergleich zu Cx32def MCP-1 wt Mutanten.  $p < 0,05 = */\#$ ,  $p < 0,01 = **$

**3.8. Defizienz des neurotrophen Faktors CNTF bewirkt eine Zunahme der Makrophagen-Endplatten-Assoziation und eine Zunahme an Denervation**

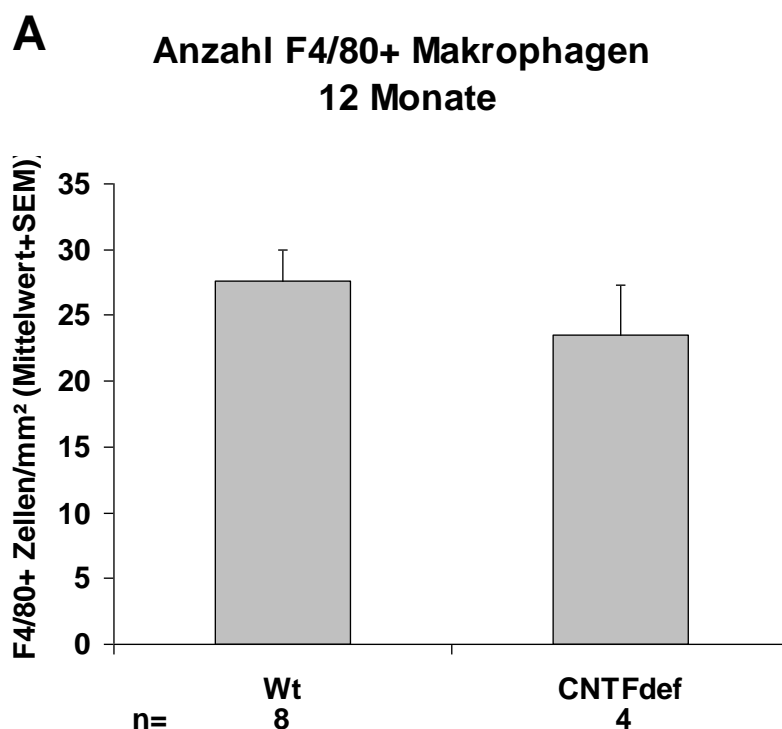
Ciliary neurotrophic factor (CNTF) ist ein neurotropher Faktor der insbesondere von Schwann Zellen in unmittelbarer Nähe zur neuromuskulären Synapse exprimiert wird (Sendtner et al., 1992; Simon et al., 2010). CNTF spielt eine Rolle beim Schutz vor axonaler Schädigung, der Induktion von Sprouting, auch intramuskulärem Sprouting, insbesondere bei denervierten NMJs und Aufrechterhaltung der Innervation von Endplatten (Sendtner et al., 1992). Daher entwickelte sich im Rahmen dieser Arbeit auch die Frage ob es bei einer CNTF-Defizienz zu einer Zunahme der Denervation von neuromuskulären Endplatten kommt und ob in einem solchen Fall eine Zunahme der Makrophagen-Endplatten-Assoziation auftritt.

Im nächsten Schritt dieser Arbeit wurden schließlich 12 Monate alte CNTFdef Mäuse hinsichtlich Makrophagenanzahl im Muskel, an der NMJ und Denervation wie bereits vorher beschrieben untersucht. Als Kontrolle dienten 12 Monate alte Wildtypen.

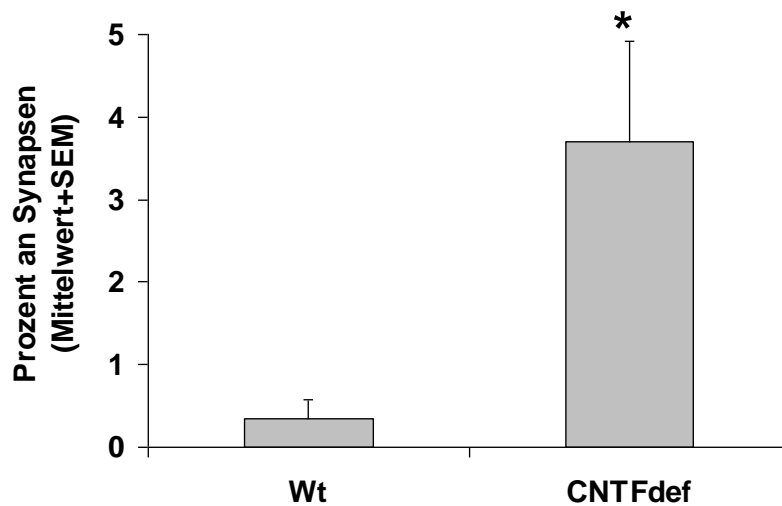
Die Auswertung der Anzahl an Makrophagen im Querschnitt des Muskels ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtypen und CNTFdef Mutanten im Alter von 12 Monaten (Abb. 18A).

Bei der Untersuchung der neuromuskulären Synapsen zeigte sich eine signifikante Zunahme an Synapsen in räumlicher Assoziation mit Makrophagen bei CNTFdef Mutanten im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 18B). Alle mit Makrophagen assoziierten Endplatten waren innerviert. Darüber hinaus fand sich bei CNTFdef Mutanten eine leicht erhöhte Anzahl an denervierten Endplatten verglichen mit gleichaltrigen Wildtypen (Abb. 18C).

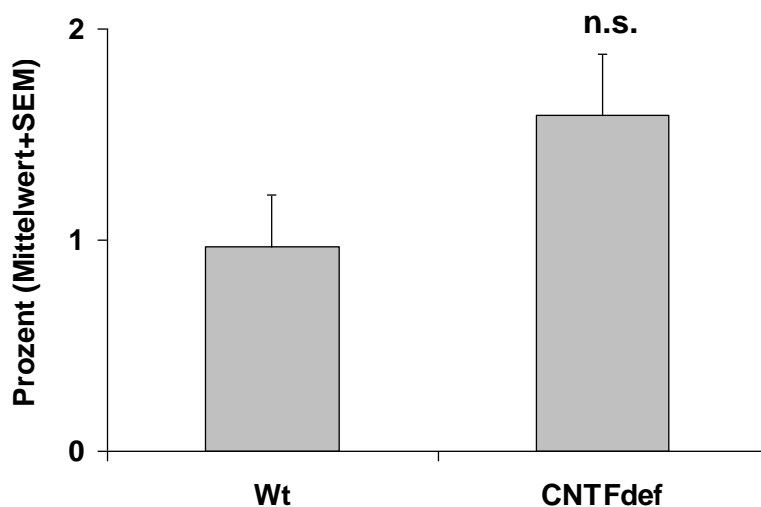
Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass die Defizienz des neurotrophen Faktors CNTF dazu führt, dass Makrophagen verstärkt an neuromuskuläre Synapsen assoziieren und eine Zunahme der Denervation von Endplatten auftritt.



**B** Prozent an Synapsen in räumlicher Assoziation mit F4/80+ Makrophagen; 12 Monate



**C** Denervation neuromuskulärer Synapsen; 12 Monate



**Abb. 18: CNTF-Defizienz bewirkt eine Zunahme an Denervation und Makrophagen-Endplatten-Assoziation**

(A) Quantifizierung der Anzahl an Makrophagen im Querschnitt des M. flexor digitorum brevis von Wildtypen und CNTFdef Mutanten im Alter von 12 Monaten. In den CNTFdef Mutanten zeigen sich keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp. (B) Die Auswertung der Anzahl an Synapsen in räumlicher Assoziation mit Makrophagen zeigt eine signifikante Zunahme bei den CNTFdef Mutanten verglichen mit dem Wildtyp. Die Synapsen in Assoziation mit Makrophagen waren stets innerviert.  $p < 0,05 = *$  (C) Die Quantifizierung der denervierten Synapsen zeigt ebenfalls einen Anstieg an Denervation bei Mutanten mit CNTF Defizienz.

## **4. Diskussion**

### **4.1. Makrophagen als mögliche pathogene Mediatoren an der neuromuskulären Endplatte in Mausmodellen der Charcot-Marie-Tooth Neuropathie**

Makrophagen spielen als zelluläre Elemente des angeborenen Immunsystems eine Rolle als kritische Effektor- und Regulatorzellen von inflammatorischen Prozessen (Geissmann et al., 2010). Sie wirken einerseits regulierend in der Gewebehömostase durch Eliminierung von apoptotischen oder alternden Zellen und Umbau- sowie Reperaturprozessen von Geweben (Italiani and Boraschi, 2014). Andererseits können sie u.a. durch die Freisetzung inflammatorischer Zytokine Entzündungsprozesse in Gang setzen (Gordon, 2002). Makrophagen sind an der Pathogenese verschiedener Erkrankungen beteiligt und in früheren Studien unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass sie eine wesentliche Rolle bei der Demyelinisierung und bei der Generierung eines neuronalen Schadens bei CMT Neuropathien spielen (Martini et al., 2013; Martini and Willison, 2016). Über Mechanismen, die bei CMT zur Denervation von neuromuskulären Endplatten führen, konnten bisher keine Erkenntnisse gewonnen werden. Dies zu untersuchen war das primäre Ziel dieser Arbeit.

In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass Makrophagen in Mausmodellen der Charcot-Marie-Tooth Neuropathie gezielt an innervierte neuromuskuläre Endplatten assoziieren und dabei offenbar ein Zusammenhang besteht zwischen Assoziation von Makrophagen und Denervation von Endplatten. Die genetische Blockade der Makrophagenaktivierung führt dabei zu einer deutlichen Reduktion von Makrophagen in Assoziation zur NMJ und auch zu einer wesentlichen Verminderung der Denervation. Es gilt jedoch zu bedenken, dass die molekularen Hintergründe der verbesserten Innervation von Endplatten weiterhin unklar sind. Im Prinzip könnte eine Reduktion der Denervation bei Doppelmutanten auch einzig auf eine Abnahme bzw.

Beeinträchtigung von Makrophagen am peripheren Nerven durch genetische Blockade zurückzuführen sein.

#### **4.1.1. Die neuromuskuläre Endplatte ist ein selektives Ziel für die räumliche Assoziation von Makrophagen in CMT**

Es konnte in allen untersuchten Mausmodellen für CMT im Vergleich zum Wildtyp eine signifikant erhöhte Anzahl an neuromuskulären Synapsen gefunden werden, die eine räumliche Assoziation mit Makrophagen aufweisen. Dabei waren entsprechende Synapsen zu nahezu 100% innerviert. Dies spricht dagegen, dass Makrophagen an dieser Stelle die Rolle als Phagozyten von gealterten oder apoptotischen Zellen ausüben. Prinzipiell wäre auch vorstellbar, dass eventuell ablaufende Zerstörungsprozesse sehr rasch ablaufen und Makrophagen im Sinne eines „Kiss and Run“-Prinzips schnell wieder von den Endplatten dissoziieren.

Daneben fiel auf, dass sich im Verlauf von 6 zu 12 Monaten die Anzahl an Makrophagen im Gesamtmuskel verdoppelt und zwar sowohl im Wildtyp wie auch bei den untersuchten CMT-Mutanten. Dabei zeigte die Makrophagen-Endplatten-Assoziation im Verlauf von 6 zu 12 Monaten ausschließlich bei CMT Mutanten einen Anstieg, während man im Wildtyp keine Veränderung fand. Dies deutet einerseits darauf hin, dass die Assoziation von Makrophagen an innervierte NMJs per se ein pathologisches Merkmal zu sein scheint. Andererseits spricht die Tatsache, dass sich die Anzahl an Makrophagen im Gesamtmuskel-Querschnitt im Wildtyp und Myelin Mutanten nahezu nicht unterscheidet dafür, dass Makrophagen nicht im Rahmen pathologischer Prozesse der CMT1 in den Muskel einwandern, sondern gezielt und selektiv an die neuromuskuläre Endplatte assoziieren.

Neben der Feststellung, dass die Anzahl an Makrophagen im Gesamtmuskel von Wildtypen und Mutanten im Verlauf von 6 zu 12 Monaten deutlich zunahm,



fiel auch bei der Untersuchung von P0 Mutanten im Verlauf von 6, 12 und 24 Monaten ein Anstieg an Makrophagen im Gesamtmuskel auf. Hier war ein Sprung zwischen 6 und 12 Monaten festzustellen bei nahezu gleichbleibender Anzahl bei 24 Monate alten Tieren im Vergleich zu 12 Monaten. Die Anzahl denervierter NMJs nahm vor allem zwischen 6 und 24 Monaten signifikant zu. Analog dazu konnte man bei P0 Mutanten und Wildtypen im Verlauf zwischen 6 und 24 Monaten eine kontinuierliche und signifikante Zunahme an Synapsen in Assoziation mit Makrophagen finden. Diese Ergebnisse sprechen für eine physiologische am ehesten altersbedingte Zunahme an Makrophagen im Muskel mit dem Ziel alternde Zellen abzubauen und das Gewebe umzustrukturieren. Eine solche Zunahme insbesondere an anti-inflammatorischen Makrophagen im alternden Muskel wurde auch bereits von anderen Arbeitsgruppen beschrieben (Wang et al., 2015). Weiterhin wird Makrophagen insbesondere vom M2-Typ eine protektive bzw. regenerative Funktion zugeschrieben z.B. nach Rückenmarksverletzungen (Gensel and Zhang, 2015; Francos-Quijorna et al., 2016) und auch nach Myokardinfarkt (Meyer et al., 2017). Der analoge Anstieg an denervierten Endplatten und NMJs in Assoziation mit Makrophagen bei P0 Mutanten im Verlauf von 6 zu 24 Monaten hingegen stützt wiederum die Hypothese der selektiven räumlichen Assoziation von Makrophagen mit Endplatten in CMT Mutanten. Auch die Beobachtungen im Wildtyp stützen die Thesen der selektiven Assoziation von Makrophagen an die Endplatte und einen Zusammenhang dieser mit auftretender Denervation. Im Wildtyp ist der bereits erwähnte Anstieg an Makrophagen im Gesamtmuskel zwischen 6 und 12 Monaten aufgefallen, der am ehesten als altersbedingt gewertet wird. Parallel dazu findet man im Wildtyp zwischen 6 und 12 Monaten weder eine Zunahme an Synapsen, die mit Makrophagen assoziiert sind, noch eine Zunahme an denervierten Synapsen.

Auch durch die elektronenmikroskopischen Untersuchungen, die im Rahmen dieser Arbeit erfolgten, konnte anschaulich gezeigt werden, wie Makrophagen über direkte Zell-Zellkontakte mit der Präsynapse an die NMJ assoziieren.

Die neuromuskuläre Endplatte hat sich auch bei anderen neurologischen Erkrankungen wie der spinalen Muskelatrophie (Simon et al., 2010) oder der amyotrophen Lateralsklerose (Frey et al., 2000) als frühes und selektives Ziel pathologischer Prozesse erwiesen. Es sind jedoch bisher nur vereinzelt Studien bekannt, bei denen Makrophagen-assoziierte pathogenetische Prozesse der neuromuskulären Synapse beschrieben wurden (Van Dyke et al., 2016). In dieser Studie wurde an einem Rattenmodell für ALS eine zunehmende räumliche Assoziation von inflammatorischen Makrophagen mit Endplatten im Krankheitsverlauf beschrieben. Daneben fiel eine zunehmende Störung der Integrität der NMJ mit Dissoziation der terminalen Schwann Zellen im Verlauf auf.

Neben den beschriebenen Beobachtungen sind im Rahmen der elektronenmikroskopischen Untersuchungen dieser Arbeit morphologische Veränderungen der Mitochondrien präsynaptischer Nervenendigungen aufgefallen. Diese Auffälligkeiten im Sinne von deformierten und vergrößerten Mitochondrien haben sich ausschließlich in den Nervenendigungen der untersuchten Myelin Mutanten gezeigt und nicht im Wildtyp. Auch in den Muskelfasern der Mutanten konnte man derartige Mitochondrien nicht finden. Dies spricht dafür, dass dieses Merkmal spezifisch für die Präsynapse dieser Myelin Mutanten ist. Ähnliche mitochondriale Konfigurationen in Präsynapsen von Motoneuronen wurden auch im Rahmen von neurodegenerativen Prozessen (Garcia et al., 2013) und anderen CMT-Formen, wie CMT2 und 4 (Barneo-Munoz et al., 2015) beschrieben. In der Studie von Garcia et al. konnten zudem Calcium-Akkumulationen in den beschriebenen "Megamitochondrien" sowie die Co-Lokalisation von Dynein und gespaltener Caspase 3 in neuromuskulären Endplatten detektiert werden. Dies ist vereinbar mit frühen Stadien der Degeneration von NMJs, die im Weiteren zur Degeneration des Motorneurons führt (Garcia et al., 2013).

Die CMT-Formen, die bekanntermaßen mit einer Beeinträchtigung der Mitochondrien einhergehen, sind solche, bei denen die zugrundeliegende

Genmutation zu gestörter Fusion, Spaltung und axonalem Transport von Mitochondrien führt (CMT2A, CMT2K, CMT4A) (Pareyson et al., 2015). Bei den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Mausmodellen für CMT1 sind die verantwortlichen Genmutationen nicht primär mit mitochondrialer Dysfunktion bzw. Affektion assoziiert. Daher bleibt offen, welche Ursache in diesen Mutanten die morphologischen Veränderungen der Mitochondrien herbeiführt. Offen bleibt auch die Frage, ob diese mitochondrialen Zeichen der Degeneration zur Assoziation von Makrophagen führen, oder ob umgekehrt die Assoziation von Makrophagen zur Degeneration des Axons und der Präsynapse und den entsprechenden Mitochondrien führt. Mitochondrien kontrollieren u.a. das Gleichgewicht an Calcium, ATP und reaktiver Sauerstoffspezies (ROS, iNOS) im Zytoplasma. Störungen dieses Gleichgewichts, die auch im Rahmen neuroinflammatorischer Prozesse beobachtet werden, können zu mitochondrialer Dysfunktion und damit zur Schädigung von Axonen führen (Court and Coleman, 2012). Bei Untersuchungen am Kleinhirn von Mäusen konnte gezeigt werden, dass durch Induktion von Entzündung der mitochondriale Transport im Axon bereits in frühen Stadien eingeschränkt ist und damit über reduzierte neuronale Energieversorgung zu axonalem Schaden führt (Errea et al., 2015). Eine andere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass mitochondriale Schädigung durch oxidativen Stress in motorischen Axonen ihren Ursprung an Ranvier'schen Schnürringen nimmt, sich von dort aus bidirektional ausbreitet und zu progredienter Beeinträchtigung der Axon-Funktion führt (Bros et al., 2014). Da die neuromuskuläre Endplatte eine ähnlich sensible Struktur im neuromuskulären System darstellt wie der Ranvier'sche Schnürring, wäre prinzipiell eine Induktion mitochondrialer Schädigung in der Präsynapse über oxidativen Stress durch inflammatorische Makrophagen, die mit NMJs assoziiert sind, denkbar.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in Mausmodellen für CMT1 präsynaptische Nervenendigungen morphologische Auffälligkeiten im Sinne

einer frühen NMJ Degeneration aufweisen und gleichzeitig Makrophagen selektiv an die innervierte NMJ räumlich assoziieren.

#### **4.1.2. Die Assoziation von Makrophagen mit motorischen Endplatten korreliert mit auftretender Denervation**

Die Ergebnisse dieser Arbeit demonstrieren nicht nur, dass Makrophagen selektiv an innervierte neuromuskuläre Endplatten assoziieren, sondern es konnte auch gezeigt werden, dass in allen untersuchten Myelin Mutanten im Vergleich zum Wildtyp eine deutliche Zunahme an denervierten neuromuskulären Synapsen vorliegt.

Es existieren im Prinzip zwei präsynaptische Strukturen, die zuverlässig mittels immunhistochemischer Methoden visualisiert werden können - Neurofilament und Synaptophysin. Neurofilament ist ein wesentlicher Bestandteil des neuronalen Zytoskeletts und ist somit an der Struktur und dem Durchmesser des Axons beteiligt. Außerdem spielt es eine Rolle beim axonalen Transport (Alberts et al., 2002). Neurofilament ist vor allem im Bereich des Axons lokalisiert und auch wenn zytoskelettale Bestandteile bis ins distale Axon reichen kann eine Lokalisation in der präsynaptischen Endigung nicht sicher garantiert werden. Daher ist Neurofilament als zuverlässiger Marker für Denervation bzw. partielle Denervation nicht geeignet. Synaptophysin ist ein Protein, das in synaptischen Vesikeln der Präsynapse lokalisiert ist. Aufgrund seines ubiquitären Vorkommens in Synapsen, dient es als wesentlicher und zuverlässiger immunhistochemischer Marker der Präsynapse (Calhoun et al., 1996). Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Studie Synaptophysin als Marker für die Präsynapse verwendet. Die Darstellung der Präsynapse ist bei Verwendung von Synaptophysin entsprechend jedoch an das Vorhandensein von synaptischen Vesikeln gebunden. Im Prinzip wäre also denkbar, dass eine morphologische Denervation von Endplatten durch ein Nicht-Vorhandensein von Synaptophysin bzw. synaptischen Vesikeln vorgetäuscht wird. In der

Literatur sind Fälle von Verlust von synaptischen Vesikeln bzw. deren Proteinen beschrieben z.B. bei alternden MRF4-defizienten Mäusen mit Defizienz eines Proteins, das für normale Muskelentwicklung zuständig ist (Wang et al., 2011). Der Verlust von Synaptophysin ist zudem beschrieben bei neurodegenerativen Erkrankungen wie primär progressiver Aphasie (Lippa and Rosso, 2012) und Morbus Alzheimer (Reddy et al., 2005). Unabhängig jedoch davon ob die Präsynapse aufgrund eines Untergangs von synaptischen Vesikeln oder eines Rückzugs der präsynaptischen Nervenendigung nicht mehr nachweisbar ist, handelt es sich dabei um eine morphologisch sichtbare Dysfunktion der Synapse.

Die Denervation von neuromuskulären Endplatten, i.e. die Destruktion, Fragmentierung oder der Rückzug der Präsynapse von der Postsynapse, ist ein Prozess, der in vielen neuromuskulären bzw. neurodegenerativen Erkrankungen als Zeichen der Pathologie beobachtet werden kann und beschrieben wurde. Eine Arbeitsgruppe beschreibt die Dysfunktion neuromuskulärer Synapsen als bislang unterschätztes pathologisches Merkmal in zwei verschiedenen Mausmodellen für CMT2D (Spaulding et al., 2016). Hier zeigten durchgeführte Voltage-Clamp Untersuchungen präsynaptische Defekte, neben morphologischen Auffälligkeiten wie reduzierte synaptische Vesikel und eine erhöhte Anzahl an denervierten und partiell denervierten Endplatten. Durch eine andere Arbeitsgruppe sind Defekte der neuromuskulären Endplatte, die u.a. Denervation umfassen, als Schlüsselereignis für den Krankheitsprogress der spinalen Muskelatrophie beschrieben (Boido and Vercelli, 2016). Als Ursache für die gestörte Funktion und Denervation von Endplatten wird hier eine durch die Genmutation bedingte Beeinträchtigung des axonalen Transports vermutet. Diese bewirkt über eine abnorme Akkumulation von Molekülen in der Präsynapse eine Störung der Reifung, der korrekten Innervation und schließlich eine Denervation von NMJs. Im Sinne einer "dying-back-Theorie" bedeutet das, dass die primäre Pathologie im distalen Axon, also im Bereich der NMJ beginnt und sich sekundär mit einer Schädigung des Axons und Neurons manifestiert. Bei der amyotrophen Lateralsklerose, die neben

einem ausgeprägten Verlust von Motoneuronen auch durch Denervation von NMJs geprägt ist, scheint die dying-back Axonopathie durch reaktive Sauerstoff-Spezies in präsynaptischen Nervenendigungen ausgelöst oder verstärkt zu werden (Pollari et al., 2014). Auch hier werden, analog zu den Ergebnissen dieser Arbeit, morphologisch veränderte Mitochondrien in der Präsynapse beschrieben sowie eine nachfolgende Neurodegeneration induziert durch inflammatorische Prozesse. Eine weitere Möglichkeit, die zum Verlust neuromuskulärer Endplatten führen kann, ist die Degeneration distal eines axonalen Schädigungsereignisses im Sinne einer Waller'schen Degeneration. Im Rahmen der Waller'schen Degeneration ist mehrfach beschrieben worden, dass Makrophagen durch die Phagozytose von degeneriertem Myelin distal der Axonschädigung einen Beitrag zur Regeneration des Neurons tragen (Rotshenker, 2011; Klein and Martini, 2016). Ähnliche Konstellationen wären im Prinzip für die Ergebnisse dieser Arbeit denkbar.

In dieser Arbeit fand sich bei der Untersuchung 12 Monate alter Myelin Mutanten eine signifikante Zunahme an denervierten sowie partiell denervierten Endplatten im Vergleich zum Wildtyp. In der Gruppe der 6 Monate alten Tiere zeigten sich interessanterweise höhere Standardabweichungen zwischen Myelin Mutanten. 6 Monate alte P0 Mutanten präsentierten den stärksten Anstieg an denervierten und partiell denervierten Endplatten, während bei gleichaltrigen Cx32def Mutanten die Zahl denervierter Endplatten im Vergleich zum Wildtyp reduziert war bei erhöhter partieller Denervation. Diese Erkenntnisse decken sich damit, dass Cx32def Mäuse im Vergleich zu humaner CMT1X weniger Axonverluste aufweisen (Martini, 1997). Außerdem exprimieren Cx32def Mutanten im Vergleich zu den übrigen untersuchten Myelin Mutanten vermehrt neurale Wachstumsfaktoren wie GDNF und bilden ausgeprägte Axonkollaterale zur Neuroregeneration aus (Klein et al., 2014).

Eine wichtige und gleichermaßen überraschende Erkenntnis dieser Arbeit war, dass keine der denervierten und nur ein sehr geringer Anteil der partiell denervierten Endplatten mit Makrophagen assoziiert waren. Die NMJs, die sich

in räumlicher Assoziation mit Makrophagen zeigten, waren in nahezu allen Fällen morphologisch unauffällig innerviert. Des Weiteren hat sich gezeigt, dass die Anzahl an innervierten Synapsen, die mit Makrophagen assoziiert sind, bei allen untersuchten Myelin Mutanten wie auch im Wildtyp in starkem numerischen Zusammenhang steht mit der Anzahl an denervierten Synapsen ohne assoziierte Makrophage. Auch die Untersuchungen zum Krankheitsverlauf in P0 Mutanten mit zunehmendem Alter zeigen gleichermaßen einen Anstieg an Denervation und Makrophagen-Endplatten-Assoziation. Die Makrophagenzahl im Gesamtmuskel wies stets keinerlei Zusammenhang zur Denervation auf. Das legt die Vermutung nahe, dass Makrophagen gezielt an innervierte Endplatten assoziieren, dann über noch unbekannte Mechanismen eine Schädigung an der NMJ hervorrufen und schließlich wieder dissoziieren. Im Anschluss an dieses Ereignis kommt es bei diesen NMJs zur Denervation. Die Tatsache, dass Makrophagen ausschließlich an innervierte Synapsen anbinden und nahezu dieselbe Anzahl an Synapsen denerviert, spricht gegen eine "einfache" Phagozytosefunktion der Makrophagen an der Endplatte. Diese Vermutung ist kongruent zur bisher bekannten Pathogenese der CMT1, bei der Makrophagen üblicherweise intakte Nervenfasern und deren Myelin "attackieren" (Klein and Martini, 2016). Eine zukünftige Möglichkeit die Funktion der Makrophagen an der NMJ genauer zu untersuchen, wäre die Differenzierung in pro- und antiinflammatorische Makrophagen mittels Verwendung spezifischer immunhistochemischer Färbemethoden.

Der kausale Zusammenhang zwischen räumlicher Assoziation von Makrophagen und Denervation von Endplatten wurde auch bei der Untersuchung doppel-mutanter Mäuse deutlich. Bei diesen Myelin Mutanten führte die genetische Blockade der Makrophagen-Aktivierung zu einer deutlichen Reduktion an Makrophagen-Endplatten-Assoziation und korrelierend zu einer signifikanten Abnahme an Denervation. Wie bereits weiter oben erwähnt, ist auch vorstellbar, dass dieser Rückgang an Denervation bei den genannten Doppelmутanten auch auf eine verbesserte Nervenfunktion durch Abnahme von Makrophagen am peripheren Nerv zurückzuführen ist.

Zusammenfassend kann man also sagen, dass alle Ergebnisse, die in dieser Arbeit bisher diskutiert wurden, dafürsprechen, dass Makrophagen als pathogene Mediatoren an der neuromuskulären Endplatte in Mausmodellen für CMT1 wirken. Vorstellbar ist, dass Makrophagen durch eine vermehrte Freisetzung von MCP-1 und CSF-1 in CMT1 an die NMJ assoziieren und möglicherweise über inflammatorische Prozesse eine Schädigung der mitochondrialen Funktion in der Präsynapse hervorrufen. Anschließend dissoziieren die Makrophagen von der neuromuskulären Synapse. Die beeinträchtigte Funktion präsynaptischer Mitochondrien und möglicherweise weitere, noch unbekannte Mechanismen führen letztlich zur Schädigung und Denervation der NMJ.

#### **4.2. CSF-1 und MCP-1 sind wichtige Mediatoren für Makrophagen-assoziierte Denervation von neuromuskulären Endplatten in Mausmodellen für CMT**

Nachdem gezeigt werden konnte, dass Makrophagen in Mausmodellen für die CMT1 Neuropathien sehr wahrscheinlich gezielt die neuromuskuläre Endplatte kontaktieren und gleichzeitig ein starker Zusammenhang mit der Denervation von Endplatten bestehen mag, stellte sich als nächstes die Frage, durch welche Stimuli Makrophagen dazu geleitet werden, scheinbar selektiv an die neuromuskuläre Synapse zu assoziieren.

In unserer Arbeitsgruppe konnten MCP-1 (Fischer et al., 2008b; Fischer et al., 2008a; Kohl et al., 2010) und CSF-1 (Carenini et al., 2001; Groh et al., 2012) als wichtige Mediatoren für Makrophagen-assoziierte Demyelinisierung und axonale Schädigung in Mausmodellen für CMT1 identifiziert werden. MCP-1 (auch CCL2) ist ein Chemokin, das von mutierten Schwann-Zellen über die MEK-ERK Signalkaskade exprimiert wird (Groh et al., 2010). CSF-1 ist ein weiterer bedeutsamer Makrophagen-Aktivator, der von Fibroblasten produziert



wird, die in Mausmodellen für CMT1 extensive Zell-Zell-Kontakte mit Makrophagen ausbilden (Groh et al., 2012). In Bezug auf die pathogene Rolle, die Makrophagen am peripheren Nerv bei CMT1 stimuliert durch CSF-1 und MCP-1 ausüben, bilden sie eine zelluläre Vierfach-Beziehung aus. Diese besteht aus den Makrophagen selbst, dem Axon, den MCP-1 exprimierenden Schwann-Zellen und den CSF-1 exprimierenden endoneuralen Fibroblasten (Martini and Willison, 2016). Vergleicht man damit die zelluläre Konstellation an der neuromuskulären Synapse, ergibt sich möglicherweise ein ähnliches Beziehungsgeflecht bestehend aus dem distalen Axon, das die Präsynapse formt, den perisynaptischen Fibroblasten, den terminalen Schwann Zellen und den in dieser Arbeit identifizierten Makrophagen.

Die Untersuchung von doppel-mutanten Mäusen mit genetischer Blockade der CSF-1 bzw. MCP-1 Expression im Rahmen dieser Arbeit ergab eine signifikante Reduktion der Makrophagen-Endplatten-Assoziation und eine Abnahme an Denervation. Bei Cx32het op doppel-mutanten Tieren, die kein CSF-1 exprimieren, war im Vergleich zu Cx32het Tieren mit normaler CSF-1 Expression eine deutliche Abnahme an Makrophagen im Gesamtmuskel feststellbar. Außerdem zeigten diese Tiere signifikant weniger Synapsen in Assoziation mit Makrophagen. Auch bei dieser Untersuchung war die Anzahl an denervierten Synapsen ohne Makrophagen-Assoziation nahezu identisch zur Anzahl an innervierten Synapsen mit assoziierten Makrophagen. Die Untersuchung von Cx32def MCP-1 Doppelmutanten ergab interessanterweise keinen Unterschied in der Anzahl an Makrophagen im Gesamtmuskel im Vergleich zu Cx32def Mutanten. Dies kann gegebenenfalls damit erklärt werden, dass CSF-1 im Unterschied zu MCP-1 auch von Gewebefibroblasten im Muskel exprimiert wird und dadurch möglicherweise im Muskel in höherer Konzentration vorliegt als MCP-1. Der Unterschied ist möglicherweise auch darauf zurückzuführen, dass CSF-1, wie von unserer Arbeitsgruppe beschrieben als Haupt- "Aktivator" von Makrophagen gilt, während MCP-1 die Funktion des "fine tunings" übernimmt indem es Makrophagen zu den Zielstrukturen (Schwann Zellen) leitet (Martini and Willison, 2016). Des

Weiteren zeigten Cx32def MCP-1 Doppelmutanten mit MCP-1 Heterozygotie analog zu den osteopetrotischen Doppelmutanten eine deutliche Abnahme der Makrophagen-Endplatten-Assoziation und korrelierend eine Abnahme an denervierten NMJs. Bei den Cx32def MCP-1 Mutanten mit homozygoter MCP-1 Defizienz zeigte sich eine Zunahme an Makrophagen-Assoziation und Denervation, was analog zu den Untersuchungen an den peripheren Nerven dieser Mutanten ist (Groh et al., 2010). Als Ursache dafür wird eine kompensatorisch gesteigerte Proliferation residenter Makrophagen durch CSF-1 bei kompletter MCP-1 Defizienz angenommen (Groh et al., 2010).

Auffällig war schließlich auch, dass CSF-1 Defizienz einen stärkeren Effekt auf die Reduktion von Makrophagen-Assoziation und Denervation hatte als MCP1-Defizienz. Bei Cx32het op Mutanten waren Makrophagen-Assoziation und Denervation von 3% bei Cx32het Tieren auf 0,25% bei Cx32het op Tieren gefallen. MCP-1 Doppelmutanten zeigten hingegen nur einen Rückgang von ca. 4% bei Cx32def MCP-1wt auf ca. 2% bei Cx32def MCP-1het Mutanten.

Zusammenfassend kann man also sagen, dass, basierend auf diesen Ergebnissen, sowohl CSF-1 als auch MCP-1 ein starker Mediator für Makrophagen-assoziierte Denervation neuromuskulärer Synapsen in Mausmodellen für CMT1 ist, wobei CSF-1 einen stärkeren Effekt hat als MCP-1. Auch dies ist konform zur oben beschriebenen "Aktivator vs. fine-tuning-Hypothese" (Martini and Willison, 2016).

#### **4.3. Die neuromuskuläre Endplatte als unterschätztes Ziel Makrophagen-assoziiierter Pathogenese in neurodegenerativen Prozessen und neurologischen Erkrankungen**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden unter anderem Mäuse mit einer CNTF-Defizienz untersucht. CNTF ist ein neurotropher Faktor, der insbesondere auch von terminalen Schwann Zellen in der Nähe der neuromuskulären Endplatte

exprimiert wird und u.a. eine Rolle beim Sprouting zur Kompensation neuromuskulärer Schädigungsmechanismen spielt (Siegel et al., 2000). CNTF defiziente Tiere im Alter von 12 Monaten zeigten im Vergleich zum Wildtyp signifikant mehr Synapsen in räumlicher Assoziation mit Makrophagen und ebenso eine Zunahme an denervierten Endplatten. Die Anzahl an Makrophagen im Gesamtmuskel war nahezu identisch zum Wildtyp.

Eine Arbeitsgruppe konnte bereits zeigen, dass sowohl CNTF wie auch der CNTF Rezeptor im Bereich der Prä- und Postsynapse von neuromuskulären Endplatten exprimiert werden (Garcia et al., 2012). CNTF zeigte hierbei eine präventive Wirkung auf die NMJ vor Aktivitäts-induzierter Einschränkung der synaptischen Funktion. Hinsichtlich seiner Wirkung auf Neuroinflammation konnte gezeigt werden, dass die Defizienz von CNTF sowohl bei experimenteller Autoimmunenzephalomyelitis (EAE) (Linker et al., 2002) wie auch bei multipler Sklerose (Giess et al., 2002) zu einer klinischen und histopathologischen Exazerbation der Erkrankung führt. Des Weiteren ist bekannt, dass Mikroglia Zellen, induziert durch das pro-inflammatorische Zytokin IFN $\gamma$ , CNTF Rezeptoren exprimieren (Lin et al., 2009). Modifiziert durch CNTF können Mikroglia Zellen eine neuroprotektive Wirkung entfalten indem ihre Expression von Entzündungsmediatoren wie COX-2 reduziert wird und indem sie über eine moderate ERK/STAT3 Aktivierung (Sheu et al., 2000) ein extrazelluläres Milieu zur Neuroregeneration begünstigen (Krady et al., 2008). In Zusammenschau der vorliegenden Ergebnisse dieser Arbeit und der Literatur wäre denkbar, dass Makrophagen durch die Präsenz von CNTF zu einer neuroprotektiven Wirkung im Bereich des PNS und insbesondere der NMJ geleitet werden, vorausgesetzt Makrophagen exprimieren CNTF-Rezeptoren. Beim Fehlen von CNTF fällt diese protektive Wirkung weg und es resultiert eine Proliferation von Makrophagen mit Zunahme von degenerativen Prozessen. Diese Wirkung könnte sich beim gleichzeitigen Vorliegen von neurologischen Erkrankungen verstärken. Prinzipiell können jedoch auch subtile neurale Prozesse eine Makrophagenaktivierung hervorrufen. Im Rahmen zukünftiger Projekte wäre daher interessant zu untersuchen ob Makrophagen von Myelin

Mutanten CNTF-Rezeptoren exprimieren und welche pathogenetischen Auffälligkeiten Myelin Mutanten mit gleichzeitiger CNTF Defizienz zeigen. Sollte sich hierbei die o.g. Hypothese bestätigen, wäre die Behandlung von CMT1 Patienten mittels CNTF eine denkbare Therapieoption.

Die Arbeitsgruppe von Prof. Sendtner zeigte, dass in einem Mausmodell für milde Spinale Muskelatrophie, das für die Erkrankung typische axonale Sprouting zur Kompensation des Motoneuron-Verlusts, bei gleichzeitiger CNTF-Defizienz deutlich reduziert ist (Simon et al., 2010). Darüber hinaus konnte von verschiedenen Arbeitsgruppen demonstriert werden, dass die medikamentöse Applikation von CNTF in G93A SOD1 (Pun et al., 2006) und pmn (Sagot et al., 1998) Mausmodellen für Motoneuronopathie zu einer verbesserten Aufrechterhaltung von motorischen Axonen und neuromuskulären Endplatten führt. Ob inflammatorische Prozesse und eine mögliche Hemmung dieser hierbei eine Rolle spielen, wurde bislang nicht untersucht.

In einem Rattenmodell für familiäre ALS (SOD1<sup>G93A</sup> - Ratte) konnte gezeigt werden, dass im Bereich neuromuskulärer Endplatten Makrophagen-assoziierte Inflammationsprozesse und abnorme gliale Reaktionen auftreten (Van Dyke et al., 2016). Diese Tiere zeigten in fortgeschrittenen Stadien der Erkrankung nahezu 80% an denervierten Endplatten. Neben einer Zunahme an inflammatorischen Zytokinen und auch Makrophagen sowohl im Muskel wie auch an NMJs in SOD-Ratten, konnte diese Arbeitsgruppe auch zeigen, dass es im Rahmen des Krankheitsprogresses zu einer Dissoziation von terminalen Schwann Zellen von der neuromuskulären Endplatte kommt. Da terminale Schwann Zellen eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der neuromuskulären Endplatte spielen (Feng and Ko, 2008), könnte auch bei den SOD-Ratten eine gestörte Interaktion zwischen terminalen Schwann Zellen und Makrophagen eine Makrophagen-assoziierte Pathologie an der Endplatte vermitteln bzw. verstärken. Dies wäre möglicherweise analog zu den im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnissen zur Untersuchung an MCP-1 Doppelmutanten.

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die neuromuskuläre Endplatte unabhängig von der CMT1 Neuropathie ein selektives Ziel Makrophagen-assoziiertes pathogenetischer Einwirkung ist. Die weitere Erforschung solcher Makrophagen-assoziierten Prozesse an der Endplatte kann somit nicht nur das Wissen um erbliche Neuropathien erweitern, sondern auch mögliche Therapieoptionen für weitere neuromuskuläre Erkrankungen eröffnen.

#### **4.4. Die Bedeutung von Makrophagen-Endplatten-Assoziation und Denervation von Endplatten im Wildtyp**

Im Rahmen dieser Arbeit zeigten sich nicht nur bei Mutanten, sondern auch im Wildtyp die pathologischen Merkmale Denervation und Makrophagen-Endplatten-Assoziation, wenn auch in sehr geringem Ausmaß. Auch in vorherigen Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe fiel beim Wildtyp unterschiedlichen Alters eine gewisse Anzahl an denervierten neuromuskulären Endplatten auf (Groh et al., 2010; Groh et al., 2012). Bei einer Studie an einem weiteren CMT-Mausmodell (Trembler J) konnten bei der Auswertung des Wildtyps als Kontrollgruppe bis zu 20% nicht intakte NMJs gefunden werden (Nicks et al., 2013).

In dieser Arbeit zeigten Wildtypen im Alter von 6 und 12 Monaten im Mittel 1% denervierte und 2% partiell denervierte Endplatten. Im Durchschnitt 0,25% der Synapsen waren mit Makrophagen assoziiert und dabei, analog zu den Ergebnissen in den Mutanten, gleichzeitig innerviert. 24 Monate alte Wildtyp Mäuse zeigten vor allem einen Anstieg an partiell denervierten Endplatten (ca. 4,5%) sowie eine leichte Zunahme an Makrophagen-assoziierten Endplatten. Es scheint auch beim Wildtyp kein Zusammenhang zu bestehen zwischen der Anzahl an denervierten Endplatten und der Anzahl an Makrophagen im gesamten Muskel, da die Anzahl an Makrophagen im Muskel ein unproportionales Verhalten im Vergleich zur Denervation zeigte. Das bedeutet,

dass man bei den Tieren im Verlauf von 6 zu 24 Monaten zwar eine Zunahme an denervierten Endplatten findet, bei jedoch nahezu unveränderter Anzahl an Makrophagen im Muskel. Außerdem war die Anzahl an Makrophagen im Muskel beim Wildtyp nahezu identisch im Vergleich zu den Mutanten, während Denervation und Makrophagen-Endplatten-Assoziation als pathologische Merkmale direkt proportional zunahmen. Eine ähnliche Konstellation findet sich auch beim Wildtyp im Alter von 6 und 12 Monaten, wo Denervation und Makrophagen-Assoziation nahezu gleich ausgeprägt sind und sich bei 24 Monate alten Tieren ein Anstieg an partieller Denervation und Assoziation aber keine Zunahme der Makrophagen im Muskel zeigt. Mit Hilfe der Elektronenmikroskopie konnte auch im Wildtyp gezeigt werden, dass Makrophagen räumlich enge Zell-Kontakte mit der präsynaptischen Nervenendigung ausbilden. Zusammenfassend lässt sich also feststellen, dass auch im Wildtyp im Verlauf des Alters ein proportionaler Anstieg sowohl von denervierten Endplatten wie auch von Endplatten in Assoziation mit Makrophagen auftritt, während sich die Anzahl an Makrophagen im Muskel dazu unabhängig verhält. Diese Ergebnisse deuten insgesamt ebenfalls darauf hin, dass ein direkter Zusammenhang besteht zwischen Makrophagen-Endplatten-Assoziation und Denervation. Bei Mutanten scheinen diese Ereignisse als Ausdruck der Pathologie aufzutreten, während sie im Wildtyp in deutlich abgeschwächter Form womöglich ein Zeichen für neuromuskuläre Umstrukturierungsprozesse und altersbedingter neuromuskulärer Degeneration sind. Altersbedingte Veränderungen der neuromuskulären Endplatte in Form von partieller Denervation (Chung et al., 2016), NMJ Instabilität (Hughes et al., 2016) und Ausbildung von „Megamitochondrien“ in Präsynapsen (Gonzalez-Freire et al., 2014) sind bereits vorbeschrieben.

Neuromuskuläre Endplatten sind nicht zu verstehen als stabile Strukturen, die sich, einmal entstanden, nicht mehr verändern. Vielmehr sind sie plastische Systeme, die geprägt sind durch wiederkehrende Umbau-, Degenerations- und Regenerationsprozesse. Eine Schlüsselrolle bei diesen Prozessen an der NMJ spielen terminale Schwann Zellen. Sie beeinflussen die Entwicklung und

Aufrechterhaltung neuromuskulärer Synapsen ebenso wie Umbauprozesse und Regeneration unter anderem durch Induktion von axonalem Sprouting (Feng et al., 2005). Darüber hinaus spielen perisynaptische Fibroblasten eine Rolle bei der Regeneration von neuromuskulären Endplatten indem sie u.a. Brücken zwischen denervierten NMJs und terminalen Schwann Zellen ausbilden und dadurch den Weg zum Sprouting terminaler Axonendigungen bahnen (Court et al., 2008b). Verschiedene Arbeitsgruppen konnten zudem zeigen, dass Mikroglia-Zellen, die Makrophagen des ZNS, am Aufbau, Umbau und Funktion von Synapsen des Zentralnervensystems beteiligt sind. Sie können beispielsweise synaptische Mikro-Umbauprozesse durch Eliminierung von synaptischen Elementen mittels Phagozytose bewirken (Schafer et al., 2013). Dabei sind die beschriebenen Mikroglia-Synapsen-Interaktionen abhängig von neuronaler Aktivität. In einer anderen Studie konnte außerdem demonstriert werden, dass es im Gehirn im Laufe des Alters zu einem Anstieg an Phagozytose von prä- und postsynaptischen Elementen durch Mikroglia kommt und dies gleichermaßen mit einer Zunahme der altersbedingten Einschränkung des Hörens und Sehens einhergeht (Tremblay et al., 2012). Neben den beschriebenen Funktionen konnte für mikrogliale Zellen im ZNS eine Reihe weiterer Funktionen identifiziert werden. Sie regulieren sowohl den kontrollierten Zelltod wie auch das Überleben von sich entwickelnden Neuronen. Sie fördern die Entwicklung von Astrozyten, Oligodendrozyten und Endothelzellen und sie sind beteiligt an der Formation neuronaler Netzwerke und dem Aktivitäts-abhängigen Umbau von Synapsen (Frost and Schafer, 2016).

Vor dem Hintergrund dieser "Multifunktionalität" von mikroglialen Zellen weisen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit darauf hin, dass Makrophagen auch eine physiologische Rolle an der neuromuskulären Endplatte spielen und hierbei an synaptischen Auf- und Umbauprozessen beteiligt sein könnten. Die Ergebnisse zum alternden Wildtyp, die eine Zunahme an partieller Denervation und Makrophagen-Endplatten-Assoziation bei 24 Monate alten Tieren zeigten, deuten außerdem darauf hin, dass Makrophagen an der NMJ, ähnlich wie

Mikroglia im alternden Gehirn, an degenerativen Prozessen beteiligt sind. Daneben fiel bei Wildtypen nach Behandlung mit einem spezifischen CSF-1 Rezeptor Inhibitor (eigene Einzelbeobachtungen) eine deutliche Reduktion an denervierten Endplatten ebenso wie einen vollständigen Rückgang an Makrophagen-Endplatten-Assoziation auf. Dies spricht dafür, dass Makrophagen auch im Rahmen der physiologischen Rolle an der Endplatte eng mit den weiteren zellulären Elementen der NMJ, wie Fibroblasten und Schwann Zellen interagieren und darüber degenerative Prozesse wie Denervation steuern. Dieser Mechanismus der natürlichen Interaktion ist möglicherweise bei CMT Neuropathien sowie anderen neuromuskulären Erkrankungen gesteigert. Der gleichmäßige und verhältnismäßige Anstieg an Endplatten in Assoziation mit Makrophagen und an Denervation sowohl bei Mutanten, wie auch in reduziertem Umfang beim Wildtyp, spricht dafür, dass in beiden Fällen derselbe molekulare Mechanismus verantwortlich ist.

In Zusammenfassung deuten diese Ergebnisse also darauf hin, dass Makrophagen nicht nur bei CMT Neuropathien und möglicherweise anderen neuromuskulären Erkrankungen eine pathologische Rolle an der neuromuskulären Endplatte spielen, sondern eventuell auch über einen ähnlichen Mechanismus beteiligt sein könnten an physiologischen Umstrukturierungs- und Degenerationsprozessen der NMJ. Um dies näher zu analysieren, könnte in zukünftigen Arbeiten untersucht werden ob die Präsynapse Makrophagen-assoziierte Veränderungen beispielsweise an aktiven Zonen aufweist oder ob vermehrtes Sprouting als Reaktion auf Denervation vorliegt. Auch physiologisch-funktionelle Untersuchungen der synaptischen Funktion mittels Patch Clamp wären eine sinnvolle Ergänzungsmöglichkeit.



#### 4.5. Schlussfolgerungen für mögliche Therapieoptionen

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass die genetische oder medikamentöse Blockade von PNS-infiltrierenden Makrophagen zu einer Reduktion Makrophagen-assoziiierter pathologischer Prozesse an der neuromuskulären Endplatte in Mausmodellen für CMT1 Neuropathien führt. In Anbetracht dessen, dass für CMT, ähnlich wie für viele weitere neuromuskuläre bzw. neurodegenerative Erkrankungen, bislang keine kausale Therapie existiert und Makrophagen als wesentliche Schlüsselzellen der Pathogenese identifiziert wurden, eröffnen sich insbesondere potentielle "synapto-trophe" Therapieoptionen zur Vermeidung von Schädigungen der NMJ im Rahmen dieser Erkrankung.

Ein vielversprechender Behandlungsansatz ist die medikamentöse Blockade des CSF-1 bzw. MCP-1 Rezeptors von Makrophagen. In unserer Arbeitsgruppe konnte durch die Behandlung von zwei verschiedenen Myelin Mutanten mit einem spezifischen CSF-1 Rezeptor Inhibitor bereits eine deutliche Reduktion von Makrophagen im Nerv und damit einhergehend eine Abnahme an typischen histopathologischen und funktionelle Auffälligkeiten bewirkt werden (Klein et al., 2015). Auch die Untersuchung von Mäusen nach CSF-1 Rezeptor Inhibitor Behandlung in dieser Arbeit zeigten eine Reduktion an Makrophagen im Muskel und an der neuromuskulären Endplatte. Allerdings fiel auch eine geringe Zunahme an Denervation bei Myelin Mutanten nach CSF-1 Rezeptor Inhibitor Behandlung auf. Dies könnte durch einen möglichen neurotoxischen Effekt als Nebenwirkung erklärt werden. Das Medikament wurde im Rahmen dieser Arbeit zudem in einer höheren Dosis angewandt als in der oben genannten Veröffentlichung unserer Arbeitsgruppe, wodurch sich eine Verstärkung von möglichen Nebenwirkungen erklären lassen. In einer aktuellen Arbeit konnte gezeigt werden, dass zwei verschiedene Isoformen von CSF-1 eine unterschiedliche Wirkung auf Makrophagen bei Cx32def Mäusen ausüben (Groh et al., 2016). Während die sekretorische Isoform spCSF-1 Makrophagen-Aktivierung und Makrophagen-assoziierten neuronalen Schaden verursacht,

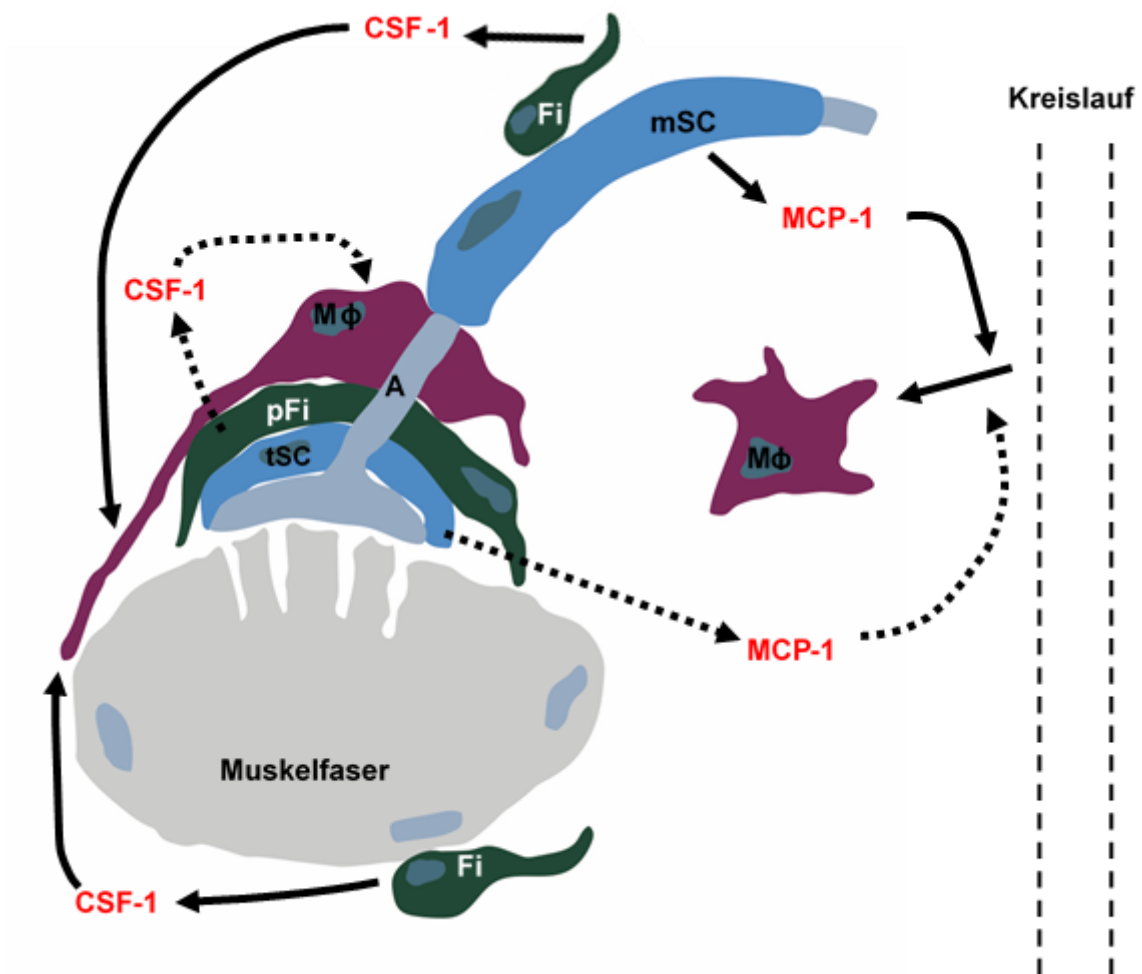
kann die Oberflächen Isoform csCSF-1 eine Hemmung von Makrophagen und deren negativen Einflüssen bewirken. Die weitere Anwendung von Isoform-spezifischen CSF-1 Rezeptor Blockern und die Untersuchung der Auswirkungen auf die NMJ stellt daher eine interessante zukünftige Option dar. Eine weitere Möglichkeit wäre die Blockade des MCP-1 Rezeptors, da heterozygote MCP-1- Doppelmutanten in dieser Studie und vorangegangenen Studien unserer Arbeitsgruppe eine deutliche Abnahme an Makrophagen im Nerv und an der NMJ sowie eine Abnahme Makrophagen-assoziiierter Schädigung am Nerv sowie an der NMJ zeigten (Groh et al., 2010). Bei Untersuchungen an Mäusen mit chronischer Entzündung bewirkte die Behandlung mit einem MCP-1 Rezeptor Blocker bzw. mit einem MCP-1 Antikörper eine Abnahme der inflammatorischen Hyperalgesie (Llorian-Salvador et al., 2016). Auch in Bezug zur HIV-Erkrankung, bei der es ebenso, u.a. MCP-1 vermittelt, zu einer starken Aktivierung von Immunreaktionen und Entzündung trotz anti-retroviraler Therapie kommt, wird die Anwendung einer MCP-1 Blockade als mögliche neue Therapieoption diskutiert (Covino et al., 2016).

Da in dieser Studie Mäuse mit genetischem CNTF-Mangel einen Anstieg an Makrophagen an der NMJ sowie auch eine dezente Zunahme an Denervation zeigten, kann man im Umkehrschluss davon ausgehen, dass die Präsenz von CNTF und möglicherweise weiteren neurotrophen Faktoren die NMJ vor Makrophagen-assoziiierter Schädigung und Denervation bewahren kann. Allerdings ist noch unklar, wie CNTF in CMT Mutanten reguliert wird und ob Makrophagen von CMT Mutanten CNTF Rezeptoren exprimieren. In verschiedenen Mausmodellen für Motoneuronopathien konnte durch die medikamentöse Gabe von CNTF eine verbesserte Stabilität neuronaler Axone und neuromuskulärer Endplatten bewirkt werden (Sagot et al., 1998; Pun et al., 2006). In einer anderen Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass bei adulten Mäusen sowohl die subkutane Applikation von CNTF wie auch die Gabe von Botulinum Toxin (BoTX) ein verstärktes Sprouting von Nerventerminalien im Muskel bzw. an der NMJ bewirkt (Wright et al., 2007). In Zusammenschau dieser Ergebnisse wäre CNTF allein oder eventuell in Kombination mit BoTX

oder einem CSF-1 Rezeptor Inhibitor im Prinzip eine denkbare Therapieoption für CMT. Jedoch gilt zu bedenken, dass CNTF in klinischen Studien nach systemischer Applikation schwere Nebenwirkungen gezeigt hat, wie akute-Phase-Reaktionen (Fieber), Kachexie und metabolische Effekte (Dittrich et al., 1994; Simon et al., 2010). Daher ist eine therapeutische Anwendung bei Patienten mit einer nicht lebensbedrohlichen Erkrankung momentan noch ausgeschlossen.

#### **4.6. Synopsis**

Durch diese Arbeit wird das Wissen über Pathomechanismen, die an der neuromuskulären Endplatte bei neurologischen Erkrankungen aber auch altersentsprechender Neurodegeneration beteiligt sind, erweitert. Die neuromuskuläre Synapse stellt sich hierbei als sensitive und verwundbare Struktur dar, die scheinbar selektiv von Makrophagen besetzt wird. Offenbar liegt eine sensible Interaktion zwischen Makrophagen und den zellulären Elementen der NMJ vor, die unter physiologischen Konditionen synaptische Remodelling-Prozesse steuern können und unter pathologischen Bedingungen möglicherweise eine Schädigung der NMJ hervorrufen.



mSC	myelinisierende Schwann Zelle	Mφ	Makrophage
tSC	terminale Schwann Zelle	A	Axon
Fi	Fibroblaste	→	anerkannt
pFi	perisynaptische Fibroblaste	----->	hypothetisch

**Abb. 19: Schematische Darstellung zellulärer und molekularer Interaktionen an der neuromuskulären Endplatte unter physiologischen und neuropathologischen Konditionen**

Das Schema zeigt die zellulären und molekularen Elemente an der neuromuskulären Endplatte, die unter physiologischen Bedingungen möglicherweise in milder Form und unter neuropathologischen Konditionen in gesteigerter Form interagieren.

In Mausmodellen der Charcot-Marie-Tooth Neuropathien und anderen neurologischen Erkrankungen kommt es zu einer erhöhten Freisetzung pathogener Zytokine und Chemokine. Die erhöhte Expression von MCP-1 durch myelinisierende und möglicherweise terminale Schwann Zellen bewirkt eine gesteigerte Rekrutierung von Makrophagen aus dem Blutkreislauf. Fibroblasten und möglicherweise auch perisynaptische Fibroblasten exprimieren vermehrt CSF-1, was ebenfalls zu einer gesteigerten Invasion und Aktivierung von Makrophagen führt. Welche Signale zu einer verstärkten Aktivierung von Fibroblasten und damit CSF-1 Expression führen, konnte bislang nicht geklärt werden. Die integrale Zugehörigkeit von terminalen Schwann

Zellen und perisynaptischen Fibroblasten zur neuromuskulären Endplatte und damit ihre enge räumliche Verbindung, kann die selektive Assoziation von Makrophagen an die NMJ erklären. Nach räumlicher Assoziation an die Endplatte, scheint ein Makrophagen-assoziiertes Schaden zur Denervation der NMJ zu führen. Im Rahmen der physiologischen Degeneration während natürlicher Alterungsprozesse könnten ähnliche Mechanismen in abgeschwächter Form ablaufen.

## 5. Zusammenfassung

Bei den Charcot-Marie-Tooth (CMT) Neuropathien handelt es sich um erbliche Erkrankungen des peripheren Nervensystems, die progredient zu motorischen und sensorischen Defiziten führen und für die bislang keine kausalen Therapieoptionen existieren. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass Entzündungsreaktionen, insbesondere durch Lymphozyten und Makrophagen vermittelt, eine bedeutende Rolle bei der Pathogenese dieser Erkrankung spielen. Neben neuronaler und axonaler Schädigung, sowie Demyelinisierung ist in untersuchten Myelin Mutanten auch eine erhöhte Anzahl an denervierten neuromuskulärer Endplatten zu erkennen. Eine genetische Blockade der Makrophagen-Aktivierung konnte in den Studien eine Verbesserung sämtlicher neuropathologischer Merkmale bei gleichzeitig reduzierter Makrophagenanzahl zeigen. Ob und welche Rolle Makrophagen bei der Denervation neuromuskulärer Endplatten spielen, blieb bislang ungeklärt.

In dieser Studie konnte in allen untersuchten Myelin Mutanten im Vergleich zum Wildtyp eine Zunahme an neuromuskulären Synapsen beobachtet werden, die mit Makrophagen räumlich assoziiert waren. Daneben zeigten entsprechende Myelin Mutanten eine Zunahme denervierter und partiell denervierter Endplatten und zwar interessanterweise direkt proportional zur Anzahl an Synapsen in Assoziation mit Makrophagen. Das bedeutet, dass die Anzahl an Endplatten in Assoziation mit Makrophagen verhältnismäßig parallel zur Anzahl an denervierten Endplatten zunahm, während die Anzahl an Makrophagen im gesamten Muskel nahezu unverändert blieb. Dies deutet eine mögliche Rolle der räumlich mit Endplatten assoziierten Makrophagen an deren Denervation an. Dabei waren alle Synapsen in Assoziation mit Makrophagen innerviert und damit morphologisch intakt. Bei doppel-mutanten Mäusen mit genetischer Blockade der Makrophagen-Aktivierung waren die beschriebenen pathologischen Merkmale an der neuromuskulären Synapse deutlich reduziert bei gleichzeitig signifikanter Abnahme an Makrophagen in Assoziation mit Endplatten. Ähnliche pathologische Auffälligkeiten wie bei Myelin Mutanten fanden sich in geringerer Ausprägung auch im Wildtyp im Rahmen des

Alterungsprozesses sowie auch bei Mäusen mit Defizienz des neurotrophen Faktors CNTF.

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse darauf hin, dass sowohl in der Pathogenese der CMT Neuropathie wie auch im Rahmen altersbedingter Neurodegeneration ein Makrophagen-vermittelter Schaden an der neuromuskulären Endplatte entsteht. Wesentliche Mediatoren scheinen hierbei das von Fibroblasten und vermutlich auch perisynaptischen Fibroblasten exprimierte CSF-1 zu sein, sowie MCP-1, das durch Schwann Zellen und möglicherweise auch von terminalen Schwann Zellen freigesetzt wird. Auch eine Defizienz des neurotrophen Faktors CNTF bewirkt zumindest in geringem Ausmaß eine Zunahme der pathologischen Merkmale Denervation und Makrophagen-Endplatten-Assoziation im Vergleich zum Wildtyp. Diese Ergebnisse erweitern insbesondere das Wissen um Pathomechanismen an der neuromuskulären Endplatte und eröffnen neue Möglichkeiten der Behandlung für CMT und weitere neuromuskuläre Erkrankungen.

## 6. Anhang

### 6.1. Ausstattung und Materialien

#### 6.1.1. Technische Ausstattung

CCD Kamera		Visitron Systems (Tuchheim, Deutschland)
Cryostat	CM 3050 S	Leica (Wetzlar, Deutschland)
Deckgläser		R. Langenbrinck (Emmendingen, Deutschland)
Elektronenmikroskop	LEO 906 E	Zeiss (Oberkochen, Deutschland)
Filterspitzen		Sarstedt (Nürnbrecht, Deutschland)
Gefrierschrank		Liebherr (Biberach, Deutschland)
Mikroskop	Axiophot 2	Zeiss (Oberkochen, Deutschland)
Mikroskop	CX31	Olympus (Hamburg, Deutschland)
Mikrotom	Ultracut E	Reichert-Jung (Heidelberg, Deutschland)
Objekträger	Super Frost Plus	R. Langenbrinck (Emmendingen, Deutschl.)
Pap Pen		SCI Science Services (München, Deutschland)



Perfusionspumpe	Reglo	Ismatec (Glattbrugg, Schweiz)
Pipetten		Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Pipettenspitzen		Sarstedt (Nürnberg, Deutschland)
ProScan Slow Scan CCD Kamera		ProScan (Lagerlechfeld, Deutschland)
Reaktionsgefäße		Sarstedt (Nürnberg, Deutschland)
Schüttler	Mini Rocker MR1 Bio San	A. Hartenstein (Würzburg, Deutschland)
Trimmer	EM Trim	Leica (Nussloch, Deutschland)
Vibratom	VL 1200	Leica (Wetzlar, Deutschland)
Vortex Mischer	L46	Labinco (Breda, Niederlande)
Zentrifuge	Biofuge 15R	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Zentrifuge	Biofuge Pico	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Zentrifuge	Centrifuge 5424	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)

### Software

Adobe Photoshop	CS3 Extended	Adobe Systems GmbH (München, Deutschland)
Image J		NIH (Bethesda, USA)
iTEM		Olympus (Hamburg, Deutschland)

MetaVue		Molecular Devices (Synnyvale, CA, USA)
Office		Microsoft (Redmond, USA)
SPOT		Diagnostic Instruments (Sterling Heights, MI, USA)
SPSS	PASW Statistics 18	IBM (Ehningen, Deutschland)

### 6.1.2. Lösungen, Reagenzien, Chemikalien

#### Lösungen

DABCO                      25% 1xPBS  
                                   75% Glycerol  
                                   25mg/ml 1,4-diazabicyclo [2.2.2] octane

PBS (pH: 7,4)              137mM NaCl  
                                   2.7mM KCl  
                                   1.5mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
                                   8.1mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

Spurr's Medium            10g ERL 4206 (3,4-Epoxy-cyclohexylmethyl-  
                                   3,4 epoxy- cyclohexylcyclo-carboxylate)  
                                   6g DER 736  
                                   26g NSA (Nonenylsuccinicanhydride)  
                                   0.4g DMAE (Dimethylaminoethanol)

PFA/ CaCo                 4% PFA

100 ml CaCo

4% PFA/4%GA

0,2 % GA

100 ml /PFA/CaCo

## Reagenzien

Aqua-Poly/Mount	Polysciences (Eppelheim, Deutschland)
Avidin/Biotin Kit Standard Ultra Sensitiv ABC Staining Kit	Thermo Scientific Pierce Biotechnology (Rockford, USA)
DAPI (D8417)	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
Heparin	Ratiopharm (Ulm, Deutschland)
Tissue Tek	Sakura (Alphen aan den Rijn, Niederlande)
VitroClud	R. Langenbrinck (Emmendingen, Deutschland)
$\alpha$ -Bungarotoxin Alexa Fluor 488 konjugiert	Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)

## Chemikalien

3,3 Diaminobenzidin-tetrachlorid (DAB)	Kementec Diagnostics (Taastrup, Dänemark)
Aceton	J.T. Baker (Deutschland)
Agarose	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Cacodylsäure-Natriumsalz (CaCo)	Serva (Heidelberg, Deutschland)
Chloroform	
Diglycidylether-polypropylenglycol (DER)	Serva (Heidelberg, Deutschland)

Dimethylaminoethanol (DMAE)	Serva (Heidelberg, Deutschland)
Ethanol	J.T. Baker (Deutschland)
Kaliumchlorid (KCl)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Kalium-dihydrogenorthosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Methylbutan	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Nonenylsuccinicanhydrid (NSA)	Serva (Heidelberg, Deutschland)
Osmiumtetroxid (OsO <sub>4</sub> )	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
Paraformaldehyd (PFA)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Triton-X-100	Roth (Karlsruhe, Deutschland)

### 6.1.3. Antikörper

#### Primäre Antikörper

Angriffspunkt	Firma	Wirt	Verdünnung	Zusatz
F4/80	Serotec	Ratte	1:300	-
CD68	Serotec	Ratte	1:400	Lagerung bei 4°C
CD34	Bioscience	Ratte	1:500	Lagerung bei 4°C
Synaptophysin	Synaptic Systems	Meerschweinchen	1:500	0,3% Triton
Neurofilament	Sigma	Maus	1:150	-

## Sekundäre Antikörper

Angriffspunkt	Firma	Wirt	Verdünnung	Konjugation
Ratte IgG	Vector	Kaninchen	1:100 (IHC) 1:50 (IEM)	Biotin
Meerschweinchen IgG	Dianova	Esel	1:300	Cy3
Acetylcholin-Rezeptor	Molecular Probes		1:400	Alexa Fluor 488
Ratte Ig G	Serotec	Ziege	1:300	Cy3

## 6.2. Abkürzungsverzeichnis

µm	Mikrometer
Abb.	Abbildung
ACh	Acetylcholin
AChE	Acetylcholinesterase
AChR	Acetylcholin-Rezeptor
ALS	amyotrophe Lateralsklerose
Aqua dest.	destilliertes Wasser
beispw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
ca	zirka
CMT	Charcot-Marie-Tooth Erkrankung
COX-2	Cyclooxygenase 2
CSF-1	Colony stimulating factor-1
Cx32	Connexin 32
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octane
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindole
def	defizient
DNM2	Dynamamin 2

e.g.	exempli gratia (lat.: zum Beispiel)
EGR 2	early growth response 2 /Krox-20
FDB	Musculus flexor digitorum brevis
FGD4	Aktinfilament bindendes Protein Frabin
FIG4	Phosphatidylinositol 3,5, Bisphosphat 5 Phosphatase
GARS	Glycyl-tRNA-Synthetase
GDAP1	Gangliosid-induziertes Differenzierungs-assoziiertes Protein 1
GJB1	Gap Junction Protein beta 1
h	Stunde
HMSN	hereditäre motorische und sensorische Neuropathien
HSP27 (HSPB1)	27kDa kleines Hitzeschock Protein B1
i.e.	id est (lat.: das heisst)
IEM	Immunoelektronenmikroskopie
Ig	Immunglobulin
IHC	Immunhistochemie
kDa	kilo Dalton
KG	Körpergewicht
LITAF	Lipopolysaccharid-induzierter TNF-Faktor
LMNA	Laminin Typ A
M	molar
M	Monat
Mb	Mega Basen (Paare)
MBP	myelin basic protein
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1
MFN2	Mitofusin 2
Min.	Minute
MP	Makrophage
MPZ	Myelin Protein Zero
MTMR13	Myotubularin related protein 13
MTMR2	Myotubularin related protein 2
NDRG1	N-myc downregulated protein 1

NEFL	Neurofilament leichte Kette
Nf	Neurofilament
NLG	Nervenleitgeschwindigkeit
NMJ	Neuromuskuläre Junktion
NRG1/I	Neuregulin 1/Isoform I
o.g.	oben genannt
op	osteopetrotisch
P0	Myelin Protein 0
PBS	Phosphate buffered saline
PMP22	Peripheres Myelinprotein 22
PNS	Peripheres Nervensystem
RAB7	Rab Familie der Ras GTPasen
RAG	recombination-activating gene
RT	Raumtemperatur
SC	Schwann Zelle
sog.	so genannt
SV	synaptischer Vesikel
Syn	Synaptophysin
tg	transgen
TNF	Tumornekrosefaktor
TRPV4	Transient Rezeptor Potenzial Kationen Kanal Subtyp V/ 4
u.a.	unter anderem
vs	versus
Wt	Wildtyp
YARS	Tyrosyl-tRNA-Synthetase
αBTX/αBTX	Alpha-Bungarotoxin

## 7. Literaturverzeichnis

- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Robert K, Walter P (2002) *Molecular Biology of the Cell*. 4th Edition. Garland Science Fourth Edition.
- Austyn JM, Gordon S (1981) F4/80, a monoclonal antibody directed specifically against the mouse macrophage. *European journal of immunology* 11:805-815.
- Barneo-Munoz M, Juarez P, Civera-Tregon A, Yndriago L, Pla-Martin D, Zenker J, Cuevas-Martin C, Estela A, Sanchez-Arago M, Forteza-Vila J, Cuezva JM, Chrast R, Palau F (2015) Lack of GDAP1 induces neuronal calcium and mitochondrial defects in a knockout mouse model of charcot-marie-tooth neuropathy. *PLoS Genet* 11:e1005115.
- Berger P, Young P, Suter U (2002) Molecular cell biology of Charcot-Marie-Tooth disease. *Neurogenetics* 4:1-15.
- 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.
- Bernard R, De Sandre-Giovannoli A, Delague V, Levy N (2006) Molecular genetics of autosomal-recessive axonal Charcot-Marie-Tooth neuropathies. *Neuromolecular medicine* 8:87-106.
- Birks R, Huxley HE, Katz B (1960) The fine structure of the neuromuscular junction of the frog. *The Journal of physiology* 150:134-144.
- Bishop DL, Misgeld T, Walsh MK, Gan WB, Lichtman JW (2004) Axon branch removal at developing synapses by axosome shedding. *Neuron* 44:651-661.
- Boido M, Vercelli A (2016) Neuromuscular Junctions as Key Contributors and Therapeutic Targets in Spinal Muscular Atrophy. *Front Neuroanat* 10:6.
- Braathen GJ (2012) Genetic epidemiology of Charcot-Marie-Tooth disease. *Acta neurologica Scandinavica Supplementum*:iv-22.
- Brancolini C, Edomi P, Marzinotto S, Schneider C (2000) Exposure at the cell surface is required for gas3/PMP22 To regulate both cell death and cell spreading: implication for the Charcot-Marie-Tooth type 1A and Dejerine-Sottas diseases. *Mol Biol Cell* 11:2901-2914.
- Brancolini C, Marzinotto S, Edomi P, Agostoni E, Fiorentini C, Muller HW, Schneider C (1999) Rho-dependent regulation of cell spreading by the tetraspan membrane protein Gas3/PMP22. *Mol Biol Cell* 10:2441-2459.



- Brennan KM, Bai Y, Shy ME (2015) Demyelinating CMT-what's known, what's new and what's in store? *Neurosci Lett* 596:14-26.
- Bros H, Millward JM, Paul F, Niesner R, Infante-Duarte C (2014) Oxidative damage to mitochondria at the nodes of Ranvier precedes axon degeneration in ex vivo transected axons. *Experimental neurology* 261:127-135.
- Calhoun ME, Jucker M, Martin LJ, Thinakaran G, Price DL, Mouton PR (1996) Comparative evaluation of synaptophysin-based methods for quantification of synapses. *Journal of neurocytology* 25:821-828.
- Carenini S, Maurer M, Werner A, Blazyca H, Toyka KV, Schmid CD, Raivich G, Martini R (2001) The role of macrophages in demyelinating peripheral nervous system of mice heterozygously deficient in p0. *J Cell Biol* 152:301-308.
- Charcot J, Marie P (1886) Sur une forme particuliere d'atrophie musculaire progressive souvent familiale debutant par les pieds et les jambes et atteignant plus tard les mains. *Rev Med (Paris)* 6:97-138.
- Chung T, Park JS, Kim S, Montes N, Walston J, Hoke A (2016) Evidence for dying-back axonal degeneration in age-associated skeletal muscle decline. *Muscle & nerve*.
- Court FA, Coleman MP (2012) Mitochondria as a central sensor for axonal degenerative stimuli. *Trends in neurosciences* 35:364-372.
- Court FA, Brophy PJ, Ribchester RR (2008a) Remodeling of motor nerve terminals in demyelinating axons of periaxin-null mice. *Glia* 56:471-479.
- Court FA, Gillingwater TH, Melrose S, Sherman DL, Greenshields KN, Morton AJ, Harris JB, Willison HJ, Ribchester RR (2008b) Identity, developmental restriction and reactivity of extralaminar cells capping mammalian neuromuscular junctions. *J Cell Sci* 121:3901-3911.
- Covino DA, Sabbatucci M, Fantuzzi L (2016) The CCL2/CCR2 Axis in the Pathogenesis of HIV-1 Infection: A New Cellular Target for Therapy? *Curr Drug Targets* 17:76-110.
- Dale HH, Feldberg W, Vogt M (1936) Release of acetylcholine at voluntary motor nerve endings. *The Journal of physiology* 86:353-380.
- Dittrich F, Thoenen H, Sendtner M (1994) Ciliary neurotrophic factor: pharmacokinetics and acute-phase response in rat. *Annals of neurology* 35:151-163.
- 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. *Archives of neurology* 18:603-618.
- Errea O, Moreno B, Gonzalez-Franquesa A, Garcia-Roves PM, Villoslada P (2015) The disruption of mitochondrial axonal transport is an early event in neuroinflammation. *J Neuroinflammation* 12:152.
- Feng Z, Ko CP (2008) The role of glial cells in the formation and maintenance of the neuromuscular junction. *Ann N Y Acad Sci* 1132:19-28.
- Feng Z, Koirala S, Ko CP (2005) Synapse-glia interactions at the vertebrate neuromuscular junction. *Neuroscientist* 11:503-513.
- Filbin MT, Walsh FS, Trapp BD, Pizzey JA, Tennekoon GI (1990) Role of myelin P0 protein as a homophilic adhesion molecule. *Nature* 344:871-872.
- Fischer LR, Culver DG, Tennant P, Davis AA, Wang M, Castellano-Sanchez A, Khan J, Polak MA, Glass JD (2004) Amyotrophic lateral sclerosis is a distal axonopathy: evidence in mice and man. *Experimental neurology* 185:232-240.
- Fischer S, Weishaupt A, Troppmair J, Martini R (2008a) Increase of MCP-1 (CCL2) in myelin mutant Schwann cells is mediated by MEK-ERK signaling pathway. *Glia* 56:836-843.
- Fischer S, Kleinschnitz C, Muller M, Kobsar I, Ip CW, Rollins B, Martini R (2008b) Monocyte chemoattractant protein-1 is a pathogenic component in a model for a hereditary peripheral neuropathy. *Mol Cell Neurosci* 37:359-366.
- Fortun J, Go JC, Li J, Amici SA, Dunn WA, Jr., Notterpek L (2006) Alterations in degradative pathways and protein aggregation in a neuropathy model based on PMP22 overexpression. *Neurobiology of disease* 22:153-164.
- Francos-Quijorna I, Amo-Aparicio J, Martinez-Muriana A, Lopez-Vales R (2016) IL-4 drives microglia and macrophages toward a phenotype conducive for tissue repair and functional recovery after spinal cord injury. *Glia* 64:2079-2092.
- Frey D, Schneider C, Xu L, Borg J, Spooren W, Caroni P (2000) Early and selective loss of neuromuscular synapse subtypes with low sprouting competence in motoneuron diseases. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 20:2534-2542.
- Frost JL, Schafer DP (2016) Microglia: Architects of the Developing Nervous System. *Trends Cell Biol* 26:587-597.
- Garbay B, Heape AM, Sargueil F, Cassagne C (2000) Myelin synthesis in the peripheral nervous system. *Prog Neurobiol* 61:267-304.

- Garcia ML, Fernandez A, Solas MT (2013) Mitochondria, motor neurons and aging. *Journal of the neurological sciences* 330:18-26.
- Garcia N, Santafe MM, Tomas M, Priego M, Obis T, Lanuza MA, Besalduch N, Tomas J (2012) Exogenous ciliary neurotrophic factor (CNTF) reduces synaptic depression during repetitive stimulation. *Journal of the peripheral nervous system : JPNS* 17:312-323.
- Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, Ley K (2010) Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* 327:656-661.
- Gensel JC, Zhang B (2015) Macrophage activation and its role in repair and pathology after spinal cord injury. *Brain Res* 1619:1-11.
- Gess B, Schirmacher A, Boentert M, Young P (2013) Charcot-Marie-Tooth disease: frequency of genetic subtypes in a German neuromuscular center population. *Neuromuscular disorders : NMD* 23:647-651.
- Giambonini-Brugnoli G, Buchstaller J, Sommer L, Suter U, Mantei N (2005) Distinct disease mechanisms in peripheral neuropathies due to altered peripheral myelin protein 22 gene dosage or a Pmp22 point mutation. *Neurobiology of disease* 18:656-668.
- Giese KP, Martini R, Lemke G, Soriano P, Schachner M (1992) Mouse P0 gene disruption leads to hypomyelination, abnormal expression of recognition molecules, and degeneration of myelin and axons. *Cell* 71:565-576.
- Giess R, Maurer M, Linker R, Gold R, Warmuth-Metz M, Toyka KV, Sendtner M, Rieckmann P (2002) Association of a null mutation in the CNTF gene with early onset of multiple sclerosis. *Archives of neurology* 59:407-409.
- Gonzalez-Freire M, de Cabo R, Studenski SA, Ferrucci L (2014) The Neuromuscular Junction: Aging at the Crossroad between Nerves and Muscle. *Frontiers in aging neuroscience* 6:208.
- Gordon S (2002) Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. *Cell* 111:927-930.
- Gordon S, Hamann J, Lin HH, Stacey M (2011) F4/80 and the related adhesion-GPCRs. *European journal of immunology* 41:2472-2476.
- Greenfield S, Brostoff S, Eylar EH, Morell P (1973) Protein composition of myelin of the peripheral nervous system. *J Neurochem* 20:1207-1216.
- Groh J, Basu R, Stanley ER, Martini R (2016) Cell-Surface and Secreted Isoforms of CSF-1 Exert Opposing Roles in Macrophage-Mediated Neural Damage in Cx32-Deficient Mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 36:1890-1901.

- Groh J, Weis J, Zieger H, Stanley ER, Heuer H, Martini R (2012) Colony-stimulating factor-1 mediates macrophage-related neural damage in a model for Charcot-Marie-Tooth disease type 1X. *Brain* 135:88-104.
- Groh J, Klein I, Hollmann C, Wettmarshausen J, Klein D, Martini R (2015) CSF-1-activated macrophages are target-directed and essential mediators of Schwann cell dedifferentiation and dysfunction in Cx32-deficient mice. *Glia* 63:977-986.
- Groh J, Heintl K, Kohl B, Wessig C, Greeske J, Fischer S, Martini R (2010) Attenuation of MCP-1/CCL2 expression ameliorates neuropathy in a mouse model for Charcot-Marie-Tooth 1X. *Human molecular genetics* 19:3530-3543.
- Harding AE, Thomas PK (1980a) The clinical features of hereditary motor and sensory neuropathy types I and II. *Brain* 103:259-280.
- Harding AE, Thomas PK (1980b) Genetic aspects of hereditary motor and sensory neuropathy (types I and II). *Journal of medical genetics* 17:329-336.
- Hirsch NP (2007) Neuromuscular junction in health and disease. *British journal of anaesthesia* 99:132-138.
- Holness CL, Simmons DL (1993) Molecular cloning of CD68, a human macrophage marker related to lysosomal glycoproteins. *Blood* 81:1607-1613.
- Hughes BW, Kusner LL, Kaminski HJ (2006) Molecular architecture of the neuromuscular junction. *Muscle & nerve* 33:445-461.
- Hughes DC, Marcotte GR, Marshall AG, West DW, Baehr LM, Wallace MA, Saleh PM, Bodine SC, Baar K (2016) Age-related Differences in Dystrophin: Impact on Force Transfer Proteins, Membrane Integrity, and Neuromuscular Junction Stability. *The journals of gerontology Series A, Biological sciences and medical sciences*.
- Huxley C, Passage E, Robertson AM, Youl B, Huston S, Manson A, Saberandjoniedi D, Figarella-Branger D, Pellissier JF, Thomas PK, Fontes M (1998) Correlation between varying levels of PMP22 expression and the degree of demyelination and reduction in nerve conduction velocity in transgenic mice. *Human molecular genetics* 7:449-458.
- Ip CW, Kroner A, Fischer S, Berghoff M, Kobsar I, Maurer M, Martini R (2006) Role of immune cells in animal models for inherited peripheral neuropathies. *Neuromolecular medicine* 8:175-190.
- Italiani P, Boraschi D (2014) From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation. *Front Immunol* 5:514.

- Kagiava A, Sargiannidou I, Theophilidis G, Karaiskos C, Richter J, Bashiardes S, Schiza N, Nearchou M, Christodoulou C, Scherer SS, Kleopa KA (2016) Intrathecal gene therapy rescues a model of demyelinating peripheral neuropathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113:E2421-2429.
- Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, Siegelbaum SA, Hudspeth AJ (2013) *Principles of Neural Science*. McGraw-Hill Fifth Edition.
- Kang H, Tian L, Thompson W (2003) Terminal Schwann cells guide the reinnervation of muscle after nerve injury. *Journal of neurocytology* 32:975-985.
- Klein D, Martini R (2016) Myelin and macrophages in the PNS: An intimate relationship in trauma and disease. *Brain Res* 1641:130-138.
- Klein D, Groh J, Wettmarshausen J, Martini R (2014) Nonuniform molecular features of myelinating Schwann cells in models for CMT1: distinct disease patterns are associated with NCAM and c-Jun upregulation. *Glia* 62:736-750.
- Klein D, Patzko A, Schreiber D, van Hauwermeiren A, Baier M, Groh J, West BL, Martini R (2015) Targeting the colony stimulating factor 1 receptor alleviates two forms of Charcot-Marie-Tooth disease in mice. *Brain* 138:3193-3205.
- Kobsar I, Maurer M, Ott T, Martini R (2002) Macrophage-related demyelination in peripheral nerves of mice deficient in the gap junction protein connexin 32. *Neurosci Lett* 320:17-20.
- Kobsar I, Hasenpusch-Theil K, Wessig C, Muller HW, Martini R (2005) Evidence for macrophage-mediated myelin disruption in an animal model for Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 1A. *J Neurosci Res* 81:857-864.
- 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* 126:804-813.
- Kohl B, Fischer S, Groh J, Wessig C, Martini R (2010) MCP-1/CCL2 modifies axon properties in a PMP22-overexpressing mouse model for Charcot-Marie-tooth 1A neuropathy. *The American journal of pathology* 176:1390-1399.
- Krady JK, Lin HW, Liberto CM, Basu A, Kremlev SG, Levison SW (2008) Ciliary neurotrophic factor and interleukin-6 differentially activate microglia. *J Neurosci Res* 86:1538-1547.

- Leal A, Ichim TE, Marleau AM, Lara F, Kaushal S, Riordan NH (2008) Immune effects of mesenchymal stem cells: implications for Charcot-Marie-Tooth disease. *Cell Immunol* 253:11-15.
- Lin HW, Jain MR, Li H, Levison SW (2009) Ciliary neurotrophic factor (CNTF) plus soluble CNTF receptor alpha increases cyclooxygenase-2 expression, PGE2 release and interferon-gamma-induced CD40 in murine microglia. *J Neuroinflammation* 6:7.
- Linker RA, Maurer M, Gaupp S, Martini R, Holtmann B, Giess R, Rieckmann P, Lassmann H, Toyka KV, Sendtner M, Gold R (2002) CNTF is a major protective factor in demyelinating CNS disease: a neurotrophic cytokine as modulator in neuroinflammation. *Nat Med* 8:620-624.
- Lippa CF, Rosso AL (2012) Loss of synaptophysin immunoexpression in primary progressive aphasia. *American journal of Alzheimer's disease and other dementias* 27:250-253.
- Llorian-Salvador M, Pevida M, Gonzalez-Rodriguez S, Lastra A, Fernandez-Garcia MT, Hidalgo A, Baamonde A, Menendez L (2016) Analgesic effects evoked by a CCR2 antagonist or an anti-CCL2 antibody in inflamed mice. *Fundam Clin Pharmacol* 30:235-247.
- Lu B, Rutledge BJ, Gu L, Fiorillo J, Lukacs NW, Kunkel SL, North R, Gerard C, Rollins BJ (1998) Abnormalities in monocyte recruitment and cytokine expression in monocyte chemoattractant protein 1-deficient mice. *The Journal of experimental medicine* 187:601-608.
- Martini R (1997) Animal models for inherited peripheral neuropathies. *Journal of anatomy* 191 ( Pt 3):321-336.
- Martini R (2001) The effect of myelinating Schwann cells on axons. *Muscle & nerve* 24:456-466.
- Martini R (2014) Neuregulin-1 alleviates Charcot-Marie-Tooth disease in rats. *Nat Med* 20:984-985.
- Martini R, Schachner M (1997) Molecular bases of myelin formation as revealed by investigations on mice deficient in glial cell surface molecules. *Glia* 19:298-310.
- Martini R, Willison H (2016) Neuroinflammation in the peripheral nerve: Cause, modulator, or bystander in peripheral neuropathies? *Glia* 64:475-486.
- Martini R, Klein D, Groh J (2013) Similarities between inherited demyelinating neuropathies and Wallerian degeneration: an old repair program may cause myelin and axon perturbation under nonlesion conditions. *The American journal of pathology* 183:655-660.

- Martini R, Fischer S, Lopez-Vales R, David S (2008) Interactions between Schwann cells and macrophages in injury and inherited demyelinating disease. *Glia* 56:1566-1577.
- Martini R, Zielasek J, Toyka KV, Giese KP, Schachner M (1995) Protein zero (P0)-deficient mice show myelin degeneration in peripheral nerves characteristic of inherited human neuropathies. *Nat Genet* 11:281-286.
- Maurer M, Kobsar I, Berghoff M, Schmid CD, Carenini S, Martini R (2002) Role of immune cells in animal models for inherited neuropathies: facts and visions. *Journal of anatomy* 200:405-414.
- 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* 23:351-359.
- Meyer IS, Jungmann A, Dieterich C, Zhang M, Lasitschka F, Werkmeister S, Haas J, Muller OJ, Boutros M, Nahrendorf M, Katus HA, Hardt SE, Leuschner F (2017) The cardiac microenvironment uses non-canonical WNT signaling to activate monocytes after myocardial infarction. *EMBO molecular medicine*.
- Micallef J et al. (2009) Effect of ascorbic acid in patients with Charcot-Marie-Tooth disease type 1A: a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet neurology* 8:1103-1110.
- 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.
- Naguib M, Flood P, McArdle JJ, Brenner HR (2002) Advances in neurobiology of the neuromuscular junction: implications for the anesthesiologist. *Anesthesiology* 96:202-231.
- Nelles E, Butzler C, Jung D, Temme A, Gabriel HD, Dahl U, Traub O, Stumpel F, Jungermann K, Zielasek J, Toyka KV, Dermietzel R, Willecke K (1996) Defective propagation of signals generated by sympathetic nerve stimulation in the liver of connexin32-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93:9565-9570.
- Nicks JR, Lee S, Kostamo KA, Harris AB, Sookdeo AM, Notterpek L (2013) Long-term analyses of innervation and neuromuscular integrity in the Trembler-J mouse model of Charcot-Marie-Tooth disease. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 72:942-954.
- Notterpek L, Ryan MC, Tobler AR, Shooter EM (1999) PMP22 accumulation in aggresomes: implications for CMT1A pathology. *Neurobiology of disease* 6:450-460.

- Ozturk G, Cengiz N, Erdogan E, Him A, Oguz EK, Yenidunya E, Aysit N (2013) Two distinct types of dying back axonal degeneration in vitro. *Neuropathol Appl Neurobiol* 39:362-376.
- Pareyson D, Scaiola V, Laura M (2006) Clinical and electrophysiological aspects of Charcot-Marie-Tooth disease. *Neuromolecular medicine* 8:3-22.
- Pareyson D, Saveri P, Sagnelli A, Piscosquito G (2015) Mitochondrial dynamics and inherited peripheral nerve diseases. *Neurosci Lett* 596:66-77.
- Pareyson D, Reilly MM, Schenone A, Fabrizi GM, Cavallaro T, Santoro L, Vita G, Quattrone A, Padua L, Gemignani F, Visioli F, Laura M, Radice D, Calabrese D, Hughes RA, Solari A (2011) Ascorbic acid in Charcot-Marie-Tooth disease type 1A (CMT-TRIAAL and CMT-TRAUK): a double-blind randomised trial. *Lancet neurology* 10:320-328.
- Patzko A, Shy ME (2011) Update on Charcot-Marie-Tooth disease. *Curr Neurol Neurosci Rep* 11:78-88.
- Pollari E, Goldsteins G, Bart G, Koistinaho J, Giniatullin R (2014) The role of oxidative stress in degeneration of the neuromuscular junction in amyotrophic lateral sclerosis. *Frontiers in cellular neuroscience* 8:131.
- Pun S, Santos AF, Saxena S, Xu L, Caroni P (2006) Selective vulnerability and pruning of phasic motoneuron axons in motoneuron disease alleviated by CNTF. *Nat Neurosci* 9:408-419.
- Reddy PH, Mani G, Park BS, Jacques J, Murdoch G, Whetsell W, Jr., Kaye J, Manczak M (2005) Differential loss of synaptic proteins in Alzheimer's disease: implications for synaptic dysfunction. *Journal of Alzheimer's disease* : JAD 7:103-117; discussion 173-180.
- Reilly MM, Hanna MG (2002) Genetic neuromuscular disease. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 73 Suppl 2:li12-21.
- Reilly MM, Shy ME (2009) Diagnosis and new treatments in genetic neuropathies. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 80:1304-1314.
- Rossor AM, Polke JM, Houlden H, Reilly MM (2013) Clinical implications of genetic advances in Charcot-Marie-Tooth disease. *Nature reviews Neurology* 9:562-571.
- Rotshenker S (2011) Wallerian degeneration: the innate-immune response to traumatic nerve injury. *J Neuroinflammation* 8:109.
- Sagot Y, Rosse T, Vejsada R, Perrelet D, Kato AC (1998) Differential effects of neurotrophic factors on motoneuron retrograde labeling in a murine model of motoneuron disease. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 18:1132-1141.



- Sanes JR, Lichtman JW (1999) Development of the vertebrate neuromuscular junction. *Annual review of neuroscience* 22:389-442.
- Saporta AS, Sottile SL, Miller LJ, Feely SM, Siskind CE, Shy ME (2011) Charcot-Marie-Tooth disease subtypes and genetic testing strategies. *Annals of neurology* 69:22-33.
- Saporta MA, Shy ME (2013) Inherited peripheral neuropathies. *Neurol Clin* 31:597-619.
- Schafer DP, Lehrman EK, Stevens B (2013) The "quad-partite" synapse: microglia-synapse interactions in the developing and mature CNS. *Glia* 61:24-36.
- Scherer SS, Wrabetz L (2008) Molecular mechanisms of inherited demyelinating neuropathies. *Glia* 56:1578-1589.
- Scherer SS, Deschenes SM, Xu YT, Grinspan JB, Fischbeck KH, Paul DL (1995) Connexin32 is a myelin-related protein in the PNS and CNS. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 15:8281-8294.
- Schmid CD, Stienekemeier M, Oehen S, Bootz F, Zielasek J, Gold R, Toyka KV, Schachner M, Martini R (2000) Immune deficiency in mouse models for inherited peripheral neuropathies leads to improved myelin maintenance. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 20:729-735.
- Sendtner M, Schmalbruch H, Stockli KA, Carroll P, Kreutzberg GW, Thoenen H (1992) Ciliary neurotrophic factor prevents degeneration of motor neurons in mouse mutant progressive motor neuronopathy. *Nature* 358:502-504.
- 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* 9:1533-1537.
- Sheu JY, Kulhanek DJ, Eckenstein FP (2000) Differential patterns of ERK and STAT3 phosphorylation after sciatic nerve transection in the rat. *Experimental neurology* 166:392-402.
- Shy ME, Garbern JY, Kamholz J (2002) Hereditary motor and sensory neuropathies: a biological perspective. *Lancet neurology* 1:110-118.
- Shy ME, Arroyo E, Sladky J, Menichella D, Jiang H, Xu W, Kamholz J, Scherer SS (1997) Heterozygous P0 knockout mice develop a peripheral neuropathy that resembles chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy (CIDP). *Journal of neuropathology and experimental neurology* 56:811-821.

- Siegel SG, Patton B, English AW (2000) Ciliary neurotrophic factor is required for motoneuron sprouting. *Experimental neurology* 166:205-212.
- Simon CM, Jablonka S, Ruiz R, Tabares L, Sendtner M (2010) Ciliary neurotrophic factor-induced sprouting preserves motor function in a mouse model of mild spinal muscular atrophy. *Human molecular genetics* 19:973-986.
- Skre H (1974) Genetic and clinical aspects of Charcot-Marie-Tooth's disease. *Clinical genetics* 6:98-118.
- Sleigh JN, Grice SJ, Burgess RW, Talbot K, Cader MZ (2014) Neuromuscular junction maturation defects precede impaired lower motor neuron connectivity in Charcot-Marie-Tooth type 2D mice. *Human molecular genetics* 23:2639-2650.
- Spaulding EL, Sleigh JN, Morelli KH, Pinter MJ, Burgess RW, Seburn KL (2016) Synaptic Deficits at Neuromuscular Junctions in Two Mouse Models of Charcot-Marie-Tooth Type 2d. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 36:3254-3267.
- Suter U, Scherer SS (2003) Disease mechanisms in inherited neuropathies. *Nat Rev Neurosci* 4:714-726.
- Tazir M, Hamadouche T, Nouioua S, Mathis S, Vallat JM (2014) Hereditary motor and sensory neuropathies or Charcot-Marie-Tooth diseases: An update. *Journal of the neurological sciences* 347:14-22.
- Tintignac LA, Brenner HR, Ruegg MA (2015) Mechanisms Regulating Neuromuscular Junction Development and Function and Causes of Muscle Wasting. *Physiol Rev* 95:809-852.
- Tooth H (1886) *The peroneal type of progressive muscular atrophy*. London: Lewis.
- Tremblay ME, Zettel ML, Ison JR, Allen PD, Majewska AK (2012) Effects of aging and sensory loss on glial cells in mouse visual and auditory cortices. *Glia* 60:541-558.
- Van Dyke JM, Smit-Oistad IM, Macrander C, Krakora D, Meyer MG, Suzuki M (2016) Macrophage-mediated inflammation and glial response in the skeletal muscle of a rat model of familial amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Experimental neurology* 277:275-282.
- Wang Q, Hebert SL, Rich MM, Kraner SD (2011) Loss of synaptic vesicles from neuromuscular junctions in aged MRF4-null mice. *Neuroreport* 22:185-189.
- Wang Y, Wehling-Henricks M, Samengo G, Tidball JG (2015) Increases of M2a macrophages and fibrosis in aging muscle are influenced by bone

marrow aging and negatively regulated by muscle-derived nitric oxide. *Aging Cell* 14:678-688.

Watila MM, Balarabe SA (2015) Molecular and clinical features of inherited neuropathies due to PMP22 duplication. *Journal of the neurological sciences*.

Weis J, Fine SM, David C, Savarirayan S, Sanes JR (1991) Integration site-dependent expression of a transgene reveals specialized features of cells associated with neuromuscular junctions. *J Cell Biol* 113:1385-1397.

Wiggins RC, Benjamins JA, Morell P (1975) Appearance of myelin proteins in rat sciatic nerve during development. *Brain Res* 89:99-106.

Wright MC, Cho WJ, Son YJ (2007) Distinct patterns of motor nerve terminal sprouting induced by ciliary neurotrophic factor vs. botulinum toxin. *J Comp Neurol* 504:1-16.

Yin X, Kidd GJ, Piro EP, McDonough J, Dutta R, Feltri ML, Wrabetz L, Messing A, Wyatt RM, Balice-Gordon RJ, Trapp BD (2004) Dysmyelinated lower motor neurons retract and regenerate dysfunctional synaptic terminals. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 24:3890-3898.

Yoshida H, Hayashi S, Kunisada T, Ogawa M, Nishikawa S, Okamura H, Sudo T, Shultz LD, Nishikawa S (1990) The murine mutation osteopetrosis is in the coding region of the macrophage colony stimulating factor gene. *Nature* 345:442-444.

## **Danksagung**

Ich danke Allen, die mich während der Entstehung dieser Arbeit begleitet und unterstützt haben.

Allen voran möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Rudolf Martini bedanken für die Überlassung dieses interessanten Themas und die Möglichkeit in einem guten Labor mit einem netten Team zusammenarbeiten zu können. Ich bin sehr dankbar für die exzellente wissenschaftliche Ausbildung, die hervorragende Betreuung und die permanente Unterstützung, die ich durch ihn erfahren habe.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Betreuer Dr. Dennis Klein für die jahrelange, zuverlässige Unterstützung und Beratung zu beinahe jeder Tageszeit. Er hatte trotz anspruchsvoller und fordernder Tätigkeit immer ein offenes Ohr für jedes Anliegen und stand mir stets mit Rat und Tat zur Seite. Ohne ihn wäre die Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen. Mein großer Dank dafür!

Außerdem möchte ich mich bei Prof. Anna-Leena Sirén für die bereitwillige Übernahme des Zweitgutachtens bedanken.

Prof. Michael Sendtner aus dem Institut für klinische Neurobiologie danke ich für die Überlassung CNTF defizienter Mäuse für meine Arbeit.

Weiterhin danke ich der medizinischen Fakultät der Uni Würzburg sowie dem Sonderforschungsbereich SFB 581 der Deutschen Forschungsgemeinschaft, die diese Arbeit finanziell unterstützt haben.

Zudem bedanke ich mich beim SFB 581 für die Möglichkeit mein Repertoire an wissenschaftlichen Fähigkeiten und Fertigkeiten im Rahmen des Promotionsprogramms zu erweitern.

Außerdem möchte ich allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der AG Martini herzlich danken für die gute Arbeitsatmosphäre und den Teamgeist, insbesondere: Dr. Jonas Pausch, Dr. Agnes Patzko, Irene Spahn, Jennifer Wettmarshausen, Marianne Huber, Dr. Janos Groh, Michaela Baier, Heinrich Blazyca, Silke Loserth und Bettina Meyer.

Ein großer Dank gilt auch meinen Freunden, die mich nicht nur während meines Studiums, sondern auch während der gesamten Entstehungsphase meiner Doktorarbeit stets unterstützt haben und mir zur Seite standen auch wenn wenig Zeit für gemeinsame Freizeit blieb. Ein besonderer Dank geht an meine engsten Freunde Mariella, Jens und Michael.

Meiner Freundin Mariella Manhardt möchte ich an dieser Stelle ganz besonders für die Unterstützung bei der grafischen Darstellung von Zeichnungen meiner Arbeit danken.

Ein großer Dank gebührt auch meinem Vater für das Korrekturlesen der Arbeit und seine zahlreichen und wertvollen Hinweise.

Zuletzt und ganz besonders herzlich möchte ich meinen Eltern danken, die mir nicht nur das Medizinstudium, sondern auch die Durchführung dieser aufwändigen Doktorarbeit ermöglichten. Sie haben mich während der gesamten Zeit nicht nur finanziell unterstützt, sondern standen mir immer, auch in anstrengenden Phasen, mit viel Geduld zur Seite und haben mit gemeinsamen, schönen Freizeiterlebnissen viel zu meiner Erholung beigetragen. Danke für Alles!

# Lebenslauf