

Aus der Neurologischen Klinik und Poliklinik  
der Universität Würzburg  
Direktor: Prof. Dr. med. K. V. Toyka

**Entwicklung von Merkelzellen in der Haut von  
P0-defizienten Mäusen**

**Inaugural-Dissertation**  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von  
**Sandra Mötzing**  
aus Bad Hersfeld

Würzburg, Januar 2002

Referent: Prof. Dr. med. M. Koltzenburg  
Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. R. Martini  
Dekan: Prof. Dr. med. V. ter Meulen

Tag der mündlichen Prüfung: 15.07.2002

Die Promovendin ist Ärztin

" Halte, was Du hast, daß niemand deine Krone nehme "  
Offenbarung 3,11

Meinen lieben Eltern und Großeltern

# **Inhaltsverzeichnis**

## **A. Einleitung**

1. Hereditäre Neuropathien im Überblick	1
2. Merkelzellstruktur und Merkelzellzytochemie	2
3. Merkelzellentwicklung und Merkelzellinnervation	4
4. Neutrophine und epidermale Innervation	6
5. Hereditäre motorisch-sensorische Neuropathien, Klassifikation und Gendefekte	9
6. P0, seine Funktion und das P0-defiziente Mausmodell	13
7. Fragestellungen	15

## **B. Material und Methoden**

1. Versuchstiere	16
2. Gewinnung des Gewebes	16
3. Histochemische Färbungen	17
4. Darstellung von Merkelzellen in Haarscheiben mit der Quinacrin-Methode	19
5. Immunologisch-enzymatische Bestimmung von Neurotrophinen	20
6. Auswertung	24

## **C. Ergebnisse**

1. Merkelzellen und Nervenfasernachweis	25
2. Histochemischer Merkelzellnachweis und Nachweis von Haarscheiben und Merkelzellen nach der Quinacrin-Methode	29
3. Histochemischer Nervenfasernachweis	33
4. NGF- und NT-3-Nachweis	36

## **D. Diskussion**

1. Zusammenfassung der Ergebnisse	38
2. Diskussion der Ergebnisse	39
3. Schlussfolgerung	49
4. Ausblick	50

<b>E. Glossar</b>	51
-------------------	----

<b>F. Literatur</b>	53
---------------------	----

<b>G. Danksagung</b>	
----------------------	--

<b>H. Lebenslauf</b>	
----------------------	--

## **A. EINLEITUNG**

### **1. Hereditäre periphere Neuropathien im Überblick**

Hereditäre periphere Neuropathien bilden eine komplexe, klinisch und genetisch heterogene Gruppe von chronischen Erkrankungen des peripheren Nervensystems, die Muskelschwäche und sensorische Dysfunktion vornehmlich in der unteren Extremität verursachen, so dass neben Sensibilitätsstörungen eine progrediente Abnahme der Muskelmasse durch Muskelatrophie und daraus resultierenden Skelettdeformitäten zu beobachten sind. Zu dieser Gruppe von Krankheiten zählen die Charcot-Marie-Tooth-Neuropathie (CMT), die hereditäre Neuropathie mit Neigung zu Druckpareesen (hereditary neuropathy with liability to pressure palsies, HNPP), das Déjérine-Sottas-Syndrom (DSS) und die congenitale Hypomyelinisierung (CH).

Die häufigsten Formen vieler hereditärer peripherer Neuropathien sind mit verschiedenen Mutationen in Myelin relevanten Genen assoziiert, die Proteine für die korrekte Bildung und die Erhaltung der Myelinscheide peripherer Nerven kodieren (Martini und Schachner 1997). Mutationen befinden sich in Myelinenen PMP 22 (peripheral nerve myelin protein; Roa et al. 1993a, Roa et al.1993b), P0 (myelin protein zero; Hayasaka et al. 1993a, Hayasaka et al. 1993b, Hayasaka et al. 1993c) und Cx32 (Connexin 32; Bergoffen et al. 1993b), sowie im Zinkfinger-Transkriptionsfaktor EGR2 (early growth response 2 zinc finger protein; Warner et al. 1998), die jeweils Subtypen der demyelinisierenden Charcot-Marie-Tooth- Krankheit (CMT1A, CMT1B, CMTX und CMT1D), verursachen.

Patienten mit Mutationen im P0-Gen weisen klinisch u.a. die, mit einer stark verlangsamten Nervenleitgeschwindigkeit einhergehende, CMT1B-Krankheit oder das schwer verlaufende Déjérine-Sottas-Syndrom auf (Hayasaka et al. 1993a, Hayasaka et al. 1993b, Roa et al. 1993a, Roa et al. 1993b). Bei diesem Syndrom zeigen sich bereits in frühester Kindheit schwere De- und Hypomyelinisierungen der peripheren Nerven und eine extreme Verminderung der Nervenleitgeschwindigkeit auf unter 10 m/s (Dyck 1975).

Ein großer Fortschritt in der Erforschung menschlicher hereditärer peripherer Neuropathien wurde durch die Erzeugung von Mausmutanten erzielt, die die

verschiedenen Gendefekte tragen und somit die menschlichen Krankheitserscheinungen nachahmen, so dass es möglich wurde die neuropathologischen Veränderungen am peripheren Nervensystem im Detail zu studieren. Als grundlegendes Tiermodell wurden in dieser Studie gentechnisch generierte homozygote P0-defiziente Mäuse eingesetzt. In der vorliegenden Arbeit soll mit Hilfe dieses Mausmodells untersucht werden, ob der Gendefekt einen axonalen Verlust bedingt, der zu einer Veränderung der Innervation der Haut und zu einer Beeinflussung mechanosensitiver Strukturen der Haut, wie. z.B. Merkelzellen führt, die in ihrer Entwicklung und ihrem Fortbestand auf eine nervale Versorgung angewiesen sind (English et al. 1980, Mills et al. 1989).

## **2. Merkelzellstruktur und Merkelzellzytochemie**

Die Merkelzelle wurde erstmals von (Merkel 1875) in Fröschen und Säugern entdeckt und in der unbehaarten Haut als Tastzelle und Bestandteil eines Tastflecks von 1 - 5  $\mu\text{m}$  Größe (Iggo und Muir 1969) definiert. In der behaarten Haut sind meist mehrere Merkelzellen als "Haarscheibe" (English 1977) zusammengefasst und einem Tylotrichhaar benachbart.

Der Merkelzellrezeptorkomplex, d.h. die Merkelzelle und das ihr zugeordnete Nervterminale, registriert Druck- und Berührungsempfindung. Das rezeptive Feld ist klein und die mechanosensitive Afferenz vom langsam adaptierenden Typ. Der Merkelzellrezeptorkomplex ist von den vier mechanosensitiven Komplexen der Haut (Pacini-, Ruffini-, Meissner- Korpuskel und Merkelzellrezeptor) der einzige, der unbekapselt und intraepidermal liegt.

Die reife Merkelzelle hat einen Durchmesser von 9 - 16  $\mu\text{m}$ . Sie ist mit ihren Mikrovilli und multipel ausgebildeten Desmosomen zwischen den Keratinozyten in der Basalschicht der Epidermis verankert. An ihrer, der Dermis zugewandten Seite, inseriert das Nervterminale in einer kappenartigen Auftreibung. Diese Auftreibung ist etwa 10  $\mu\text{m}$  im Durchmesser und 1  $\mu\text{m}$  breit und enthält einige Mitochondrien, Vesikel und Glycogengranula (Abb.1).

Epidermis  
 Stratum papillare  
 Stratum reticulare  
 Schweißdrüsen  
 Nervenplexus

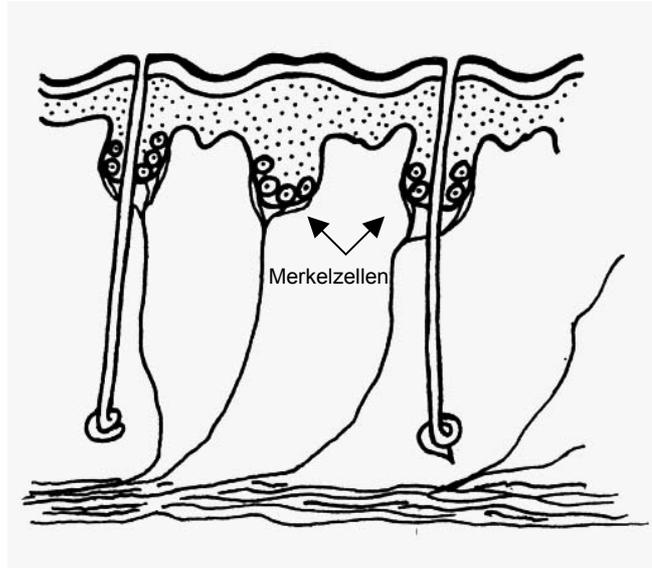


Abb.1: Schematische Zeichnung der intraepidermalen Merkelzellenverteilung (modifiziert nach Zelená, 1994)

Das Nervterminale zieht als unmyelinisierte Nervenfasern intraepidermal zur Merkelzelle. Die Faser ist ein Ast eines myelinisierten Axons, welches kurz unterhalb der epidermalen Basalschicht seine Myelinscheide verliert (Halata 1975, Halata 1993).

Neben den üblichen Zellorganellen enthält die Merkelzelle einige lose gebündelte Intermediärfilamente, gelegentlich Melanosome. Besonders auffällig sind die 80 - 120 nm großen sogenannten *dense core*-Vesikel, die sich in der basalen Exozytosezone zum dort angrenzenden Nervterminale befinden und der zur ihrer Herstellung erforderliche große Golgi-Apparat. Obwohl die Exozytose der *dense core*-Vesikel nur in wenigen Fällen beobachtet werden konnte, besitzt die Merkelzelle alle Eigenschaften einer neurosekretorischen Zelle (Hartschuh et al. 1986).

Die Intermediärfilamente der Merkelzellen enthalten Zytokeratine, die sich von denen der benachbarten Keratinozyten unterscheiden (Moll et al. 1984, Narisawa und Hashimoto 1991).

Mit Hilfe von, gegen diese Cytokeratine gerichtete, Antikörper kann man Merkelzellen in der Haut immunhistochemisch sichtbar machen. Das Cytokeratin 20 (CK 20), durch Moll et al. (1990) als Protein IT und Mitglied der Typ-I-Cytokeratine identifiziert, ist zusammen mit den Cytokeratinen 8, 18 und 19 an der Bildung des Intermediärfilament-Cytoskeletts beteiligt und kann durch spezifische Antikörper im Zytoplasma als

fibrilläre Struktur in Immunfluoreszenz- und Immunperoxidase-Mikroskopie sichtbar gemacht werden (Moll et al. 1990).

Des Weiteren besteht die Möglichkeit, Merkelzellen durch intrazelluläre Akkumulation des Vitalfarbstoffes Quinacrin in der Epidermis darzustellen. In vorangegangenen Experimenten konnten auf diesem Weg erfolgreich Merkelzellen in isolierter Epidermis erfasst und quantifiziert werden (Nurse et al. 1993, Nurse et al. 1984a, Kinkelin et al. 1999).

Zudem enthält die Merkelzelle eine große Anzahl von bioaktiven Substanzen, wie vasoaktives intestinales Polypeptid (VIP), Calcitonin-gene-related peptide (CGRP), neuron-spezifische Enolase (NSE), Substanz-P-, Serotonin- und Protein-Genprodukt 9.5-Immunreaktivität. Diese Substanzen werden nicht nur in den synaptischen Spalt zum Nervterminale, sondern auch in die Umgebung abgegeben, so dass der Merkelzelle parakrine Funktionen zugesprochen werden, mit denen sie modulierenden Einfluss auf ihre sensible Nervenfasern und auf angrenzende Zellen hat (Zelená 1994).

### **3. Merkelzellentwicklung und Merkelzellinnervation**

Die Entwicklung der Merkelzelle wird nicht durch Innervation induziert, da die Merkelzellen sich vor Ankunft des Nervterminals entwickeln. Das erste Erscheinen der Merkelzelle in der Haarscheibe der Ratte erfolgt 16.5 - 17 Tage post gestationem (p.g.), die Innervation 19 Tage p.g. (English et al. 1980). In den Tastscheiben der Fußballen der Ratte treten die Merkelzellen erstmals 20 Tage p.g. und die Innervation kurz postnatal auf (Ochiai und Suzuki 1981). Die Merkelzellen der verschiedenen Tasteinheiten multiplizieren sich im Laufe der Wachstumsphase des Tieres, während die bei Geburt angelegte Anzahl an Tasteinheiten sich kaum noch verändert.

Die Merkelzellverteilung in unbehaarter und behaarter Haut von Säugern ist unterschiedlich. Am häufigsten wurden Ratten und Katzen untersucht. In der behaarten Haut von Ratten sind die Merkelzellen zu ovalären Gebilden zusammengefasst, genannt "touch domes" (Iggo 1974) oder "Haarscheiben" (English 1977). Diese sind als, mit bloßem Auge zu erkennende, Hauterhebungen zu identifizieren und mit einem Tylotrichhaar vergesellschaftet (Nurse und Diamond 1984). Jede Haarscheibe wird von

den Ästen einer myelinisierten Nervenfasern innerviert. Die Haarscheiben sind in der Basalschicht der Epidermis lokalisiert und parallel zur deren Oberfläche ausgerichtet. Sie erscheinen leicht eleviert, weil die Epidermis über ihnen zwei Lagen dicker als die der Umgebung ist (English 1977).

Die Haarscheibendichte in behaarter Haut ist mit 1.7 Haarscheiben pro  $\text{mm}^2$  in Rückenhaut und 0.8 Haarscheiben pro  $\text{mm}^2$  in Bauchhaut von 20 - 21 Tage p.g. alten Rattenfoeten initial hoch (Nurse und Diamond 1984). Während des anschließenden Wachstums, bei dem sich die behaarte Haut vergrößert, nimmt die Dichte der Haarscheiben-Werte von erwachsenen Tieren ab (Nurse und Diamond 1984), da die Haarscheiben langsamer wachsen als die übrige Haut. In der Rückenhaut von Ratten nimmt der Durchmesser der Haarscheiben von etwa  $100\ \mu\text{m}$  am Tag 1 auf  $250\ \mu\text{m}$  in erwachsenen Tieren zu. Begleitet wird die Vergrößerung des Durchmessers von einer Zunahme der mittleren Merkelzellzahl pro Haarscheibe von circa 30 am Tag 1 auf 90 Merkelzellen im zweiten Monat nach Geburt, wenn die Haarscheibenentwicklung abgeschlossen ist (Nurse and Diamond 1984). Es wurde eine große Variabilität in Größe und Merkelzellanzahl der Haarscheiben zwischen sich noch in Entwicklung befindenden und schon ausgereiften Haarscheiben gefunden. In neugeborenen Ratten fand man kleine Haarscheiben von  $50\ \mu\text{m}$  Durchmesser mit wenigen Merkelzellen und große Haarscheiben von  $150\ \mu\text{m}$  Durchmesser mit 70 Merkelzellen. Die Differenz in Größe und Merkelzellgehalt zwischen kleinen und großen Haarscheiben nimmt in der weiteren Entwicklung zu, ist in adulten Tieren größer als in neonatalen (Nurse und Diamond 1984).

In der unbehaarten Haut liegen die Merkelzellen einzeln vorwiegend in der Basalschicht der Reteleisten der Epidermis (Halata 1975, Halata 1993). Sie befinden sich nicht immer an der Basalmembran, aber mit ihrem sensiblen Nervterminale zwischen den tiefen epidermalen Zellen. Im Gegensatz zu den Haarscheiben ist die Epidermis über ihnen nicht verbreitert, so dass sie mit bloßem Auge nicht sichtbar sind. In den Fußballen der Ratte formieren sich die Merkelzellen zu diskontinuierlichen Bändern, variabel in Größe und Merkelzellzahl von wenigen bis zu 30 Merkelzellen (Nurse et al. 1983). Die Innervation der Merkelzellen in der unbehaarten Haut erfolgt, wie die der Haarscheiben, durch Äste großer myelinisierter A $\beta$ -Fasern.

In unbehaarter Haut der Ratte nimmt die totale Anzahl an Merkelzellen im kleinsten Fußballen von etwa 100 in neugeborenen Tieren auf 2200 in 3 - 4 Wochen alten Tieren zu. Danach nimmt dieser Gehalt wieder auf etwa 1300 Merkelzellen ab (Mills et al. 1989).

Inwieweit die Innervation für die Entwicklung und den Fortbestand ihrer Population verantwortlich ist, besonders im Bezug auf Krankheitsgeschehnisse am peripheren Nervensystem, bedarf es geeigneter Verfahren, die die Innervation in der Peripherie erschöpflich darstellen. Eine exzellente Methode zur einfachen und wiederholten Erfassung und Quantifizierung der epidermalen und dermalen Verteilung von Nervenfasern ist der Einsatz des neuronenspezifischen Markers PGP 9.5 (Wang et al. 1990). PGP 9.5, eine Ubiquitin carboxyterminale Hydrolase (Wilkinson et al. 1989), ist im ZNS und PNS (Thompson et al. 1983), in der Retina (Osborne und Neuhoff 1985) und in Zellen des diffusen neuroendokrinen Systems (DNES) (Thompson et al. 1983) weit verbreitet. Es ist ein großer Proteinbestandteil des Zytoplasmas in allen afferenten und efferenten Nervenzellen, dessen Verteilungsmuster weitgehend der neuronenspezifischen Enolase entspricht. Durch den Einsatz von Antikörpern gegen PGP 9.5 können immunreaktive Nervenfasern in der Epidermis und Dermis, in Meissner-Korpuskeln, an innervierten Merkelzellen, an Schweißdrüsen und Haarfollikeln und um Blutgefäße sichtbar gemacht werden (McCarthy et al. 1995).

#### **4. Neurotrophine und epidermale Innervation**

Der Nervenwachstumsfaktor (NGF) und das Neurotrophin 3 (NT-3) sind als Neurotrophine Mitglieder einer Familie von strukturell und funktionell verwandter Proteine zu der bei den Säugetieren noch der brain-derived neurotrophic factor (BDNF) und das Neurotrophin 4 (NT-4), auch Neurotrophin 4/5 (NT-4/5) genannt, gehören (Snider 1994). Die strukturell ähnlichen Proteine Neurotrophin 6 (NT-6) (Götz et al. 1994) und Neurotrophin 7 (NT-7) (Nilsson et al. 1998, Lai 1998) wurden bisher nicht bei Mammaliern, sondern nur bei Fischen nachgewiesen.

Neurotrophine entfalten ihre trophische Funktion über eine rezeptorvermittelte Aufnahme und ihrem nachfolgenden retrograden Transport zum Neuronensoma

(Thoenen et al. 1987) und können dadurch die Genexpression und die Synthese von Neurotransmittern und Neuropeptiden regulieren (Lindsay und Harmar 1989, Verge et al. 1995). Die spezifischen Rezeptoren sind Transmembranproteine, zum einen p75-Rezeptoren (Chao et al. 1986), an die alle Neurotrophine binden können und zum anderen Tyrosinkinase (trk)-Rezeptoren (Barbacid 1994), an deren Subtyp trkA NGF (Klein et al. 1991a), trkB BDNF und NT-4/5 (Ip et al. 1992) und trkC NT-3 (Lamballe et al. 1991) bindet. Die Haut, die das Zielgebiet sensorischer und sympathischer Innervation darstellt, bildet limitierte Mengen von NGF, NT-3, BDNF und NT-4/5 (Buchman und Davies 1993) und hat somit regulierenden Einfluss auf das neuronale Überleben, die Innervationsdichte und das Innervationsmuster.

NGF fördert das Überleben sensorischer und sympathischer Neurone während der embryonalen und frühen postnatalen Periode (Buchman und Davies 1993). In dieser Zeit schützt NGF die Neurone vor dem einsetzenden programmierten Zelltod (Buchman und Davies 1993), fördert das Wachstum von Axonen und Dendriten und reguliert über den Eingriff in die Enzymsynthese die Produktion von Neurotransmittern und Neuropeptiden (Snider, 1994). In NGF- und trkA-defizienten Tieren konnte ein dramatischer Verlust an Neuronenpopulationen der Spinalganglien und des Trigeminalganglion zum Zeitpunkt der Geburt und eine völlige Abwesenheit sympathischer Ganglien im Alter von 10 Tagen festgestellt werden (Snider, 1994). Der neuronale Verlust in den Spinalganglien betraf vorwiegend kleine peptiderge Neurone mit nozizeptiver und thermischer Funktion, weshalb eine NGF-Abhängigkeit ihrer Entwicklung postuliert wurde (Snider 1994). Diese Annahme wurde unterstützt, da man in NGF-überexprimierenden Tieren eine starke Hyperalgesie auf mechanische Stimuli beobachten konnte (Davies 1993).

NGF wird durch das Zielgebiet der NGF abhängigen Neurone gebildet (Buchman und Davies 1993). Dort beginnt die Synthese von NGF mit der Ankunft der ersten Axone und steigt mit zunehmender Innervationsdichte an (Buchman und Davies 1993). Diese Beobachtungen schliessen neben einer trophischen Funktion von NGF, wie Überlebensförderung, eine tropische Funktion, wie Richtungslenkung des Axonwachstums, nicht aus (Eide et al. 1993). In adulten und embryonalen Ratten korrelieren die Spiegel an NGF und NGF mRNA des Zielgewebes mit der Innervationsdichte (Haper und Davies 1990). In der Haut wird der Hauptanteil des NGF

von Keratinozyten und Merkelzellen gebildet. Man konnte eine Immunreaktivität in der verdickten Epidermis über den Haarscheiben in Ratten ermitteln, die strikt auf Keratinozyten beschränkt war. Merkelzellen in diesen Haarscheiben zeigten p75-Rezeptoraktivität (English et al. 1994). Eine Beeinflussung der Entwicklung kutaner Nerven in der menschlichen Haut durch dermale Merkelzellen wurde festgestellt (Narisawa und Hashimoto 1991). In der 15. Fetalwoche beginnt ein Teil epidermaler Merkelzellen in die Dermis abzuwandern und NGF- Rezeptoren ungeklärter Spezifität auszuprägen, während kutane Nerven den subepidermalen Nervenplexus formieren. Sobald der Nervenplexus ab der 23. Fetalwoche gut entwickelt ist, kann man einen Rückgang der dermalen Merkelzellen beobachten. Man geht davon aus, dass die den NGF-Rezeptor exprimierenden dermalen Merkelzellen den peripheren Nervenplexus anziehen, von dem Ausläufer epidermale und follikuläre Merkelzellen erreichen (Narisawa und Hashimoto 1991).

Auch NT-3 beeinflusst die Entwicklung sensorischer Neurone. Es konnte gezeigt werden, dass NT-3 für das Überleben des Hauptanteils sensorischer Neurone in den lumbalen Spinalganglien (Farinas et al. 1994, Enfors et al. 1994) in Mäusen verantwortlich ist.

In Experimenten mit NT-3-defizienten Mäusen konnte ein Verlust proprioceptiver Afferenzen (Kucera et al. 1995) und myelinisierter Axone im Saphenusnerv, ein Verlust von Merkelzellen und ein Untergang langsam adaptierender Mechanorezeptoren, festgestellt werden (Airaksinen et al. 1996).

Es wurde beobachtet, dass spezifische kutane Mechanorezeptoren, D- Haarrezeptoren ( $A\delta$ -Afferenzen) und langsam adaptierende Mechanorezeptoren Typ I (SAI;  $A\beta$ -Afferenzen), erst postnatal nach der Innervation des peripheren Zielgebiets in NT-3-defizienten Mäusemutanten NT-3-abhängig werden (Airaksinen et al. 1996).

Merkelzellen, die das Endorgan der SAI-Afferenzen bilden, zeigten in NT-3-homozygot und heterozygot-defizienten Mäusen initial am 2. Tag postpartal noch eine normale Merkelzellanzahl und Innervation, während man in 14 Tage alten NT-3-heterozygoten Tieren einen Verlust von 50% der Merkelzellen im Vergleich zu ihren Wildtyp-Geschwistern beobachten konnte. In den am 14. Tag noch lebensfähigen homozygoten NT-3-Mäusen konnten nur vereinzelt Merkelzellen identifiziert werden (Airaksinen et al. 1996). Außerdem konnte eine signifikante Erniedrigung der Merkelzellen in den

Haarscheiben der behaarten Haut festgestellt werden. Dieser sichtbare Verlust an Merkelzellen und ihrer innervierenden SAI-Afferenz konnte auch in unbehaarter Haut der Fußballen beobachtet werden.

Diese Ergebnisse werden durch Experimente an Mausmutanten gestützt (Krimm et al. 1999), die in basalen Keratinozyten NT-3 überexprimieren, aber durch Fehlen eines NT-3-Allel NT-3-heterozygot-defizient sind (K14-NT3/NT3+/-). Diese Mausmutanten wurden mit NT-3-heterozygot-defizienten Tieren (NT3+/-) und NT-3-überexprimierenden Tieren (K14-NT3) verglichen. Übereinstimmend mit vorangegangenen Experimenten wurde ein Verlust von 63% Merkelzellen, 67% Haarscheiben und ihrer SAI-Afferenz in NT3+/- Tieren festgestellt (Krimm et al. 1999). Außerdem konnte man beobachten, dass die Überexpression von NT-3 in der Haut von NT-3-heterozygot-defizienten Mäusen den Verlust großer Mengen an kutanen Nervenfasern, Merkelzellen und Haarscheiben, die in NT3-heterozygoten-Tieren zugrunde gehen, verhindert (Krimm et al. 1999).

In Experimenten mit NT-3-überexprimierenden Mäusen (Albers et al. 1996) konnte gezeigt werden, dass der erhöhte NT-3-Gehalt eine Hypertrophie der Innervation des peripheren Nervensystems induziert. So wurde eine Zunahme der epidermalen und dermalen Innervationsdichte in Fußballen und Rückenhaut, eine Zunahme der trkC-exprimierenden Neurone, eine Vergrößerung der Haarscheiben durch Zunahme der Merkelzellanzahl pro Haarscheibe und eine Zunahme der Anzahl der durch SAI-Afferenzen innervierten Merkelzellen festgestellt (Albers et al. 1996).

## **5. Hereditäre motorisch-sensorische Neuropathien, ihre Klassifikation und identifizierten Gendefekte**

Die Mehrzahl der erblichen Neuropathien werden nach ihren Erstbeschreibern, den französischen Neurologen Charcot und Marie und ihrem Englischen Kollegen Tooth als Charcot-Marie-Tooth (CMT)-Neuropathien benannt. 1886 wurden durch diese Forscher erstmals Symptome hereditärer peripherer Neuropathien beschrieben und das `Syndrom der peronealen Muskelatrophie` definiert (Charcot und Marie 1886).

1968 erweiterten Dyck und Lambert die ursprüngliche Klassifikation der hereditären neuropathischen Syndrome und führten den Begriff der `hereditären motorisch-sensorischen Neuropathien` (HMSN) ein. Auch ist die Einteilung hereditärer Neuropathien nach der CMT-Klassifikation üblich. Die HMSN- und CMT-Klassifikation sind weitgehend überlappend und kompatibel, wobei die HMSN-Klassifikation vorwiegend im amerikanischen Raum und die CMT-Klassifikation eher in Europa verwendet wird.

Zur Gruppe der peripheren Neuropathien gehört neben der CMT- Erkrankung auch das Déjérine-Sottas-Syndrom, die hereditäre Neuropathie mit Neigung zu Druckpareisen und die congenitale Hypomyelinisierung.

Bislang wurden die hereditären Neuropathien anhand der Erfassung des klinischen Erscheinungsbildes, kombiniert mit der Untersuchung der Nervenübertragung und Nervenleitgeschwindigkeit, den histopathologischen Veränderungen an peripheren Nerven sowie dem Vererbungsmodus voneinander unterschieden.

Die hypertrophe Charcot-Marie-Tooth-Krankheit (CMT 1) ist die häufigste der hereditären peripheren Neuropathien und ist mit einer erniedrigten Nervenleitgeschwindigkeit verbunden (Dyck et al. 1993).

Erste Krankheitserscheinungen der CMT 1 treten häufig erst zwischen dem ersten und zweiten Lebensjahrzehnt auf, seltener früher. Die Krankheitsausprägungen variieren zwischen Familienmitgliedern. Es wird ein chronischer Verlauf über Jahrzehnte beobachtet. Das klinische Bild der CMT 1 ist vor allem durch sensible Reizerscheinungen und Ausfallsymptome, symmetrisch peripheren Lähmungen und trophischen Störungen gekennzeichnet. Bei den Erkrankten treten distale Parästhesien, strumpf- oder handschuhförmige Empfindungsstörungen für alle Qualitäten, frühe Lage- und Vibrationsempfindungsstörung, faszikuläre Zuckungen der distalen Muskulatur, Muskelatrophie mit Hand- und Fußdeformität bei gut erhaltener proximaler Muskulatur auf. Weiterhin kann man eine Zyanose der Haut an den distalen Extremitäten mit umschriebenen Ödemen, Nagelwachstumsstörungen, trophische Ulcera beobachten. Histologische Befunde an peripheren Nerven zeigen segmentale Demyelinisierungen und hypertrophe Remyelinisierungen mit Zwiebel-schalenformationen, die aus proliferierenden überzähligen Schwannzellen bestehen. Im weiteren Verlauf der Erkrankung kommt es zur axonalen Degeneration mit einer

Verminderung der dick myelinisierten Axone. Im Allgemeinen wird der Verlauf der Krankheit als gutartig bezeichnet, da der überwiegende Teil der Betroffenen bis ins hohe Lebensalter leistungsfähig bleibt.

Das klinische und elektrophysiologische Erscheinungsbild der X-chromosomal gebundenen Form der CMT- Krankheit (CMTX) ist vergleichbar mit dem der CMT1. Männliche Individuen sind bei der CMTX jedoch schwerer betroffen (Warner et al. 1999).

Die CMT 2, die auch als axonale Charcot-Marie-Tooth-Krankheit bezeichnet wird, ist seltener und ihre ersten Symptome treten etwa zehn Jahre später auf als die der CMT1. Von der klinischen Symptomatik ist sie der CMT1 sehr ähnlich, zeigt jedoch eine geringer verminderte Nervenleitgeschwindigkeit (NLG). Histopathologisch steht eine axonale Degeneration mit sekundärer Entmarkung im Vordergrund (Warner et al. 1999).

Die Déjérine-Sottas-Krankheit, als seltenere und schwer verlaufende Neuropathie, wurde erstmals von ihren Namensgebern Déjérine und Sottas 1893 beschrieben und geht mit schweren De- und Hypomyelinisierung peripherer Nerven, stark erniedrigter NLG von unter 10 m/s und peripherer Nervhypertrophie einher (Dyck et al. 1968, Dyck 1975). Auffällig werden die Erkrankten in frühester Kindheit mit stark verzögerter motorischer Entwicklung (Harding 1995).

Die congenitale Hypomyelinisierung ist durch infantile Hypotonie, bedingt durch distale Muskelschwäche, Areflexie und sehr stark erniedrigte Nervenleitgeschwindigkeiten (<10 m/s), charakterisiert. Mit periodischen Episoden von Muskelschwäche und Paresen nach relativ schwacher Kompression der peripheren Nerven unterscheidet sich die klinische Manifestation der HNPP stark von den CMT-Erkrankungen (Warner et al. 1999).

Die meisten Patienten der CMT-Krankheit zeigen einen autosomal-dominanten Erbgang gebunden an Chromosom 17 (CMT1A) oder seltener an Chromosom 1 ( CMT1B) (Dyck et al. 1993). Familien mit autosomal-dominantem Erbgang, die weder mit Chromosom 17 noch Chromosom 1 assoziiert sind, werden als CMT1C zusammengefasst (Warner et al. 1999). Die CMT2 wird auch autosomal-dominant vererbt, gekoppelt an Chromosom 1 (1p35-p36; CMT2A) (Ben Othmane et al. 1993),

Chromosom 3 (3q13-q22; CMT2B) (Kwon et al. 1995) und Chromosom 7 (7p14; CMT2D) (Ionasescu et al. 1996, De Jonghe et al. 1997, Warner et al. 1999).

Kürzlich wurden neben den bekannten Mutationen im peripheren Myelinprotein 22 (PMP22), im peripheren Myelinprotein P0 (myelin protein zero; MPZ), im gap-junction-Tunnelprotein Connexin 32 (Cx32) und im early-growth-response-2-Zinkfinger Protein (EGR2), die für die meisten peripheren Neuropathien verantwortlich sind, weitere Gene identifiziert, deren Mutationen mit verschiedenen hereditären, rezessiv vererbten CMT-Erkrankungen oder verwandten Neuropathien einhergehen (siehe Abb.2). Dadurch wurde es möglich die verschiedenen Erscheinungsformen hereditärer Neuropathien präziser voneinander zu unterscheiden.

<i>Gene</i>	<i>Genprodukte</i>	<i>Mutationen</i>	<i>Erkrankungen</i>
<b>PMP22</b>	Myelinprotein	Duplikation Punktmutation Deletion	CMT1A CMT1A, DSS HNPP
<b>MPZ</b>	Myelinprotein, Adhesionsmolekül	Punktmutation	CMT1B, DSS, CH
<b>Cx32</b>	Myelinprotein, Tunnelprotein	Punktmutation	CMTX
<b>EGR2</b>	Transkriptionsfaktor	Punktmutation	CMT1D, DSS, CH
MTMR2	Dual-spezifische Phosphatase	Punktmutation	CMT4B
NDRG1	Putatives intrazell. Signalmolekül	Punktmutation	HMSN-LOM
NTRK1	Rezeptormolekül	Punktmutation	CIPA
PRX	Cytoskelettelement d. Schwanzzelle	Punktmutation	CMT4F
GIG	Ubiquitäres Cytoskelettelement	Punktmutation	Giant axonal neuropathy
NEFL	Neurofilament	Punktmutation	CMT2 + Hyperkeratosis

*Abb.2: Derzeit bekannte Kandidaten-Gene für hereditäre Neuropathien. Modifiziert nach Young and Suter, 2001. Myotubularin 2 (MTMR2), N-myc downstream regulated gene 1 (NDRG1), Periaxin (PRX), Neurofilament light chain (NEFL), Gigaxonin (GIG), NGF receptor tyrosine kinase A (NTRK1), congenital insensitivity with anhidrosis (CIPA).*

Die meisten Fälle der CMT1A werden durch eine Duplikation des PMP22-Gens auf Chromosom 17p11a (Lupski et al. 1991, De Jonghe et al. 1997) verursacht, während die Deletion der selben Region auf diesem Chromosom zur HNPP führt.

Die CMT1B, sowie das DSS und CH werden durch allelische Punktmutationen im P0-Gen auf Chromosom 1q22-q23 (Hayasaka et al. 1993a, Hayasaka et al. 1993b, Warner et al. 1996, Bird et al. 1997, De Jonghe et al. 1997, Warner et al. 1999, Carenini und Martini 2000) hervorgerufen.

Die dominante Form der CMTX- Erkrankung wird durch Mutationen im Gen des gap-junction-Protein Connexin 32 auf Locus Xq13.1 (Bergoffen et al. 1993b) verursacht.

Mutationen im Zinkfinger-Transkriptionsfaktor EGR2 bewirken eine mildere Form der CMT-Krankheit, die als CMT1D bezeichnet wird (Warner et al. 1998, De Jonghe et al. 1999, Carenini und Martini 2000), aber auch schwere Formen der erblichen Neuropathien, wie das DSS und die CH (Warner et al. 1998, Carenini und Martini 2000). Als weitere Ursache des Déjérine-Sottas-Syndroms wird eine Punktmutation im PMP22-Gen auf Chromosom 17 (Roa et al. 1993a) verantwortlich gemacht.

## **6. P0, seine Funktion und das P0-defiziente Mausmodell**

Als Forschungsgegenstand dieser Studie dienten Mausmutanten, die genetisch homozygot P0 defizient sind und die klinisch die daraus resultierende CMT1B und Déjérine-Sottas-Neuropathie nachahmen. Deshalb wird im Folgenden besonders auf die Rolle des Myelinproteins Zero (MPZ, P0) im Myelinisierungsprozess und die pathophysiologischen Folgen seiner Genmutation im Tiermodell eingegangen.

P0 stellt mit 50 - 60% igem Anteil die Hauptkomponente des peripheren Myelins dar. Es hat ein Molekulargewicht von ca. 30 kDa und gehört zur Immunglobulin-superfamilie. Als integriertes Membranprotein wird es exklusiv von Schwanzzellen exprimiert (Lemke et al. 1988, Martini 1997). Das P0-Molekül ist in drei unterschiedliche Domänen unterteilt, die durch verschiedene Aufgaben an der Bildung und Formierung des Myelins beteiligt sind. So unterscheidet man eine extrazelluläre, eine membrandurchspannende und eine intrazelluläre Domäne (Lemke und Axel 1985). Die glykosylierte immunglobulinähnliche extrazelluläre Domäne ist verantwortlich für die Bildung von homophilen Bindungen und Adhäsionen mit anderen P0-Molekülen, um so zur Formation und Kompaktierung der intraperiodischen Linie beizutragen.

Die intrazelluläre Domäne interagiert mit Phospholipiden, um an der Formation der Major-dense-line mitzuwirken (Giese et al. 1992).

Um die genaue funktionellen Auswirkungen der Mutation im P0-Gen in vivo zu untersuchen, wurden P0-defiziente Mäuse generiert (Giese et al. 1992).

Besonders homozygote P0-defiziente Tiere zeigten schwerste Veränderungen ihrer Myelinisierung peripherer Nerven bereits 4 Tage nach Geburt. Es konnten Myelindekompaktierungen und eine hohe Anzahl an nicht myelinisierten Axonen identifiziert werden (Martini et al. 1995a). Mit fortschreitendem Alter der Tiere nahm die Zahl an Schwannzellen ohne Myelin und das Auftreten von Zwiebelshellformationen als Indikator massiver Demyelination zu (Martini et al. 1995a). Des Weiteren wurden Ischias- und Femoralnerven neun und zehn Wochen alter homozygot-P0-defizienter Tiere untersucht (Giese et al. 1992). Man identifizierte Axone, um die sich die Myelinscheide in wenigeren Lagen und in stärker verminderter Kompaktierung legte als in altersgleichen Wildtyp-Tieren. Kompaktierte Myelinbereiche waren nur auf kleine Abschnitte entlang des Axons beschränkt. Die Myelinscheide enthielt weite intraperiodische Spalten. Die Major-dense-line war oft wellenförmig konfiguriert. Es wurden Schwannzellen beobachtet, die myelinähnliche Zelltrümmer enthielten ähnlich denen, die in Schwannzellen durch Wallersche Degeneration nach Nervenverletzung zu finden sind. Zum anderen wurden Axone ganz ohne assoziierte Schwannzellen, nur bedeckt von einer Basallamina identifiziert und Axone mit Degenerationserscheinungen angetroffen, die von einer relativ dicken Myelinscheide umgeben waren. Zu dem beobachtete man in seltenen Fällen auch Schwannzellen bedeckt von einer Basallamina, aber ohne assoziiertes Axon und ohne Myelin. Aus diesen Ergebnissen leitete man ab, daß das P0-Molekül nicht nur in den Prozess der Myelinformation und -kompaktierung, in den Erhalt der Myelinscheide und der Myelindicke involviert ist, sondern auch für die axonale Integrität und das axonale Überleben mitverantwortlich ist (Giese et al. 1992, Martini und Schachner 1997). Eine Aussage über das Ausmaß der axonalen Degeneration konnte zu diesem Zeitpunkt noch nicht gemacht werden, weil bisher noch keine Quantifizierung der Axone in den P0-defizienten Tieren durchgeführt wurde.

## 7. Fragestellungen

- a. Da die Merkelzelle als ein Mechanorezeptor der Haut von einer myelinisierten Afferenz innerviert wird und eine Denervierung einen Untergang der Merkelzelle bewirkt, soll in der vorliegenden Arbeit die Merkelzellzahl in der Haut der P0-defizienten Mäuse, als sekundärer Indikator für die distale Innervation in diesen Tieren, untersucht werden.
- b. In P0-defizienten Tieren wurden neben der Alteration des Myelinproteins P0 Veränderungen des Genexpressionsmusters weiterer Schwannzellassoziierter Proteine beobachtet. Deshalb sollen mögliche Änderungen des Vorkommens von Neurotrophen untersucht werden, die für sekundäre Veränderungen der Innervation und des Merkelzellbestandes verantwortlich gemacht werden könnten.
- c. Durch Analyse der intraepidermalen Nervenfasern soll untersucht werden, ob das unmyelinisierte Nervenfasersystem der Haut bedingt durch zusätzliche Effekte des Gendefekts in den P0-defizienten Tieren betroffen ist.

## B. MATERIAL UND METHODEN

### 1. Versuchstiere

Für die Experimente standen Mäuse des Mischstamms SV129 und C57 BL/6 (Giese et al. 1992) mit homozygotem Defekt im P0- Gen (P0 -/-) und Wildtyp-Mäuse (P0 +/+) in folgenden Altersstufen zur Verfügung: 6 Wochen (n = 4), 4 Monate (n = 4), 6 Monate (n = 4). Zum Nachweis von Merkelzellen mit der Quinacrinmethode wurden ausschließlich 6 Monate alte Tiere (n = 4) eingesetzt.

### 2. Gewinnung des Gewebes

#### 2.1. Präparation der Fußballen für den Nachweis von Merkelzellen und Nervenfasern

Zur Gewinnung des Gewebes wurden die Tiere durch CO<sub>2</sub>-Inhalation getötet, in Bauchlage auf einer Wachsplatte fixiert, die Fußballen mit Schere und Pinzette an ihrer Basis abgetrennt und in auf Eis stehende Eppendorfcups überführt.



Abb.3: Laterale Fußballen 1, 2, 3, und Fußballen 4, 5, 6 eines 6 Monate alten Wildtyp-Tieres. Nomenklatur nach Mills et al. 1998.

Die Fußballen 3 und 4 (Fußballen 3, 4, siehe Abb.2) wurden sogleich in 4% Paraformaldehyd in 0,1 molaren Phosphatpuffer, pH 7,4 (PB), gebracht und bei 4°C für zwei Stunden darin belassen. Anschließend wurden diese Fußballen dreimal mit 10% Saccharose in PB gespült und bei 4°C über Nacht in der Saccharoselösung inkubiert.

Am darauf folgenden Tag wurden die, wie die übrigen am Vortag entnommenen unfixierten Fußballen (Fußballen 1, 2, 5, 6, siehe Abb.2), in Cryomold<sup>®</sup> Biopsy-Schälchen (Fa. Miles Inc., 10 mm x 10mm x 5mm) ausgerichtet, in Tissue Tek<sup>®</sup> (Fa. Sakura, USA) eingebettet und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Zur Aufbewahrung bis zum Gebrauch wurden die Fußballen bei -80°C gelagert.

Anschließend wurde das Gewebe im Kryostat (Jung Frigocut 2800 E, Fa. Leica) bei -15°C mit einem C-Messer (Fa. Leitz) mit einer Schnittdicke von 16 µm alternierend aufgeschnitten. Die einzelnen Schnitte wurden auf Super Frost<sup>®</sup> Plus Objektträger (Fa. Menzel, Deutschland) aufgezogen und bis zur Färbung bei -20°C tiefgefroren.

## **2.2. Präparation der Tierhaut für den Nachweis von NGF und NT-3**

Zum Nachweis von NGF und NT-3 wurde den Tieren die Rückenhaut von Schwanzansatz bis Nacken abpräpariert, ohne subfasziales Fettgewebe entnommen und in acht gleich große Gewebeteile zerschnitten. Jedes Gewebestück wurde in einen Eppendorfcup verbracht, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C bis zur weiteren Aufbereitung gelagert.

## **3. Histochemische Färbungen**

### **3.1. Färbung von Merkelzellen (CK 20) und Nervenfortsätzen (PGP 9.5)**

Die Objektträger mit den entsprechenden Fußballenschnitten für die Merkelzellfärbung wurden aus der -20°C-Kühlung entnommen, eine Stunde bei Raumtemperatur getrocknet, für zehn Minuten in absolutem Aceton bei -20°C fixiert, und anschließend für dreißig Minuten getrocknet.

Die in 4% Paraformaldehyd fixierten Schnitte der Fußballen für die Färbung mit PGP 9.5 wurden aus -20°C-Kühlung eine Stunde bei Raumtemperatur aufgetaut und getrocknet.

Zu Anfang beider Färbungen erfolgte eine Präinkubation durch Überschichten der Schnitte mit 10% NGS (Goat serum normal, Fa. DAKO A/S, Dänemark) in 0,1 molarem salinen Phosphatpuffer, (PBS, pH 7,4) für eine halbe Stunde bei Raumtemperatur. Nach Dekantieren des NGS wurde auf die Schnitte entweder der primäre Antikörper CK 20 (monoklonales Anti- Maus IgG Cytokeratin 20, Fa. Progen) in der Verdünnung 1:100 in 1% NGS (10ml 1% NGS: 9 ml 0,1 molarem PBS, pH 7,4, 1ml 10% NGS, 20µl Triton-X 100 (Fa. Sigma) für die Merkelzellfärbung oder der polyklonale Antikörper gegen das polyklonale Genprodukt 9.5, PGP 9.5 (polyclonal rabbit anti human RA 95101, Fa. Paesel und Lorei, Deutschland) in der Verdünnung 1:800 in 1% NGS aufgetragen und bei 4°C über Nacht inkubiert.

Nach dreimaligem Waschen der Schnitte für je zehn Minuten in PBS wurde die endogene Gewebsperoxidase für zwanzig Minuten in einer Lösung (90 ml absoluter Methanol, 10 ml 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung, 1,625g Natriumazid) bei Raumtemperatur irreversibel blockiert. Wiederholtes Waschen der Schnitte mit PBS entfernte die Blockierlösung.

Dann wurde der sekundäre Antikörper, biotinyliertes Anti-Maus IgG (H+L)(Fa. Vector Laboratories, England) in der Verdünnung 1:100 in 1% NGS für die Merkelzellfärbung bzw. biotinylierter Anti-Rabbit-IgG (Fa. Vector Laboratories, England) in der Verdünnung 1:100 in 1% NGS aufgebracht und für fünfundvierzig Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Darauf schlossen sich wieder drei Waschvorgänge in PBS an.

Danach wurde die Schnitte mit dem tertiären Antikörper, Reagent A und Reagent B (Fa. Dako, Dänemark) nach der ABC-Methode, in der Verdünnung 1:100 in 1% NGS für dreißig Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Grundlage der ABC-Methode ist die Inkubation mit einem ungekoppelten ersten Antikörper und biotinylierten sekundären Antikörper und anschließende Exposition mit einem vorgefertigten makromolekularen Avidin-Biotin-Enzymkomplex.

Im Anschluss wurden die Merkelzellen in den Schnitten durch Inkubation für zehn Minuten bei Raumtemperatur mit 3,3'-Diaminobenzidinetetrahydrochlorid (DAB-Tablets je 10 mg, Fa. Kementec, Dänemark) sichtbar gemacht. Die Reaktion wurde mit Dekantieren des Diaminobenzidins und nachfolgendem Waschen für zehn Minuten in Aqua dest. gestoppt.

Die Schnitte wurden mit Mayers Hämalaun für dreißig Sekunden gegengefärbt und danach zehn Minuten lang unter fließendem Leitungswasser ausgewaschen. Anschließend wurden die Schnitte für je zwei Minuten durch die aufsteigende Alkoholreihe entwässert, um sie nachfolgend in Vitro-clud® (Fa. R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland) eindecken zu können.

Die Auswertung der Schnitte zur Ermittlung der Merkelzellanzahl erfolgte mikroskopisch am Lichtmikroskop (Fa. Zeiss, Deutschland) in 10facher und 40facher Vergrößerung. Zur Bestimmung der Länge der Basalmembran wurden die entsprechenden Schnitte über ein mit einer Camera (3 CCD Color Video Camera, Fa. Sony) gekoppeltes Mikroskop (Axiovert 100, Fa. Zeiss, Deutschland) in den Computer eingelesen und mit Hilfe des Scion Image-Programm (Fa. Scion Corporation, Maryland, USA) ausgewertet.

Die Auswertung der Schnitte zur Ermittlung der Nervenfasernzahl erfolgte mit Hilfe der Camera Lucida. Die Schnitte und die in ihnen angefärbten Nervenfasern wurden unter dem Mikroskop betrachtet. Das Linsensystem der Camera lucida projizierte das mikroskopische Bild des Schnittes auf eine seitliche Unterlage, so dass eine maßstabgetreue Abzeichnung des Schnittes und den in ihm befindlichen Nervenfasern auf Papier möglich wurde (Bennett et al. 1998).

Zur Bestimmung der Nervenfaser- und Basalmembranlänge wurden die angefertigten Zeichnungen via Flachbettscanner (Fa. Hewlett Packard) in den Computer eingelesen und mit dem Scion Image-Programm ausgewertet.

#### **4. Darstellung von Merkelzellen in Haarscheiben mit der Quinacrin-Methode**

Zur Darstellung der Merkelzellen in den Haarscheiben wurde der Vitalfarbstoff Quinacrin benutzt. Quinacrin markiert eindeutig Merkelzellen und wurde als Methode zur Darstellung und Erfassung von Merkelzellen in isolierter Epidermis erfolgreich in vorangegangenen Experimenten eingesetzt (Nurse et al. 1983, Nurse et al. 1994a, b).

Den Tieren wurde am Vortag Quinacrin-Lösung (0,2 ml/ 10g Körpergewicht) intraperitoneal injiziert. Die Quinacrin-Lösung bestand aus 15 mg/ Kg Quinacrin-Hydrochlorid (Fa. Sigma, Deutschland) in 0,9% NaCl. Etwa 18 Stunden post

injectionem erfolgte die Betäubung der Tiere durch intraperitoneale Injektion mit 0,1 ml/ 10g Körpergewicht eines Anästhetika-Analgetika-Gemisches aus Ketamin und Xylazin (100 mg/Kg Ketanest<sup>®</sup>, Fa. Parke-Davis GmbH, Berlin, Deutschland, 2,5 mg/Kg Rompun<sup>®</sup>, Fa. Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland).

Anschließend wurde die Behaarung der Rücken-, Bauch- und Fußhaut durch Rasieren und Depilieren mit Pilcacreme (Pilca<sup>®</sup>med, Fa. Asid Bonz, Deutschland) entfernt. Danach wurden die Haarscheiben, die sich als kleine, etwa 1 mm große Papeln der Haut darstellten, unter dem Präparationsmikroskop in 6,5facher Vergrößerung pro cm<sup>2</sup> ausgezählt (Kinkelin et al. 1999). Dann wurden die Tiere durch CO<sub>2</sub>-Gasinhalation in einem abgeschlossenen Glasbehälter getötet.

Die Präparation und Entnahme der Haut ohne subfasziales Fettgewebe erfolgte mit Schere und Pinzette. Die Haut wurde in etwa 1 bis 2 cm große quadratische Stücke zerteilt, auf Objektträger mit der Epidermisseite nach oben ausgerichtet und in Aquatex<sup>®</sup> (Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland) eingedeckt. Da Quinacrin als Fluoreszenzfarbstoff die Eigenschaft besitzt, in kürzester Zeit an Aktivität zu verlieren, wurden die Haarscheiben und Merkelzellen pro cm<sup>2</sup> Haut innerhalb der folgenden zwei Stunden unter dem Olympus Epifluoreszenzmikroskop (Axiophot, Fa. Olympus) mit FITC-Filter ausgewertet.

## **5. Immunologisch - enzymatische Bestimmung von Neurotrophinen**

Zum Nachweis des Gehaltes an NGF (Nerve Growth Factor) und NT-3 (Neurotrophin 3) in der Rückenhaut von Mäusen wurde das NGF und NT-3 Emax<sup>™</sup>Immunoassay System (Fa. Promega, USA) verwandt (Zettler et al. 1996, Okragly und Haak-Frendscho 1997). Prinzip dieser Teste ist die sensitive und spezifische Detektion von NGF bzw. NT-3 in einem Sandwich-ELISA.

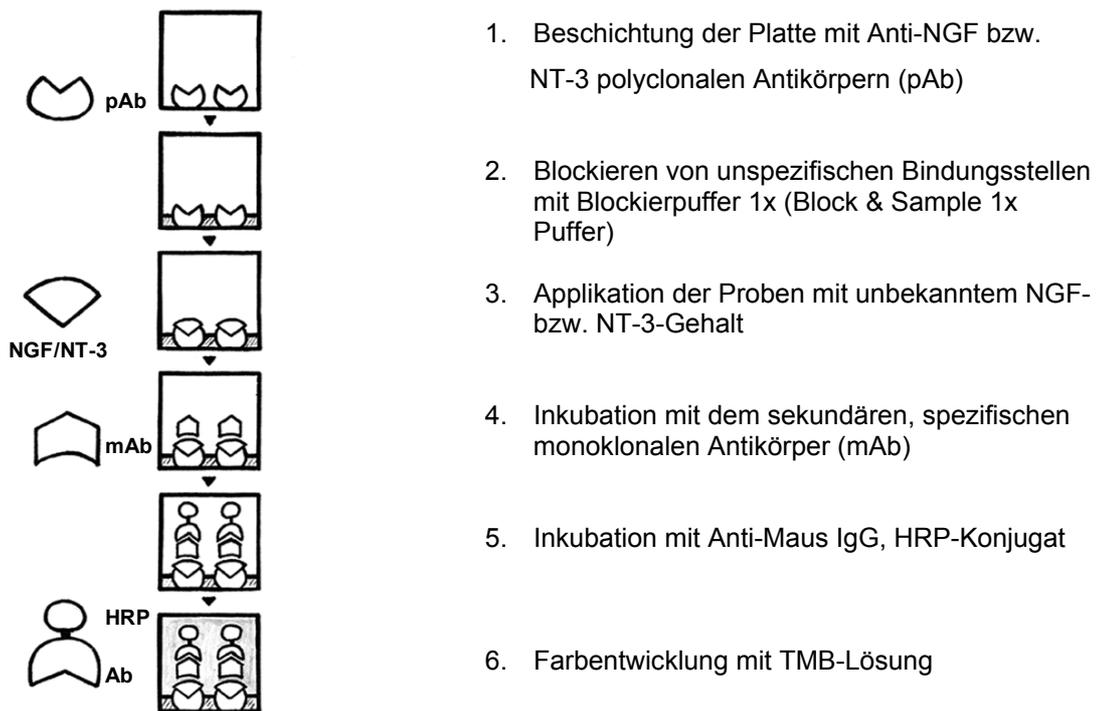


Abb.4: ELISA-Bindungsschema

Zunächst werden die Vertiefungen einer ELISA-Platte mit flachen Boden mit dem Anti-NGF bzw. NT-3 polyclonalen Antikörper (pAb) beschichtet, welcher gelöstes NGF bzw. NT-3 bindet. Unspezifische Bindungsstellen werden mit einem Blockierpuffer-1x (Block & Sample 1x Puffer) abgesättigt. Anschließend erfolgt ein Waschschriff mit TBST-Waschpuffer (Tris buffered sodium tween buffer: 20mM Tris - HCL, pH 7,6, 150 mM NaCl, 0,05% Tween<sup>®</sup>- 20). Nachfolgend werden die Proben mit unbekanntem NGF- bzw. NT-3-Gehalt aufgetragen. Das angelagerte NGF bzw. NT-3 wird durch einen sekundären spezifischen monoklonalen Antikörper (mAb) gebunden. Nach einem weiteren Waschschriff mit TBST-Waschpuffer wird die Menge an spezifisch gebundenem mAb durch ein spezie-spezifisches Antikörperkonjugat aus horseradish peroxidase (HRP) als tertiäres Reaktant als Sandwich-Komplex gebunden. Das ungebundene Antikörperkonjugat wird durch Waschen in TBST-Waschpuffer entfernt. Im Anschluss an eine Inkubation mit einem chromogenen Substrat 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) wird die Menge an spezifisch gebundenen NGF bzw. NT-3 indirekt durch die HRP-Konjugat-katalysierte Farbentwicklung von TMB gemessen. Die Menge an NGF bzw. NT-3 in den Proben ist proportional der entstandenen

Farbintensität in der gekoppelten Oxidation-Reduktionsreaktion und wird quantifiziert über eine im Test mitgeführte Standardkurve mit bekannten Mengen von NGF bzw. NT-3 (vgl. Abb.3).

Mit diesem Test kann eine Konzentration von NGF zwischen 7,8 - 500 pg/ ml und eine Konzentration von NT-3 zwischen 4,7 - 300 pg/ ml ermittelt werden (Zettler et al. 1996, Okragly und Haak-Frendscho 1997).

In einer Reihe von Vorversuchen unter Einsatz einer definierten Menge an NGF bzw. NT-3 wurde geklärt, in welchem Umfang die Immunassays sensitiv und spezifisch NGF bzw. NT-3 nachweisen. Erst nach Sicherung der Reliabilität und Validität der Teste wurden die Proben der entsprechenden Versuchstiere eingesetzt.

### **5.1. NGF- und NT-3 - Bestimmung**

Der NGF- und NT-3-ELISA verlief über drei Tage. Am ersten Tag erfolgte das Beschichten der ELISA-Platte (96 Vertiefungen/ 100µl, Nunc-Immuno™Plate, Fa. Nalge Nunc int., Dänemark) mit einer Multipipette (Fa. Eppendorf, Deutschland) mit je 100 µl NGF- bzw. NT-3-pAb Antikörper pro Vertiefung (10 µl Anti NGF- bzw. NT-3-pAb in 10 ml Carbonatpuffer, pH 9,7). Der Antikörper wurde für 16 Stunden bei 4°C über Nacht inkubiert und am folgenden Tag dekantiert und die Platte mehrmals vorsichtig mit TBST- Puffer gewaschen. Um Beschädigung und somit Lösung der Antikörper an der Wandung der Vertiefungen zu vermeiden, wurde ein manuelles Multiwaschsystem (Nunc-Immuno Wash 12, Fa. Nalge Nunc Int., Dänemark) eingesetzt.

Anschließend wurde mit 200µl/ Vertiefung Blockierpuffer-1x (8,6 ml Block & Sample 5x Puffer in 34,4 ml deionisiertem Aqua dest) aufgetragen und eine Stunde bei Raumtemperatur ohne Schütteln inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen.

In dieser Inkubationszeit erfolgte die Probenaufbereitung. Zunächst wurden die Hautstücke eingewogen und mit der 4fachen Menge ihres Gewichtes mit Extraktionspuffer versehen. Der Extraktionspuffer enthielt 0,4 M NaCl, 0,5 % BSA, 10mM EDTA, 0,05% Tween<sup>®</sup>-20 in 0,1 molaren salinen Phosphatpuffer, pH 7,4. Kurz

vor Gebrauch wurde 20µl/ml Aprotinin, 0,1 mM Benzethoniumchlorid, 0,1% PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid) (Protease-Inhibitoren) in 1 ml Ethanol gelöst, hinzugefügt (Woolf et al. 1996).

Dann wurden die Hautstücke mechanisch mit einer Schere zerkleinert und mit dem Homogenisator Turrax (IKA® Ultraturrax, Fa. Janke & Kunkl, Deutschland) homogenisiert. Die Proben wurden während des gesamten Vorgangs auf Eis gekühlt, da sich bei der Homogenisierung durch den Turrax eine Wärmeentstehung beobachten ließ. In dieser Art und Weise wurde alle Hautproben, die in dem jeweiligen Test zum Einsatz kamen, aufbereitet. Das Homogenisat der Hautproben wurde zur Klärung 20 Minuten bei 14.000 Umdrehungen/ Minute bei 4°C zentrifugiert. Zur Analyse wurde nach Zentrifugation der klare Überstand eingesetzt.

Nach dem einstündigen Blockieren, wurde die ELISA-Platte dekantiert und mit TBST-Waschpuffer gewaschen. Im Anschluss wurde zuerst die Standardkurve pipettiert und dann die Proben in der Verdünnung 1:16 in Blockierpuffer-1x aufgetragen. Danach wurde für sechs Stunden bei Raumtemperatur unter Schüttelung inkubiert. Durch nachfolgende Dekantierung und fünfmaliges Waschen mit TBST-Waschlösung wurde nichtgebundenes NGF aus dem Assay vollständig entfernt.

Es erfolgte die Applikation des zweiten Antikörpers durch Pipettieren von 100µl NGF- bzw. NT-3-mAb (2,5µl Anti NGF- bzw. NT-3-mAb in 10 ml Block & Sample 1x Puffer) pro Vertiefung und Inkubation für 16 Stunden ohne Schütteln bei 4°C.

Am dritten Tag wurde die ELISA-Platte wiederholt dekantiert, fünfmal in TBST-Waschpuffer gewaschen und das Antikörperkonjugat zugefügt. Es wurde 100µl HRP-Conjugat (5µl Anti-Rat-IgG HRP-Conjugat in 10 ml Block & Sample 1x Puffer) pro Vertiefung aufgetragen und zweieinhalb Stunden unter Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Eine Stunde vor Ablauf dieser Inkubationszeit wurde das Enzym-Substrat-Gemisch (5 ml Peroxidase-Substrat-Lösung, 5 ml TMB-Lösung) für die Farbreaktion hergestellt und bis zum Gebrauch abgedunkelt bei Raumtemperatur aufbewahrt. Nach mehrmaligem Waschen der ELISA-Platte mit TBST-Puffer wurde 100 µl des Enzym-Substrat-Gemisches pro Vertiefung aufgetragen, der NGF-ELISA sieben Minuten und der NT-3-ELISA dreizehn Minuten unter Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert und die Reaktion mit 100 µl/ Vertiefung 1M Phosphorsäure gestoppt.

Die spezifische Absorption wurde mit dem ELISA-Lesegerät (Titertek Multiskan® Plus MK2, Fa. Flow Laboratories, Deutschland) mit Filter 450 nm innerhalb einer Stunde bestimmt. Die Standardkurve und die NGF- bzw. NT-3-Konzentrationen wurden rechnerisch mit dem "EXCEL" ( Excel 97, Fa.Microsoft, USA)- und "ORIGIN" (Origin 5.0, Fa.Microcal Software Inc., Northampton, USA)- Programm ermittelt.

## **6. Auswertung**

Zur tabellarischen Darstellung gewonnener Daten diente die Software "EXCEL"(Excel 97, Fa.Microsoft, USA). Diese Daten wurden zur statistischen Auswertung mit dem "STATISTICA"-Programm (Statistica 5.1, Fa.StatSoft Inc., Tulsa, USA) bearbeitet und auf ihre Signifikanz geprüft. Als statistischer Test kam der ungepaarte t-Test nach Prüfung der Testvoraussetzungen zum Einsatz. Alle Werte wurden als Mittelwerte mit Standardfehler (SEM) angegeben. Die Ergebnisse bei Anwendung statistischer Testverfahren wurden als schwach signifikant, wenn  $p < 0,05$ , als signifikant, wenn  $p < 0,01$ , und hochsignifikant, wenn  $p < 0,001$  war, bezeichnet. Graphische Darstellungen der Ergebnisse wurden mit dem "ORIGIN"- (Origin 5.0, Fa.Microcal Software Inc., Northampton, USA) und "COREL DRAW"- (Corel Draw Version 8, Fa. Corel Corporation, USA) Programm bearbeitet.

## C. ERGEBNISSE

### 1. Merkelzell- und Nervenfasernachweis

#### 1.1. Qualitative Aspekte und methodisches Vorgehen bei der Quantifizierung

Um eine quantitative Aussage über Merkelzellen und Nervenfasern treffen zu können, wurden zur Auswertung nur Schnitte mit eindeutig dargestellten und identifizierbaren Merkelzellen sowie Nervenfasern eingesetzt.

Die Fußballen der einzelnen Tiere wurden komplett aufgeschnitten. Zur Vermeidung von späteren Doppelzählungen wurde eine alternierende Schneidetechnik bei der Herstellung der Gewebeschnitte angewandt. Im Mittel wurden von einem Fußballen 20 Schnitte gewonnen und in diesen die Merkelzellen durch die Färbung mit dem Antikörper gegen das Zytokeratin 20 (CK 20), welches selektiv in den Merkelzellen exprimiert wird, dargestellt (Moll et al. 1992). Die Merkelzellen präsentierten sich in mikroskopischer Betrachtung eindeutig durch das DAB-Reaktionsprodukt als braun angefärbte rundliche Gebilde, die entweder einzeln oder in Gruppen an der Basalmembran der Epidermis ortsständig waren (vgl. Abb.5a, 5b).

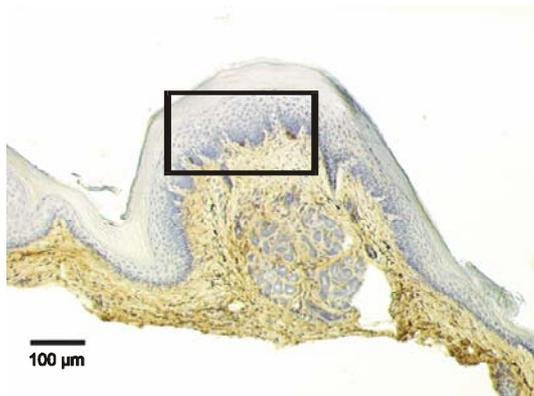


Abb. 5a: Schnitt durch den Fußballen in Moschonanale Waldmole-Tiere in 10-fache Vergrößerung.

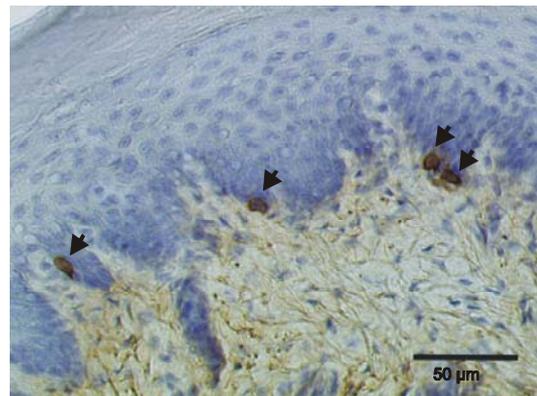


Abb. 5b: Schnitt durch den Fußballen in Moschonanale Waldmole-Tiere in 40-fache Vergrößerung.

Bei der anschließenden quantitativen Auswertung wurden die gefärbten Merkelzellen pro Schnitt ausgezählt und der entsprechende Schnitt über eine Kamera in den Computer eingelesen. Zu diesem Zeitpunkt konnte man bereits beobachten, dass die

Merkelzellichte in den P0-defizienten Tieren im Gegensatz zu den Wildtyp-Tieren mit fortschreitendem Alter abnahm. Die Länge der Basalmembran im Schnitt wurde bestimmt, in dem man mit dem Cursor im eingescannten Bild des Schnittes die Epidermis der Länge nach abfuhr. Die Merkelzellichte wurde als Mittelwert der Anzahl der Merkelzellen pro Millimeter Basalmembran (MC/mm  $\pm$  Standardfehler) angegeben.

Zur Nervenfaserbestimmung wurden jeweils drei Schnitte pro Fußballen eingesetzt. Die Nervenfasern wurden durch den Antikörper gegen das polyklonale Genprodukt 9.5 (PGP 9.5) spezifisch angefärbt (Bergmann et al. 1997) und konnten unter dem Mikroskop als schmale, braungefärbte Linien, die entweder die Basalmembran durchzogen oder in der Epidermis lagen, identifiziert werden (vgl. Abb.6a, 6b).



Abb 6a: S Schnitt durch den Fußballen eines 6 w alten Wildtyp Tieres in der 40 fah 100 größer Vergrößerung.

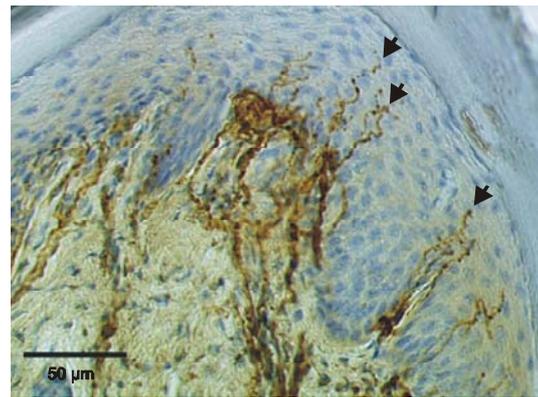
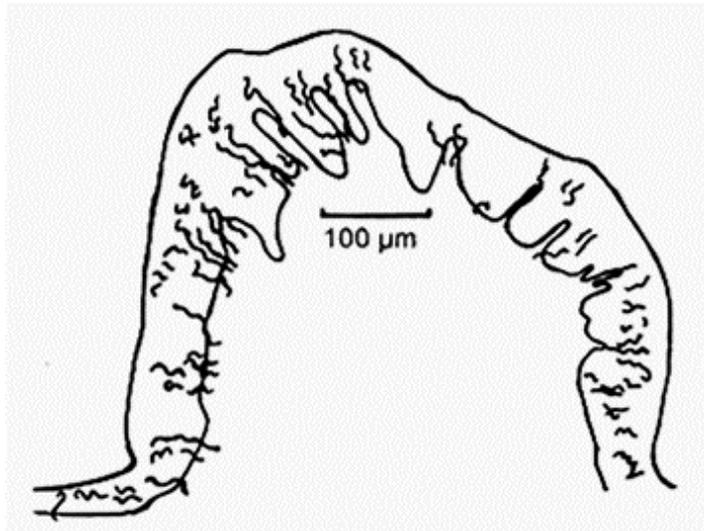


Abb 6b: S Schnitt durch den Fußballen eines 6 w alten Wildtyp Tieres in der 40 fah 40 größer Vergrößerung.

Damit man den Verlauf der Nervenfasern besser beobachten konnte, wurden die Schnitte zur Auswertung unter der Camera lucida betrachtet und abgezeichnet. Durch variable Fokussierung konnte die räumliche Betrachtung der Fasern im Schnitt in verschiedenen Ebenen und somit ein größerer intraepidermaler Verlauf der Fasern sichtbar gemacht werden. Bei der qualitativen Betrachtung der Schnitte ergab sich keine offensichtliche Veränderung der Nervenfaserverteilung in den Tieren mit oder ohne P0-Defekt in den verschiedenen Altersstufen.

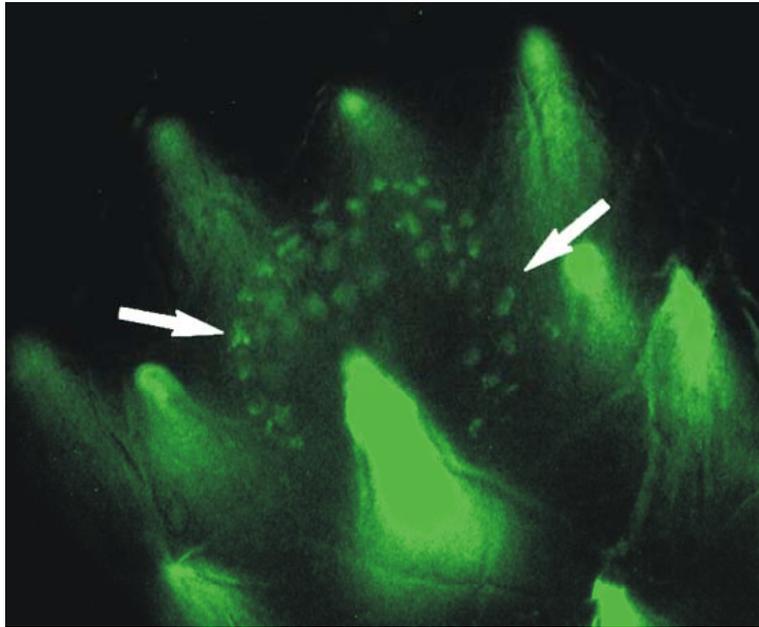
Anschließend wurden die Zeichnungen der Schnitte mit dem Scanner in den Computer eingelesen und mit Hilfe des Scion-Programms ausgewertet (vgl. Abb.7).



*Abb.7: Camera lucida-Zeichnung der Nervenfasern in einem Schnitt durch den Fußballen*

Dazu wurde mit dem Cursor die Länge der Epidermis abgefahren und die Anschnitte der Nervenfasern markiert. Die Länge der Epidermis und der Nervenfasern wurde vom Programm berechnet, so dass eine Quantifizierung der Nervenfasern möglich wurde. Die Nervenfaserdichte und die Nervenfasernlänge wurde als Mittelwert pro Quadratmillimeter Epidermis (NF-Dichte bzw. NF-Länge in  $\mu\text{m}/\text{mm}^2 \pm$  Standardfehler) angegeben. Die Nervenfasern, die von der Dermis in die Epidermis penetrierten, wurden als Mittelwert pro Millimeter Länge der Basalmembran (NF/mm  $\pm$  Standardfehler) angegeben.

Bei dem Nachweis der Haarscheiben und Merkelzellen in den mit Quinacrin gefärbten Gewebestücken wurde besonderes Augenmerk auf das Wildtyp-Tier gelegt, da dies gleichzeitig als Erfolgskontrolle (Positivkontrolle) der Quinacrinfärbung diente. Es wurde zügig mikroskopiert, um ein Verblässen der Strukturen durch irreversible Aktivitätsabnahme des Quinacrins im Gewebe bei Belichtung durch das einfallende Mikroskoplicht einzuschränken. Bei der Auswertung wurde die Umgebung von Haarschäften mit besonderer Aufmerksamkeit untersucht, da dort die Haarscheiben vorwiegend ortsständig waren. In 10facher Vergrößerung wurden die Haarscheiben für den Betrachter unter dem Mikroskop deutlich sichtbar. Pro Quadratzentimeter Haut wurden alle Quinacrin gefärbten Haarscheiben in mäanderförmiger Durchsicht unter dem Mikroskop bei 40facher Vergrößerung ausgezählt (vgl. Abb.8).



*Abb.8: Haarscheiben mit Quinacrin-gefärbten Merkelzellen in der Bauchhaut eines 6 Monate alten Wildtyp-Tieres in 20facher Vergrößerung.*

Man konnte schon in der qualitativen Betrachtung erkennen, dass in den P0-defizienten Tieren weniger Haarscheiben und ein geringerer Gehalt an Merkelzellen pro Haarscheibe auffiel. Außerdem fiel eine unterschiedliche Verteilung der Haarscheiben in den verschiedenen Hautregionen auf. Die Haarscheiben und Merkelzellen wurden quantitativ als Mittelwerte pro Quadratcentimeter Haut ( $\text{HS}/\text{cm}^2$  bzw.  $\text{MC}/\text{cm}^2 \pm$  Standardfehler) und Merkelzellen pro Haarscheibe ( $\text{MC}/\text{HS} \pm$  Standardfehler) angegeben.

## 2. Histochemischer Merkelzellnachweis und Nachweis von Haarscheiben und Merkelzellen nach der Quinacrinmethode

### 2. 1. Merkelzelldichte

Die quantitative Auswertung bestätigte die qualitativen Beobachtungen. Es wurde bei den Wildtyp-Tieren keine signifikante Veränderung der Merkelzelldichte mit zunehmendem Lebensalter festgestellt ( $p > 0,05$ , t-Test).

Die Merkelzelldichte schwankte zwischen  $1,8 \pm 0,4$  MC/mm Basalmembran bei den 6 Wochen alten und  $2,4 \pm 0,4$  MC/mm Basalmembran bei den 4 Monate alten Wildtyp-Tieren. Die 6 Monate alten Wildtyp-Tiere zeigten  $2,2 \pm 0,3$  MC/mm Basalmembran. Dagegen nahm die Merkelzelldichte in den P0-defizienten Tieren mit steigendem Lebensalter fortschreitend ab. Bei den 6 Wochen alten P0-defizienten Tieren konnten noch  $1,5 \pm 0,3$  MC/mm Basalmembran beobachtet werden. Die Merkelzelldichte in den 4 Monate alten P0-defizienten Tieren fiel signifikant ( $p < 0,01$ , t-Test) auf  $0,4 \pm 0,06$  MC/mm Basalmembran und in den 6 Monate alten P0-defizienten Tiere schwach signifikant auf  $0,6 \pm 0,14$  MC/mm Basalmembran ( $p < 0,04$ , t-Test) ab.

Im Vergleich der Merkelzelldichte zwischen Wildtyp- und P0-defizienten Tieren der jeweiligen Alterstufe konnte jeweils eine signifikante Abnahme der Merkelzelldichte zwischen 4 Monate alten und 6 Monate alten Wildtyp-Tieren und altersgleichen P0-defizienten Tieren ( $p < 0,01$ , t-Test) beobachtet werden (vgl. Abb.9).

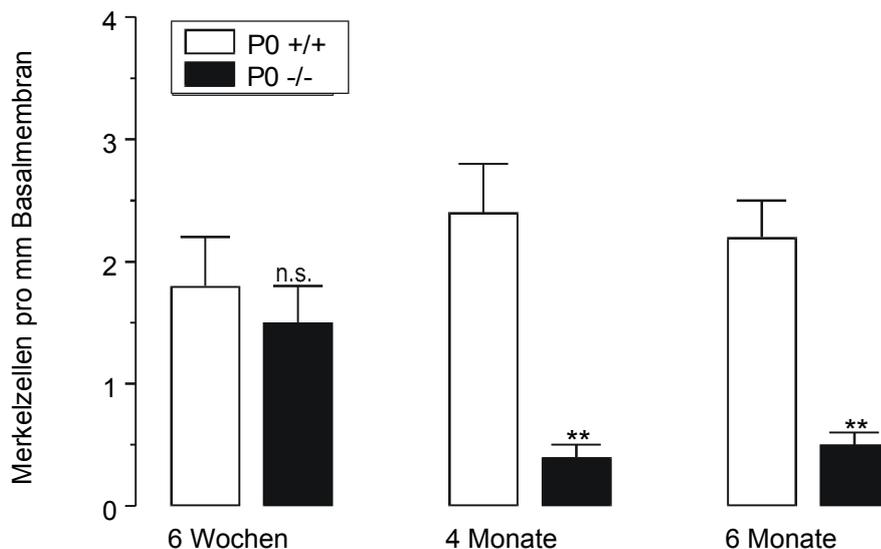


Abb.9: Merkelzellen in den Fußballen der P0-defizienten (P0 -/-) und Wildtyp-Tieren (P0+/+). \*\*,  $p < 0,01$ ; n.s., nicht signifikant.

## 2.2. Haarscheiben pro Quadratcentimeter Haut

Wie nach der qualitativen Auswertung erwartet, konnten zwar je nach Hautregion verschiedene Haarscheibendichten in den Wildtyp-Tieren beobachtet werden, die sich aber nicht signifikant voneinander unterschieden. Bei den Wildtyp-Tiere wurden  $16,5 \pm 2,2$  HS/cm<sup>2</sup> in der Rückenhaut,  $13,5 \pm 1,7$  HS/cm<sup>2</sup> in der Bauchhaut und  $13,8 \pm 2,8$  HS/cm<sup>2</sup> in der Fußhaut identifiziert.

Bei den P0-defizienten Tieren zeigte sich nicht nur eine unterschiedliche Haarscheibendichte in den verschiedenen Hautregionen, sondern auch ein extremer Verlust an Haarscheiben im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren. In der Rückenhaut der P0-defizienten Tiere befanden sich mit  $0,25 \pm 0,25$  HS/cm<sup>2</sup> signifikant ( $p < 0,01$ , t-Test) weniger Haarscheiben als in der Fußhaut, die  $5 \pm 1$  HS/cm<sup>2</sup> aufwies. Dagegen unterschieden sich die Haarscheibendichten weder zwischen Rückenhaut und Bauchhaut noch zwischen Bauchhaut und Fußhaut signifikant voneinander ( $p > 0,05$ , t-Test). In der Rückenhaut der P0-defizienten Tiere wurden hochsignifikant ( $p < 0,001$ , t-Test) weniger und in der Bauchhaut signifikant ( $p < 0,01$ , t-Test) weniger Haarscheiben pro cm<sup>2</sup> Haut als in der entsprechenden Haut der Wildtyp-Tiere gefunden (vgl. Abb.10).

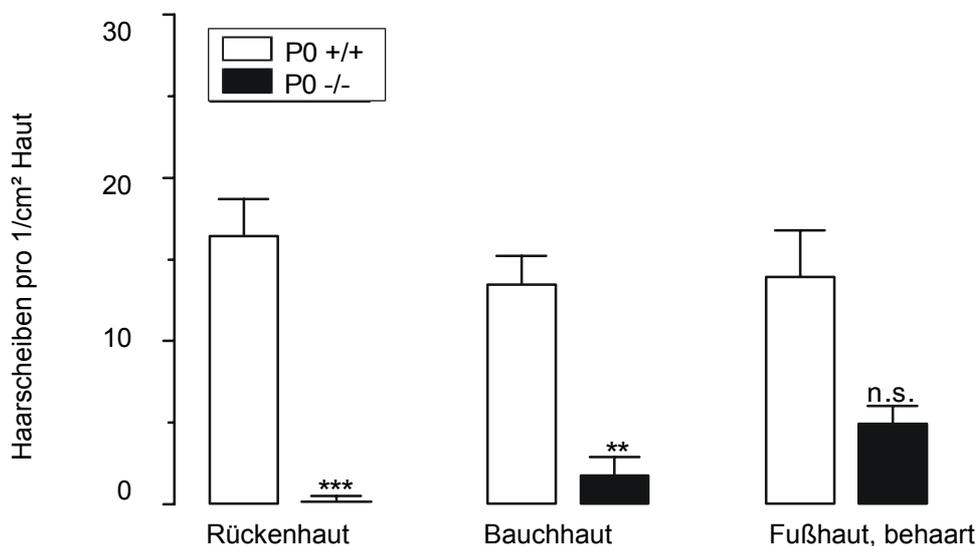


Abb.10: Haarscheibendichte in der Rückenhaut, Bauchhaut und behaarter Fußhaut von 6 Monate alten P0-defizienten (P0 -/-) und altersgleichen WildtypTieren (P0 +/+). \*\*\*,  $p < 0,001$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; n.s., nicht signifikant.

### 2.3. Merkelzellen pro Haarscheibe

Die Vermutung, dass nicht nur die Anzahl der Haarscheiben, sondern auch der Merkelzellgehalt in den Haarscheiben in den verschiedenen Hautregionen unterschiedlich und der Merkelzellgehalt in den Haarscheiben in den P0-defizienten Tieren geringer sei als in den Wildtyp-Tieren, konnte durch die quantitative Auswertung bestätigt werden.

Bei den Wildtyp-Tieren wurden in der Rückenhaut  $15 \pm 1,4$  MC/HS, in der Bauchhaut  $19 \pm 1,4$  MC/HS und in der Fußhaut  $14,5 \pm 2,5$  MC/HS gefunden, jedoch kein signifikanter Unterschied festgestellt ( $p > 0,05$ , t-Test). Der Merkelzellgehalt pro Haarscheibe der verschiedenen Hautregionen der P0-defizienten Tieren unterschied sich nicht signifikant voneinander ( $p > 0,05$ , t-Test). So wurden in der Rückenhaut der P0-defizienten Tiere  $2,3 \pm 2,3$  MC/HS, in der Bauchhaut  $6,3 \pm 2,5$  MC/HS und in der Fußhaut  $7,5 \pm 1,2$  MC/HS ermittelt. Es konnte im Vergleich zu den Wildtypen in der Rückenhaut und Bauchhaut der P0-defizienten Tiere signifikant weniger ( $p < 0,01$ , t-Test) und in der Fußhaut schwach signifikant weniger ( $p < 0,05$ , t-Test) Merkelzellen pro Haarscheibe gefunden werden (vgl. Abb.11).

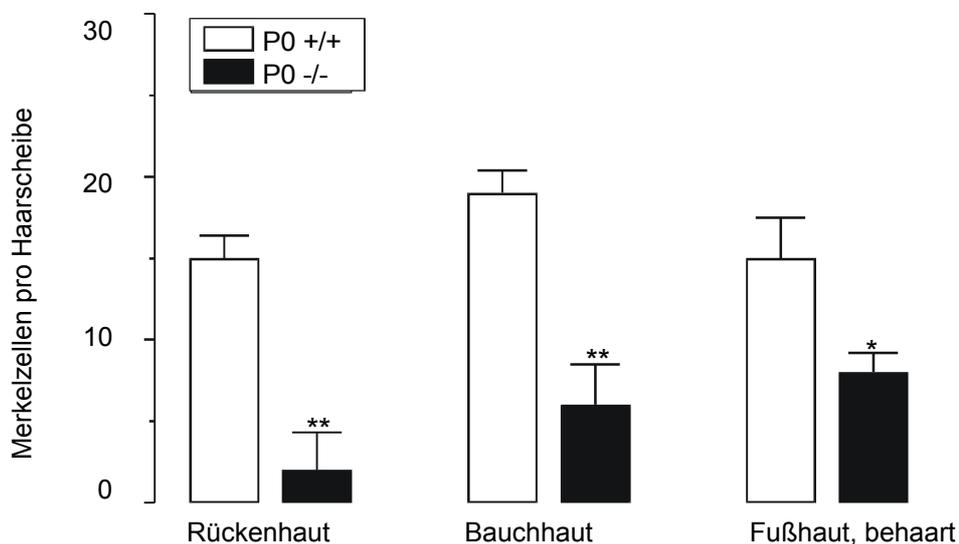


Abb.11: Merkelzellanzahl pro Haarscheibe in der Rückenhaut, Bauchhaut und behaarter Fußhaut von 6 Monate alten P0-defizienten (P0 -/-) und altersgleichen Wildtyp-Tieren (P0 +/+). \*\*,  $p < 0,01$ ; \*,  $p < 0,05$ ; n.s., nicht signifikant.

## 2.4. Merkelzellen pro Quadratcentimeter Haut

Da man den Eindruck hatte, dass die P0-defizienten Tiere weniger Haarscheiben in der Haut und in den Haarscheiben weniger Merkelzellen enthalten, musste man auch von einer generellen Abnahme der Merkelzellen pro cm<sup>2</sup> behaarter Haut ausgehen. Die Merkelzellendichte in den verschiedenen Hautgebieten der Wildtyp-Tiere untereinander wies keinen signifikanten Unterschied auf ( $p > 0,05$ , t-Test). So zeigt die Rückenhaut der Wildtyp-Tiere  $249 \pm 50,1$  MC/cm<sup>2</sup>, die Bauchhaut  $252 \pm 31,7$  MC/cm<sup>2</sup> und die Fußhaut  $215 \pm 32,8$  MC/cm<sup>2</sup>. Dagegen konnte im Vergleich der Rückenhaut mit der Fußhaut der P0-defizienten Tiere eine signifikante Verminderung ( $p < 0,01$ , t-Test) der Merkelzellendichte beobachtet werden. Weder Rückenhaut und Bauchhaut noch Bauchhaut und Fußhaut der P0-defiziente Tiere zeigten einen signifikanten Unterschied in ihrer Merkelzellendichte ( $p > 0,05$ , t-Test). In der Rückenhaut der P0-defizienten Tiere wurden  $2,3 \pm 2,3$  MC/cm<sup>2</sup>, in der Bauchhaut  $18,5 \pm 14,3$  MC/cm<sup>2</sup> und in der Fußhaut  $30 \pm 4,8$  MC/cm<sup>2</sup> gefunden. Beeindruckend war die Feststellung, dass die Merkelzellendichte in den P0-defizienten Tieren gegenüber den Wildtyp-Tieren stark gesunken war. So konnte man in der Rückenhaut und Fußhaut eine signifikante Abnahme ( $p < 0,01$ , t-Test) und in der Bauchhaut eine hoch signifikante Abnahme ( $p < 0,001$ , t-Test) der Merkelzellendichte beobachten (vgl. Abb.12).

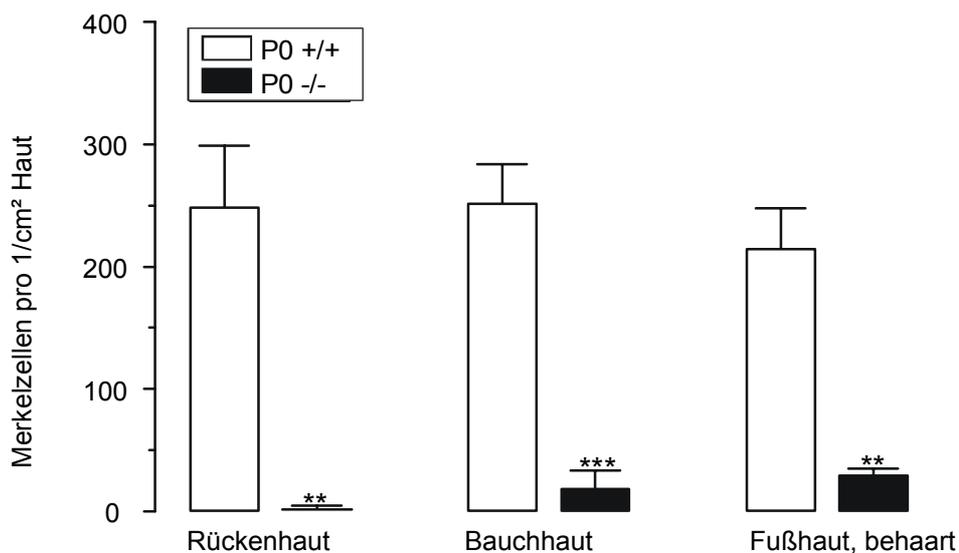


Abb.12: Merkelzellendichte in der Rückenhaut, Bauchhaut und behaarten Fußhaut von 6 Monate alten P0-defizienten (P0 -/-) und altersgleichen Wildtyp-Tieren (P0 +/+). \*\*\*,  $p < 0,001$ ; \*\*,  $p < 0,01$ .

### 3. Histochemischer Nervenfasernachweis

#### 3.1. Nervenfasern pro Quadratmillimeter Epidermis

Bei der quantitativen Bestimmung der Nervenfaserdichte in den Wildtyp-Tieren konnte zwar eine leichte Abnahme der Nervenfasernzahl nachgewiesen werden, die aber keine signifikante Veränderung der Nervenfaserdichte mit fortschreitendem Lebensalter der Tiere darstellte ( $p > 0,05$ , t-Test). Sie rangierte zwischen  $812 \pm 110$  NF/mm<sup>2</sup> Epidermis bei den 6 Wochen alten Tieren,  $899 \pm 19$  NF/mm<sup>2</sup> Epidermis in den 4 Monate alten Tieren und  $754 \pm 91$  NF/mm<sup>2</sup> Epidermis bei den 6 Monate alten Tieren. Ein ähnliches Ergebnis wurde bei den P0-defizienten Tieren angetroffen. Die P0-defizienten Tiere zeigten eine geringere Abnahme der Nervenfaserdichte von  $782 \pm 19,6$  NF/mm<sup>2</sup> Epidermis in den 6 Wochen alten,  $639 \pm 96$  NF/mm<sup>2</sup> Epidermis in den 4 Monate alten und  $672 \pm 111$  NF/mm<sup>2</sup> Epidermis in den 6 Monate alten Tieren. Sie ließen aber keinen signifikanten Unterschied der Nervenfaserdichte mit zunehmenden Alter beobachten ( $p > 0,05$ , t-Test). Erkennen konnte man, dass die Nervenfaserdichte bei den Wildtyp-Tieren im Vergleich zu den altersgleichen P0-defizienten Tieren leicht erhöht war. Jedoch konnte nur bei den 4 Monate alten Wildtyp-Tieren eine schwach signifikante Erhöhung der Nervenfasernzahl ( $p < 0,05$ , t-Test) gegenüber ihren altersentsprechenden P0-defizienten Tieren festgestellt werden (vgl. Abb.13).

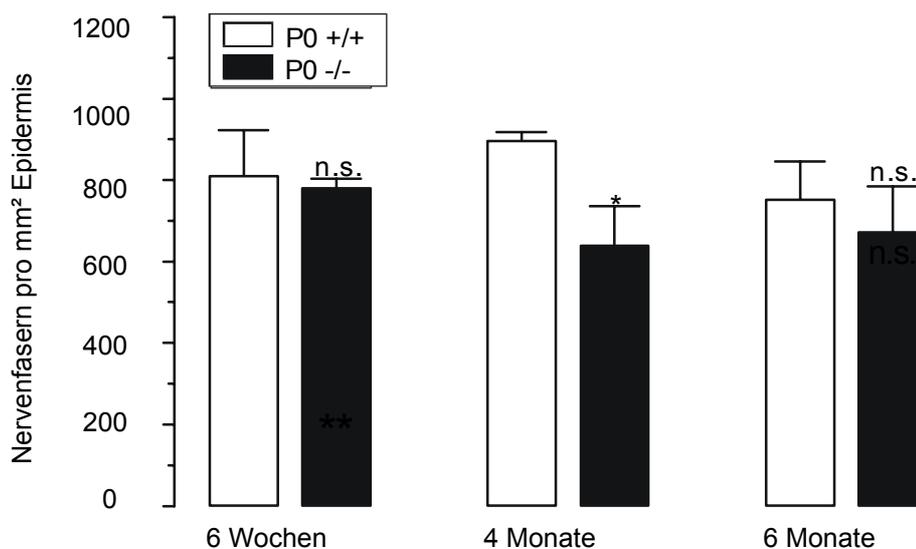


Abb.13: Nervenfaserdichte in den Fußballen der P0-defizienten (P0 -/-) und Wildtyp-Tiere (P0 +/+). \*,  $p < 0,05$ ; n.s., nicht signifikant.

### 3.2. Nervenfaserlänge pro Quadratmillimeter Epidermis

Die Nervenfaserlänge in den Wildtyp-Tieren zeigte eine große Variabilität mit zunehmenden Alter der Tiere. In den 6 Wochen alten Wildtyp-Tieren konnte eine Faserlänge von  $477\mu\text{m} \pm 74/\text{mm}^2$  Epidermis beobachtet werden. Diese stieg in den 4 Monate alten Wildtyp-Tieren auf  $651\mu\text{m} \pm 110/\text{mm}^2$  Epidermis an und fiel dann wieder auf eine Faserlänge von  $335\mu\text{m} \pm 32/\text{mm}^2$  Epidermis in den 6 Monate alten Tieren ab. Nur die 4 Monate alten und 6 Monate alten Wildtyp-Tiere unterschieden sich schwach signifikant in ihren Nervenfaserlängen ( $p < 0,05$ , t-Test).

Bei den P0-defizienten Tieren, deren Nervenfaserlänge mit fortschreitendem Lebensalter nicht signifikant abnahm ( $p > 0,05$ , t-Test), wurde im Vergleich mit ihren altersentsprechenden Wildtyp-Tieren in allen Altersklassen keine signifikant veränderte Nervenfaserlänge festgestellt ( $p > 0,05$ , t-Test). Die initiale Faserlänge in den 6 Wochen alten P0-defizienten Tieren von  $432\mu\text{m} \pm 35/\text{mm}^2$  Epidermis nahm in den 4 Monate alten Tieren auf  $415\mu\text{m} \pm 23/\text{mm}^2$  Epidermis und schließlich in den 6 Monate alten Tieren auf  $304\mu\text{m} \pm 43,5/\text{mm}^2$  Epidermis ab (vgl. Abb.14).

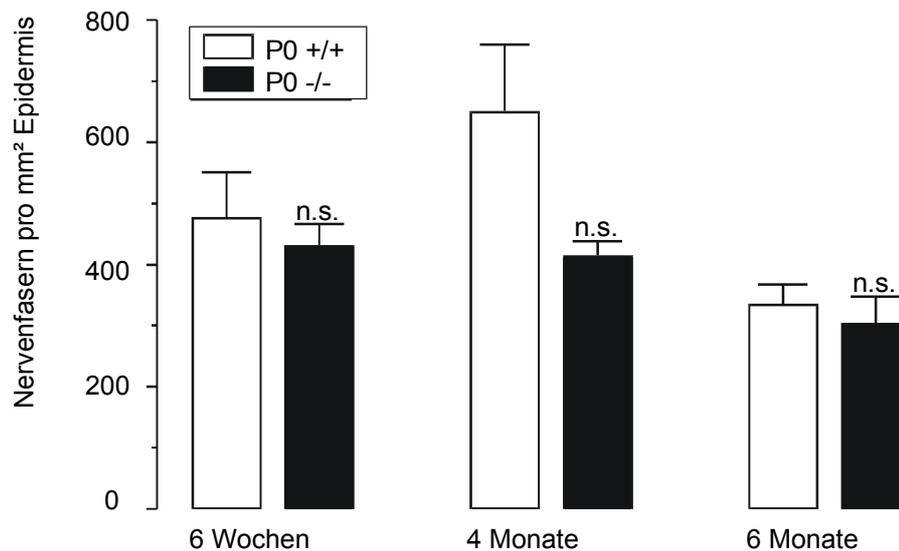


Abb.14: Nervenfaserlänge in den Fußballen der P0-defizienten (P0 -/-) und Wildtyp-Tiere (P0 +/+). n.s., nicht signifikant.

### 3.3. Die Basalmembran penetrierenden Nervenfasern

Die Anzahl der die Basalmembran durchtretenden Nervenfasern der Wildtyp-Tiere war diskreten Schwankungen unterworfen und zeigte eine geringfügige, nicht signifikante Abnahme mit zunehmendem Lebensalter ( $p > 0,05$ , t-Test). Es konnte eine geringere Nervenfasernzahl in den jüngsten Wildtyp-Tieren festgestellt werden als in altersgleichen P0-defizienten Tieren. Die Anzahl der die Basalmembran durchtretenden Nervenfasern variierte in den Wildtyp-Tieren von  $8,9 \pm 0,8$  dr.NF/mm Basalmembran in den 6 Wochen alten Tieren, von  $10 \pm 1,2$  dr.NF/mm Basalmembran in den 4 Monate alten Tieren und  $8,4 \pm 1,7$  dr.NF/mm Basalmembran in den 6 Monate alten Tieren (vgl. Abb. 15).

Die P0-defizienten Tiere zeigten eine nicht signifikante Abnahme an Nervenfasern, die die Basalmembran in die Epidermis penetrierten, in höheren Altersstufen ( $p > 0,05$ , t-Test). Die 6 Wochen alten P0-defizienten Tiere enthielten  $9,3 \pm 0,8$  dr.NF/mm Basalmembran. Im Verlauf nahm die Nervenfasernzahl in den 4 Monate alten P0-defizienten Tieren auf  $6,5 \pm 1,3$  dr. NF/mm Basalmembran und in den 6 Monate alten Tieren auf  $6,2 \pm 1,1$  dr. NF/mm Basalmembran ab. Obwohl in den 6 Wochen alten P0-defizienten Tieren mehr und in den übrigen Altersklassen weniger durchtretende Nervenfasern ermittelt werden konnten als in den altersgleichen Wildtyp-Tieren, wurde kein signifikanter Unterschied ( $p > 0,05$ , t-Test) zu den Wildtyp-Tieren beobachtet.

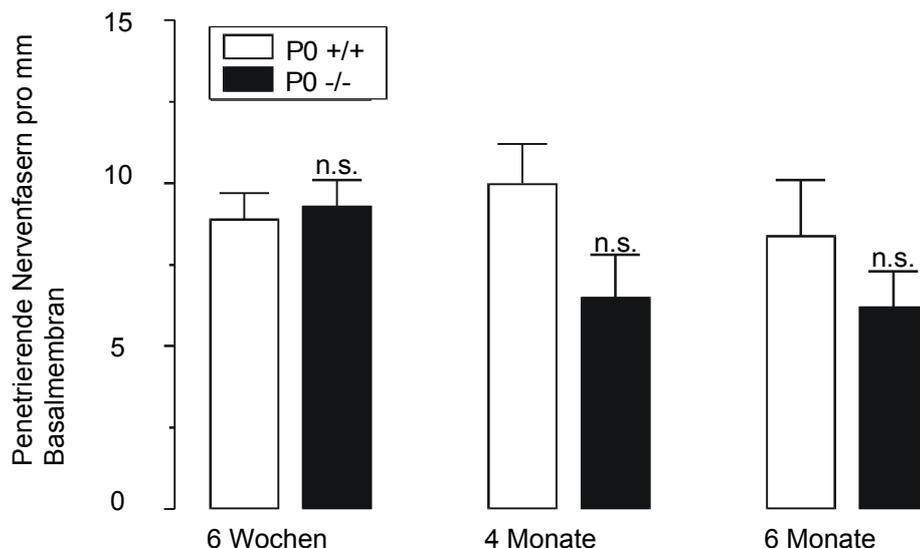


Abb.15: Anzahl die Basalmembran penetrierender Nervenfasern in den Fußballen der P0-defizienten (P0 -/-) und Wildtyp-Tiere (P0+/+). n.s., nicht signifikant.

#### 4. NGF- und NT-3-Nachweis

Um eine möglichst genaue Aussage über den tatsächlichen NGF- bzw. NT-3-Gehalt treffen zu können, wurde für jedes Tier eine Doppelbestimmung mit einer Dreifachbestimmung der entsprechenden Probe pro Testlauf durchgeführt. Außerdem wurde bei der ELISA-Auswertung besonders auf eine einwandfreie Standardkurve und eine exakte Wiederfindung geachtet, die pro Testlauf ermittelt bzw. mitgeführt wurde, so dass von einer hohen Spezifität und Sensitivität des jeweiligen Tests ausgegangen werden konnte. Der NGF- bzw. NT-3- Gehalt wurde als Mittelwert in Picogramm (pg) pro Nassgewicht (NG) der Haut in Gramm (g)  $\pm$  Standardfehler (SEM) angegeben.

##### 4.1. NGF- Gehalt in Picogramm pro Gramm Nassgewicht Rückenhaut

Die Haut der Wildtyp-Tiere zeigte eine Abnahme des NGF-Gehaltes mit zunehmendem Lebensalter. Der NGF-Gehalt fiel von  $1333 \pm 303$  pg/g NGF pro NG in den 6 Wochen alten Tieren, auf  $1117 \pm 350$  pg/g NGF pro NG in den 4 Monate alten Tieren und weiter bis auf  $541 \pm 400$  pg/g NGF pro NG in den 6 Monate alten Tieren (vgl. Abb.16).

Ein ähnlicher Abfall des NGF-Gehaltes in höheren Altersklassen konnte auch in den P0-defizienten Tieren beobachtet werden. In der Haut der 6 Wochen alten P0-defizienten Tiere wurde ein NGF-Gehalt von  $1644 \pm 350$  pg/g NG, in den 4 Monate alten Tieren  $611 \pm 303$  pg/g NG und in den 6 Monate alten Tieren  $658 \pm 248$  pg/g NG gefunden.

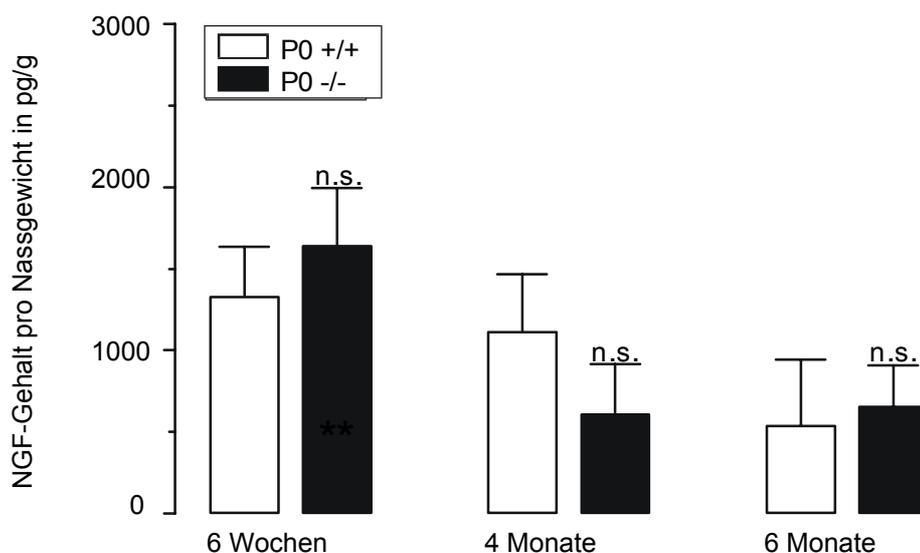


Abb.16: NGF-Gehalt in der Rückenhaut der P0-defizienten (P0 -/-) und Wildtyp-Tiere (P0 +/+). n.s., nicht signifikant.

Weder die NGF-Spiegel zwischen den P0-defizienten und Wildtyp-Tieren in den unterschiedlichen Altersstufen noch die NGF-Spiegel in den P0-defizienten und Wildtyp-Tieren zu den verschiedenen Altersstufen unterschieden sich signifikant ( $p > 0,05$ , t-Test) (vgl. Abb.15).

#### 4.2. NT-3- Gehalt in Picogramm pro Gramm Nassgewicht Rückenhaut

Der NT-3-Gehalt in der Haut der Wildtyp-Tiere zeigte eine gewisse Variabilität, wies aber keine signifikante Veränderung mit fortschreitendem Alter der Tiere auf ( $p > 0,05$ , t-Test). In der Haut der 6 Wochen alten Wildtyp-Tiere fand man einen NT-3-Gehalt von  $112 \pm 20$  pg/g NG. Die 4 Monate alten Wildtyp-Tiere wiesen  $203 \pm 56$  pg/g NG und die 6 Wochen alten Tiere  $127 \pm 14$  pg/g NT-3 pro NG auf.

Dagegen konnte bei den P0-defizienten Tieren eine schwach signifikante Zunahme des NT-3-Gehaltes ( $p < 0,05$ , t-Test) in höheren Lebensaltern festgestellt werden. Bei den 6 Wochen alten P0-defizienten Tieren wurde ein NT-3-Gehalt von  $94 \pm 16$  pg/g NG ermittelt, der in den 4 Monate alten Tieren auf  $201 \pm 37$  pg/g NG und in den 6 Monate alten Tieren auf  $478 \pm 110$  pg/g NG anstieg.

Im Vergleich der NT-3-Gehalte in Wildtyp- und P0-defizienten Tieren konnte nur in der Gruppe der 6 Monate alten Tiere bei den P0-defizienten Tieren ein schwach signifikant erhöhter NT-3-Gehalt ( $p < 0,05$ , t-Test) nachgewiesen werden (vgl. Abb.17).

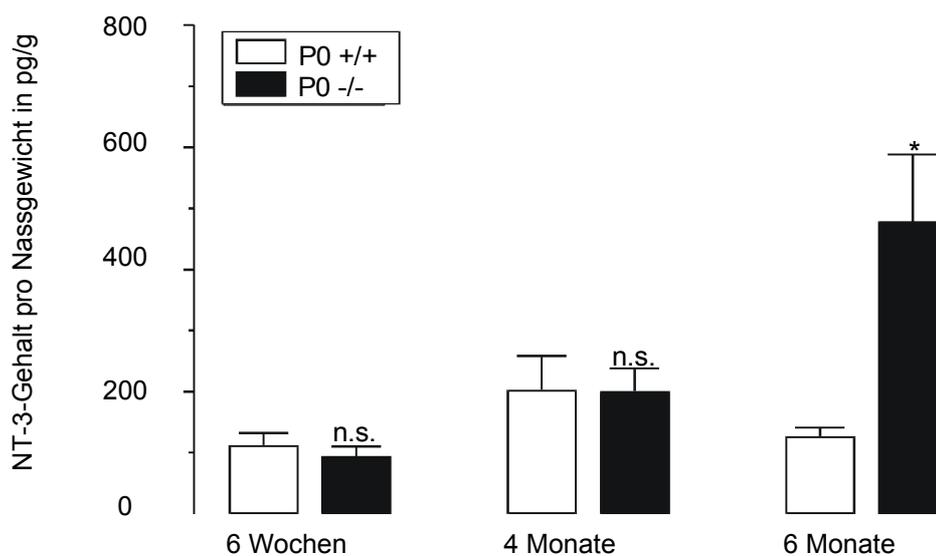


Abb.17: NT-3-Gehalt in der Rückenhaut der P0-defizienten (P0 -/-) und Wildtyp-Tiere (P0+/+). \*,  $p < 0,01$ ; n.s., nicht signifikant.

## **D. Diskussion**

### **1. Zusammenfassung der Ergebnisse**

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, in wieweit Merkelzellen in P0-defizienten Tieren in Entwicklung und Fortbestand beeinflusst werden. Es konnte gezeigt werden, daß es bei P0-defizienten Tieren mit fortschreitendem Alter gegenüber altersgleichen Wildtyp-Geschwistern zu einer Abnahme von Merkelzellen kommt. Dies zeigt sich vor allem in der Abnahme der Merkelzellichte in der unbehaarten Haut und behaarten Haut und in der Abnahme der Haarscheibendichte und der Merkelzellanzahl in den Haarscheiben der behaarten Haut der P0-defizienten Tiere.

Untersuchungen am peripheren Nervensystem im Rahmen dieser Studie mit Hilfe des Markers PGP 9.5 zur Darstellung unmyelinisierter Nervenfasern zeigte, dass die intraepidermalen, unmyelinisierten Nervenfasern in der Haut der P0-defizienten Tiere durch den Gendefekt unbeeinflusst bleiben. Weder Nervenfasernlänge pro Quadratmillimeter Basalmembran, Nervenfasernlänge pro Quadratmillimeter Epidermis, noch die Anzahl der die Basalmembran penetrierenden unmyelinisierten Nervenfasern änderte sich signifikant. Die Nervenfaserdichte pro Quadratmillimeter Epidermis zeigte nur in den 4 Monate alten P0-defizienten Tieren eine schwach signifikante Abnahme im Vergleich zu altersentsprechenden Wildtyp-Tieren.

Weiterhin konnte in dieser Arbeit keine Reduktion der Neurotrophine NGF und NT-3 nachgewiesen werden, so dass Veränderungen der peripheren Innervation und des Merkelzellgehaltes in P0-defizienten Tieren nicht als sekundäre Konsequenz eines veränderten trophischen Einflusses auftreten.

Es konnte nur eine schwach signifikante Zunahme des NT-3-Gehaltes in den 6 Monate alten P0-defizienten Tieren im Vergleich zu den altersentsprechenden Wildtyp-Tieren festgestellt werden.

## **2. Diskussion der Ergebnisse**

### **2.1. Merkelzellen in behaarter und unbehaarter Haut**

Merkelzellen, die als Mechanozeptoren von Ästen einer langsam adaptierenden myelinisierten A $\beta$ -Faser innerviert werden, entwickeln sich initial in Mäusen (Pasch et al. 1990) und Ratten (Ochiai und Suzuki 1981) ohne Nervkontakt.

Vorangegangene Experimente zeigten, dass für den Fortbestand der Merkelzelle in behaarter Haut der Kontakt zur zugehörigen Nervenfasern essentiell ist, hingegen sich Merkelzellen in unbehaarter Haut nervunabhängig weiterentwickeln (Mills et al. 1984, Nurse et al. 1984b, Mills et al. 1989, Narisawa und Kohda 1995).

In der vorliegenden Arbeit konnte in der behaarten Haut P0-defizienter Mäuse eine Abnahme der Merkelzellendichte, der Haarscheibendichte und der Merkelzellanzahl in den Haarscheiben, als auch ein Merkelzellverlust in der unbehaarten Haut mit fortschreitendem Alter der Tiere nachgewiesen werden.

Der Verlust von Merkelzellen und die Verminderung der Haarscheibendichte in der behaarten Haut der P0-defizienten Tiere kann als ein indirekter Hinweis auf eine Beeinträchtigung ihrer Innervation, entstanden durch eine axonale Schädigung oder einen axonalen Verlust, interpretiert werden, da eine nervabhängige Weiterentwicklung der Merkelzelle in behaarter Haut postuliert wird. Auch die Abnahme der Merkelzellendichte in der unbehaarten Haut mit steigendem Lebensalter der Tiere impliziert, entgegen bisherigen Studien (Nurse et al. 1984b), einen dortigen nervabhängigen Fortbestand der Merkelzelle.

Die vorangegangenen Experimente wurden jedoch vornehmlich an Ratten durchgeführt, während in der vorliegenden Arbeit Merkelzellen und ihre Innervation in der Haut von Mäusen untersucht wurden, so dass man einige speziesspezifische Unterschiede in den Tieren nicht ausschließen kann.

Die Annahme einer axonalen Beeinträchtigung stützen Experimente an P0-defizienten Mäusen, die parallel zu der vorliegenden Studie durchgeführt wurden (Frei et al. 1999). Da in hereditären Neuropathien die klinischen und pathologischen Veränderungen gewöhnlich in distalen Abschnitten der Extremitäten besonders schwer sind und diese Zeichen axonalen Schadens zeigen (Dyck et al. 1993), wurden die myelinisierten Axone der 1. Zehe der P0-defizienten Tiere untersucht. In distalen Ästen des Nervus femoralis,

die die dorsale, behaarte Zehenseite und des Nervus ischiadicus, die die plantare, unbehaarte Zehenseite innervieren, wurde eine Reduktion von 70% myelinisierter Axone in 6 Monate alten P0-defizienten Tieren festgestellt. Diesem starkem Verlust von sensorischen myelinisierten Axonen steht ein korrespondierender Verlust von Merkelzellen in behaarter und unbehaarter Haut in 6 Monate alten P0 defizienten Tieren gegenüber. Dies lässt eine Abhängigkeit der Merkelzelle von der Präsenz und dem Fortbestand ihrer zugehörigen SAI-Afferenz vermuten.

Auch Untersuchungen durch Airaksinen et al. (1996) an NT-3-homozygot- und heterozygot-defizienten Mäusen legen nahe, dass in behaarter und in unbehaarter Haut eine Nervabhängigkeit in der Weiterentwicklung der Merkelzelle besteht. Zunächst wiesen NT-3-homozygot- und heterozygot-defiziente Tiere zum Zeitpunkt der Geburt keine Unterschiede in Merkelzellichte, Haarscheibendichte und Nervenfasernzahl in behaarter und unbehaarter Haut im Vergleich zu ihren Wildtyp-Geschwistern auf. Man beobachtete jedoch 14 Tage postpartal in den NT-3-homozygot-defizienten Tieren einen fast vollständigen Verlust von Merkelzellen und ihrer Innervation in behaarter und unbehaarter Haut und in NT-3-heterozygot-defizienten Tieren eine nahezu 80%ige Reduktion von SAI-Afferenzen und einen Merkelzellverlust von 50%. Diese enge Korrelation zwischen Merkelzellverlust und Reduktion der SAI-Afferenzen in den NT-3 defizienten Tieren wurde als Hinweis für die Abhängigkeit der Merkelzelle von ihrer Innervation interpretiert (Airaksinen et al. 1996).

Experimente an Mausmutanten, die in der Epidermis NT-3 überexprimieren, aber im Bezug auf endogenes NT-3 durch Fehlen eines NT-3-Allels NT-3 heterozygot defizient sind (K14-NT3/NT3 +/-) zeigen, dass durch die Überexpression von NT-3 in der Haut dieser Mäuse dem Verlust von Aβ-Afferenzen, Merkelzellen und Haarscheiben in den NT-3 heterozygot defizienten Tieren entgegen gewirkt wird (Krimm et al. 1999). Dies deutet darauf hin, dass das in der Haut gebildete NT-3 und nicht das neurale NT-3, z.B. im ZNS, das Überleben der SAI-Nervenfasern ermöglicht.

Da Merkelzellen in Haarscheiben von ihrer neuronalen Versorgung abhängen und nach Denervierung absterben (English 1974, Nurse et al. 1984b) wird die Merkelzellreduktion in NT-3-heterozygot-defizienten Tieren auf den Verlust ihrer SAI-Afferenz zurückgeführt (Airaksinen et al. 1996, Krimm et al. 1999). Das vollständige Überleben

von Merkelzellen in K14-NT3/NT3+/- defizienten Tieren ist durch das Fortbestehen ihrer SAI- Afferenz zu erklären (Krimm et al. 1999).

## 2.2. Merkelzellen und NT-3

Die Rolle von Neutrophinen in der Beeinflussung des Überlebens von Merkelzellen wurde anhand von Zellkulturen durch Fukuda et al. (1996) getestet. Es zeigte sich, dass nur NT-3 und keiner von den übrigen, strukturell verwandten Neurotrophinen in der Lage ist, das Überleben von Merkelzellen zu unterstützen.

In Studien mit NT-3-überexprimierenden Mäusen beobachtete man, dass es durch den erhöhten NT-3-Gehalt in der Epidermis der Tiere zu einer Zunahme der epidermalen und dermalen Innervationsdichte in Fußballen und Rückenhaut und zu einer Zunahme der unmyelinisierten und myelinisierten Nervenfasern im kutanen Saphenusnerv kommt. Außerdem wurde eine Zunahme der Anzahl der durch SAI-Afferenzen innervierten Merkelzellen sowie eine Vergrößerung der Haarscheiben durch Zunahme der Merkelzellanzahl pro Haarscheibe beobachtet (Albers et al. 1996). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass NT-3 in der Lage ist, das Vorkommen von sensorischen Neuronen und ihren spezifischen sensorischen Endigungen in der Epidermis (Merkelzellen) zu erhöhen (Albers et al. 1996).

In Experimenten mit NT-3-defizienten Mäusen beobachtete man eine starke Abhängigkeit zwischen Merkelzellen und NT-3-Gehalt in diesen Tieren (Airaksinen et al. 1996). Anschließende Untersuchungen an neural NT-3-defizienten, aber in der Haut NT-3-überexprimierenden Mäusen zeigten, dass das Überleben der Merkelzellen nicht vom neuronalen, sondern vor allem vom NT-3-Gehalt in der Haut abhängt (Krimm et al. 1999).

In allen drei oben genannten Tierexperimenten wurde der Effekt auf die Merkelzelle als Folge der Wirkung von NT-3 auf die zugehörige SAI-Afferenz diskutiert.

Auch Kinkelin und Kollegen (1999) halten eine direkte p75-Rezeptor vermittelte Wirkung von NT-3 auf den Merkelzellfortbestand für unwahrscheinlich und diskutieren vielmehr die Möglichkeit eines *dying back*-Mechanismus der distalen Anteile der sensorischen Afferenzen als Ursache für den Merkelzellverlust in den untersuchten p75-defizienten Mäusen.

In der Haut der P0-defizienten Tiere konnte keine Erniedrigung des NT-3-Gehaltes festgestellt werden. Folglich kann der Verlust von Merkelzellen, den wir in unseren Experimenten ermittelt haben und auch die Affizierung myelinisierter Nervenfasern, die durch die Studie von Frei et al. (1999) in P0-defizienten Tieren beobachtet wurde, nicht als sekundäre Wirkung eines veränderten trophischen Einflusses interpretiert werden.

Man muss davon ausgehen, dass neben Neurotrophinen noch andere Faktoren das Überleben von Merkelzellen beeinflussen, wobei der neuronale Kontakt der Merkelzelle zu der zugehörigen sensorischen Nervenfasern als essentiell anzusehen ist.

Abschließend kann man sagen, dass der Gendefekt in den P0-defizienten Tieren zu keiner Veränderung von Neurotrophinen (NT-3) führt, die den Merkelzellverlust in diesen Tieren erklären könnte. Es gibt dagegen mehr Hinweise für einen durch den P0-Defekt induzierten Prozess, der zu einer axonalen Schädigung führt und der sekundär einen Verlust von Merkelzellen nach sich zieht.

### **2.3. Wie kann ein Defekt in Schwanzzellprotein kodierenden Genen, der primär eine Myelinisierungsstörung zur Folge hat, zu einer axonalen Atrophie führen?**

Zu den wesentlichen Symptomen erblicher Neuropathien gehören Muskelschwäche und Muskelatrophie. Untersuchungen an Nerven von CMT-Patienten zeigten, dass bei vielen Formen erblicher Neuropathien nicht nur die Myelinscheide in Mitleidenschaft gezogen wird, sondern auch Axone degenerieren (Dyck et al. 1993). Es wird sogar angenommen, dass in Formen der hypertrophen Neuropathie primär eine axonale Schädigung entsteht und erst im Nachhinein eine segmentale Demyelinisierung folgt (Dyck et al. 1993). Auch in dem korrespondierenden Tiermodell der Déjérine-Sottas-Erkrankung, der homozygot P0-defizienten Maus, konnte eine Affizierung vor allem der distalen Axone nachgewiesen werden (Frei et al. 1999).

Bereits Giese und Kollegen (1992) beobachteten in den P0-defizienten Tieren neben einer Hypomyelinisierung, abnormaler Expression von Oberflächenmolekülen und Degeneration von Myelin eine Degeneration von Axonen. Die Bestimmung der Nervenleitungseigenschaften mittels elektrophysiologischer Methoden zeigte eine erhebliche Reduktion der Amplituden der Muskelsummenpotentiale und kann neben

einer axonalen Blockade auch als axonale Degeneration interpretiert werden (Giese et al. 1992, Martini et al. 1995b, Zielasek et al. 1996).

Frei und Kollegen (1999) konnten in P0-defizienten Tieren in proximalen Abschnitten peripherer Nerven eine Reduktion der Axonkaliber, jedoch keinen Verlust von Axonen nachweisen. Im Gegensatz dazu stellten sie in distalen Nervenabschnitten axonale Verluste bis zu 70% sowie Anzeichen Wallerscher Degeneration fest. Dies bestätigte den Verdacht einer Beeinträchtigung der distalen Terminalen der myelinisierten Axone, der indirekt durch den in unserer Studie beobachteten Merkelzellverlust in den P0-defizienten Tieren, in Erscheinung trat.

Die Beobachtung, dass Mutationen in schwannzellassozierten Genen axonale Veränderungen oder axonalen Verlust verursachen, ist von großer Wichtigkeit, da besonders axonale Dysfunktion für den Patienten schwere funktionelle Beeinträchtigung bedeutet.

#### **2.4. Gliazellen modifizieren axonale Eigenschaften**

Dass axonale Eigenschaften durch den Gliazellpartner modifiziert werden, konnte nicht nur im gesunden Nervensystem, sondern auch im pathologisch veränderten Nervensystem und in den erbliche Neuropathien nachempfindenden Tiermodellen gezeigt werden.

Anatomisch-morphologische Untersuchungen der Neurone von Spinalganglien zeigen, dass der Schwannzell-Phänotyp den axonalen Durchmesser zu bestimmen vermag (Hsieh et al. 1994).

Das Neuron eines lumbalen Spinalganglion geht nach einem, wenige Mikrometer messenden, nicht myelinisierten Stamm in zwei myelinisierte Axone über, von denen das eine als dorsale Wurzel zentralwärts ins Rückenmark und das andere im Spinalnerv in die Peripherie zieht. Der nicht myelinisierte Anteil des Neurons hat einen kleineren Durchmesser und dichter gepackte Neurofilamente mit niedrigerem Phosphorylierungsgrad als die myelinisierten zentralen und distalen Axone. Man geht davon aus, dass lokale axonale Signale die Schwannzelle inhibieren einen myelinisierenden Phänotyp einzunehmen, was zu einem reduziertem Axondurchmesser

führt. Das Vorkommen von Neurofilamenten sowie deren Phosphorylierungsstatus scheint in diesen Mechanismus involviert zu sein (Hsieh et al. 1994, Martini 2001).

Auch im pathologisch veränderten Nervensystem von CMT1A-Patienten fanden Watson und Kollegen (1994) in Nervenbiopsien reduzierte Axonkaliber und Hinweise auf Dephosphorylierung von Neurofilamenten.

DeWaegh und Kollegen (1992) konnten in Experimenten mit Trembler-Mäusen (Korrespondierendes Tiermodell einiger Formen der CMT1A-Neuropathie; Mutation im PMP22-Gen) zeigen, dass eine defekte Schwannzelle axonale Eigenschaften von initial normal entwickelten Axonen verändern kann. Zunächst wurden Nerven von Wildtyp-Tieren durchtrennt und Nervenstümpfe von Trembler-Tieren in die Lücke eingefügt, so dass regenerierende und wieder aussprossende Wildtyp-Axone von den mutierten Schwannzellen der Trembler-Maus umhüllt wurden. Man beobachtete bei den Wildtyp-Axonen, die von den defekten Schwannzellen ummantelt wurden, ein reduziertes Axonkaliber, einen niedrigen Phosphorylierungsgrad der Neurofilamente, eine höhere Neurofilamentdichte sowie einen verlangsamten anterograden Transport im Axon.

In ähnlichen Experimenten mit hypomyelinisierenden transgenen Mäusen (Cole et al. 1994) konnten die gleichen Effekte auf Axone, wie eine Reduktion des Axondurchmessers, eine Erhöhung der Neurofilamentdichte und Abnahme der Phosphorylierung, nachgewiesen werden.

Eine Beeinträchtigung von Axonen wurde auch in CMTX-Patienten und im korrespondierenden Tiermodell, der Connexin-32-defizienten Maus beschrieben (Sanders et al. 1998, Scherer et al. 1998). Sahenk und Chen (1998) demonstrierten die Beeinträchtigung distaler Axone von Mäusen durch die Assoziation mit einer defekten humanen Schwannzelle. Dazu wurden Biopsien des Nervus suralis von CMTX-Patienten in durchtrennte Nerven von immundefizienten Nacktmäusen inseriert. In den humanen Transplantaten konnte man Mäuse-Axone mit reduziertem Durchmesser und dicht kompaktierte Neurofilamente feststellen. Vor allem in distalen Anteilen des Transplantats beobachtete man eine axonale Degeneration.

## 2.5. Axon-Schwannzell-Interaktion

Derzeit ist noch nicht bekannt, wie die Gliazelle die Eigenschaften und das Überleben der Axone beeinflusst. Zellerkennungsmechanismen zwischen der myelinisierenden Schwannzelle und den Axonen werden als entscheidene Interaktionspartner angesehen.

Da man in anderen Myelin-Mutanten, wie z. B. in der oben erwähnten Trembler-Maus, eine Beeinflussung der Phosphorylierung der Neurofilamente und des axonalen Transports durch die Myelindefizienz festgestellt hat, ist es wahrscheinlich, dass ähnliche Pathomechanismen in den P0-defizienten Mausmutanten wirken.

Auch Frei und Kollegen (1999) erklären ihren beobachteten Verlust der Axone in den P0-defizienten Tieren mit einem beeinträchtigten langsamen axonalen Transport, der zu einer Deprivation von metabolisch wichtigen Molekülen vor allem der distalen Bereiche der Axone führt, während proximale Bereiche der Axone und der Zellkörper kaum beeinflusst werden. Ein veränderter langsamer axonaler Transport erklärt auch die Beobachtung, dass die Degeneration der Axone in distalen Abschnitten der Nerven am schwersten ist.

Es ist denkbar, dass Moleküle an der Axon-Schwannzell-Grenzfläche, wie z.B. MAG (myelin-associated glycoprotein), wichtige Mediatoren in der Modulation der Axoneigenschaft durch die myelinisierende Schwannzelle darstellen (De Waegh et al. 1992, Yin et al. 1998, Witt und Brady 2000, Martini 2001). Mit Hilfe welcher Signaltransduktionsmechanismen Oberflächenmoleküle, wie MAG, den modulierenden Einfluss der mutierten Schwannzelle ins Axoninnere transduzieren, ist derzeit noch ungeklärt (Witt und Brady 2000, Martini 2001).

Zukünftige Forschungsaktivitäten auf diesem Gebiet könnten mehr Einblick in die Axon-Gliazell-Interaktionsmechanismen bringen und Wege aufzeigen, wie man den axonalen Verlust im myelindefizienten Organismus verhindern könnte.

## 2.6. Intraepidermale Innervation

Die kutane Innervation wird von Ansammlungen myelinisierter und unmyelinisierter Nervenfasern gebildet, die sich parallel zur Hautoberfläche ausrichten. Solche Nervenplexi finden sich in der retikulären und in der papillären Dermis. Von dort ziehen unmyelinisierte Nervenfasern nicht nur zu basalen Lagen der Epidermis, sondern auch zwischen Keratinozyten vertikal aufsteigend bis zum Stratum corneum (McCarthy et al. 1995).

Die Existenz von intraepidermalen Nervenfasern wurde bereits 1868 von Langerhans vermutet. Es zeigte sich, dass epidermale Nervenfasern mit Hilfe von Silberfärbungen (Ridley 1969) oder Neurofilament-Antikörpern (Hoffman et al. 1984) nur schlecht sichtbar gemacht werden können (Hsieh et al. 1996). Die Entwicklung sensitiver immunzytochemischer Methoden hat dazu beigetragen, das Wissen über das Ausmaß der epidermalen Innervation zu vergrößern. Mit dem Einsatz des panaxonalen Markers anti-protein gene product 9.5 (PGP9.5) ist es möglich geworden feine unmyelinisierte intraepidermale Nervenfasern nachzuweisen und zu quantifizieren (Wilkinson et al. 1989, Kennedy et al. 1994, Kennedy et al. 1996, McCarthy et al. 1995, Holland et al. 1997, Holland et al. 1998).

In peripheren sensorischen und sensomotorischen Neuropathien sind bevorzugt myelinisierte Nervenfasern mit kleinem Durchmesser und unmyelinisierte Nervenfasern, wie epidermale A $\delta$ -Fasern und C-Fasern, betroffen (McArthur et al. 1998). Als klinisches Korrelat sind Sensibilitätsverlust für Schmerz und Temperatur sowie autonome Dysfunktionen beschrieben (Holland et al. 1997). Die sensorischen Symptome beginnen meist distal im Bereich der Extremitäten und steigen langsam nach proximal auf, was als *dying back*-Mechanismus affizierter Axone bezeichnet wird (Said et al. 1983, Holland et al. 1997).

Nicht nur McCarthy und Kollegen (1995) konnten bei Patienten mit sensorischer Neuropathie eine Reduktion der intraepidermalen Nervenfaserdichte feststellen, sondern auch McArthur (1998) und zuvor Holland (1997) beobachteten in Patienten mit sensorischer oder sensomotorischer Neuropathie einen Rückgang der intraepidermalen Nervenfasernzahl. Dagegen ergab die Untersuchung der unmyelinisierten Nervenfasern in den Nervenbiopsien von Patienten mit hereditärer Neuropathie eine normale Anzahl an unmyelinisierten Nervenfasern (Dyck et al. 1993). Jedoch wird

aufgrund der beobachteten Veränderung der thermischen und nozizeptiven Wahrnehmung der Patienten von einer Beeinträchtigung der unmyelinisierten Nervenfasern ausgegangen (Dyck et al. 1993). Möglicherweise betrifft die Veränderung der unmyelinisierten Fasern weiter distal gelegene Abschnitten dieser Nerven z.B. den intraepidermalen Bereich der unmyelinisierten Nervenfasern, welcher in den Studien von Dyck et al. (1993) nicht untersucht wurde.

Zudem untersuchte man auch die epidermale Innervation in Tieren. In Ratten konnte Hsieh et al. (1996) nach Durchtrennung des Nervus ischiadicus und Li et al. (1997) nach Entfernung eines Spinalganglions einen Verlust von intraepidermalen Nervenfasern feststellen.

In homozygot P0-defizienten Mäusen, dem korrespondierenden Tiermodell der Déjérine-Sottas-Erkrankung, wurde bislang die intraepidermale Innervation noch nicht untersucht. In vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Identifizierung und Quantifizierung von unmyelinisierten Nervenfasern in Biopsien des Nervus suralis äußerst langwierig und schwierig ist (Herrmann et al. 1999).

Die Bestimmung der intraepidermalen Nervenfaserdichte in peripheren Neuropathien mittels Hautbiopsie und anschließender immunhistochemischer Methoden erwies sich als sehr sensitiv (McArthur et al. 1998), so dass in der Haut der P0 defizienten Tiere die intraepidermalen unmyelinisierten Nervenfasern mit PGP9.5 gefärbt und lichtmikroskopisch und computergestützt ausgewertet wurden. In unseren Experimenten mit P0-defizienten Mäusen konnten wir morphologisch ein ähnlich strukturiertes intraepidermales Nervenfasersystem feststellen, wie es durch Hsieh et al. (1996) in der Haut von Ratten beobachtet wurde. Wir beobachteten subepidermale Nervenfasern, sowie von ihnen aufsteigende, die dermal-epidermale Grenze überschreitende Nervenfasern, die bis in die Nähe des Stratum corneum reichten. Oft zeigten sich die intraepidermalen Axone geschlängelt und verzweigt.

Bei der Betrachtung des gesamten intraepidermalen Nervensystems kann man feststellen, dass die Dichte der unmyelinisierten Nervenfasern durch den Gendefekt allenfalls nur geringfügig beeinflusst wird und erklärt somit nicht die sensorische Dysfunktion in den P0-defizienten Tieren. Demnach ist der Effekt der Mutation im P0-Gen spezifisch, d.h. er betrifft vorwiegend myelinisierte Nervenfasern, wodurch weiter proximal gelegene Axone des peripheren Nervensystems involviert werden (Frei et al.

1999). Ein zusätzlicher Effekt, induziert durch den Gendefekt, mit Wirkung auf das intraepidermale unmyelinisierte Nervenfaseresystem kann nicht beobachtet werden.

## **2.7. NGF und intraepidermale Innervation**

NGF unterstützt als neurotropher Faktor das Überleben von sympathischen und bestimmten sensorischen Neuronen während embryonaler und früher postnataler Periode (Snider 1994, Lewin und Barde 1996). Experimente von Harper und Davies (1990) zeigen, dass im adulten Organismus diese Neuronenpopulationen NGF von dem zu innervierenden Gewebe erhalten, vorwiegend synthetisiert von basalen Keratinozyten (DiMarco et al. 1991, English et al. 1994). Die NGF-Synthese des peripheren Zielgebiets beginnt, wenn die ersten Axone dieses erreichen (Davies et al. 1987, Korsching und Thoenen 1988). Sowohl im adulten als auch im embryonalen Gewebe korreliert die Menge an NGF und NGF mRNA mit der späteren Innervationsdichte (Harper und Davies 1990, Bennett et al. 1998).

Bennett und Kollegen (1998) untersuchten die kutane Innervation in der Haut von Ratten nach NGF-Deprivation und stellten eine starke Reduktion der epidermalen Nervenfaserdichte fest. NGF wurden physiologische Signaleigenschaften zugesprochen, durch die terminale Verzweigungen unmyelinisierter Nervenfaser in der Epidermis gesteuert werden. Dass NGF für die Ausprägung der sensorischen epidermalen Innervation mitverantwortlich ist, zeigen Experimente von Diamond et al. (1992), die ein NGF-abhängiges Aussprossen unmyelinisierter Nervenfaser in benachbarte denervierte Bezirke in Rattenhaut feststellten.

In unserer Studie konnten wir beobachten, dass in den P0-defizienten Tieren das intraepidermale Nervenfaseresystem durch den Gendefekt nicht beeinflusst wird. Als Ergebnis der Untersuchungen des NGF-Gehaltes in der Haut der P0-defizienten Tiere ergaben sich weder signifikante Unterschiede zu den unterschiedlichen Altersstufen, noch zwischen den verschiedenen Altersstufen im Vergleich mit den Wildtyp-Geschwistern. Somit kann die eingangs postulierte Vermutung einer durch den Gendefekt induzierte Änderung des Gehaltes an NGF und eine dadurch sekundär entstandene Beeinflussung der epidermalen Nervenfaserdichte in den P0-defizienten Tieren nicht bestätigt werden.

### 3. Schlussfolgerung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die neuropathologischen Veränderungen am peripheren Nervensystem von P0-defizienten Mäusen, ein Tiermodell der hereditären motorisch-sensorischen Déjérine-Sottas-Neuropathie, zu untersuchen. Mit Hilfe von immunhistochemischen Färbemethoden, enzymgekoppelten Assays, computer-gestützter und lichtmikroskopischer Auswertungsverfahren wurde insbesondere die Anzahl an Merkelzellen, das Vorkommen bestimmter Neurotrophine und die intraepidermale Innervation studiert. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse können dabei folgende Aussagen getroffen werden:

1. Der Verlust von Merkelzellen in behaarter und unbehaarter Haut in P0-defizienten Tieren wird von einer Reduktion sensibler myelinisierter afferenter Neuronen begleitet. Dies impliziert eine Abhängigkeit der Merkelzelle von ihrer innervierenden SAI-Afferenz sowohl in behaarter als auch in unbehaarter Haut der P0-defizienten Tiere.
2. Der Verlust von Merkelzellen und die Beeinträchtigung myelinisierter Nervenfasern in den P0-defizienten Tieren kann nicht als sekundäre Wirkung eines veränderten trophischen Gehalts der Neurotrophine NT-3 und NGF angesehen werden. Der P0-Defekt induziert vielmehr einen Prozess, der zu einer axonalen Schädigung führt und der sekundär einen Verlust von Merkelzellen bedingt.
3. Ein zusätzlicher Effekt auf das intraepidermale unmyelinisierte Nervenfasersystem in den P0-defizienten Tieren konnte nicht beobachtet werden. Die intraepidermalen unmyelinisierten Nervenfasern in der Haut der P0 defizienten Tiere bleiben durch den Gendefekt unbeeinflusst. Die Mutation im P0-Gen zeigt somit Spezifität für das myelinisierte Nervenfasersystem.
4. Gliazellen können axonale Eigenschaften modulieren, so dass in einer Erkrankung, die primär durch eine Myelinisierungsstörung verursacht wird, auch axonale Veränderungen zu beobachten ist. In welcher Art und Weise in den P0-defizienten Tieren die Schwannzelle mit dem Axon in Wechselwirkung tritt, ist bislang noch ungeklärt.

#### **4. Ausblick**

In unserer Studie konnte gezeigt werden, dass Merkelzellen in ihrer Entwicklung und ihrem Fortbestand in P0-defizienten Tieren durch den Gendefekt beeinflusst werden und ihre Anzahl mit fortschreitendem Alter der Tiere abnimmt.

Da die P0-defizienten Tiere das korrespondierende Tiermodell der Déjérine-Sottas-Neuropathie darstellen, könnte man in nachfolgenden Untersuchungen in Biopsien erkrankter Patienten feststellen, ob dieser progrediente Verlust der Merkelzellichte auch im humanen Gewebe der Patienten zu finden ist.

In einem klinischen Zusammenhang betrachtet, könnte die Untersuchung der Merkelzellichte mittels Biopsie als Parameter der Krankheitsaktivität in Patienten zur Anwendung kommen.

Die Technik der Hautbiopsie bringt dabei einige Vorteile. Sie ist einfach durchzuführen, schmerzarm und nur mit geringen Nebenwirkungen assoziiert. Merkelzellen sind in den Biopsien einfach und klar durch kommerziell erhältliche Färbungen unter dem Lichtmikroskop zu identifizieren und zu quantifizieren. Die Biopsien können an verschiedenen Körperstellen entnommen werden und dort über regionale Unterschiede der Krankheitsausprägung Auskunft geben. Zudem kann diese Technik in Serien wiederholt und damit die Krankheitsprogression überprüft werden. Außerdem könnte man mit Hilfe der Bestimmung der Merkelzellichte in Biopsien vom Patient und auch vom Tiermodell neue therapeutische Ansätze testen und deren Wirkung verifizieren.

## E. GLOSSAR

BSA	Bovines Serumalbumin
B & S 5x Puffer	Blockierpuffer- Stammlösung
B & S 1x Puffer	5fach verdünnter Blockierpuffer
CGRP	Calcitoningene-related peptide
CH	Congenitale Hypomyelinisierung
CK 20	monoklonaler Antikörper gegen Cytokeratin 20
CMT	Charcot-Marie-Tooth-Erkrankung
Cx32	Connexin32
DAB	3,3'-Diaminobenzidinetetrahydrochlorid
DNES	Diffuses neuroendokrines System
DSS	Déjérine-Sottas-Syndrom
ELISA	Enzym linked immunosorbant assay
EGR2	Early growth response 2 zinc finger protein
HMSN	Hereditäre motorisch-sensorische Neuropathien
HNPP	Hereditary neuropathy with liability to pressure palsies
HRP	horseradish peroxidase
HS	Haarscheiben
mAb	monoklonaler Antikörper gegen NGF bzw. NT-3
MAG	Myelin-associated glycoprotein
MC	Merkelzellen
MPZ	Myelinprotein Zero, P0
NaCl	Natriumchlorid
NF	Nervenfaser
NG	Nassgewicht
NGF	Nerve Growth Factor
NGS	Normal Goat Serum
NLG	Nervenleitgeschwindigkeit
n.s.	nicht signifikant
NSE	Neuron-spezifische Enolase
NT	Neurotrophin
pAb	polyklonaler Antikörper

PB	0,1 molarer Phosphatpuffer, pH 7,4
PBS	0,1 molarer saliner Phosphatpuffer, pH 7,4
PGP 9.5	polyklonales Genprodukt 9.5
PMP22	Peripheres Myelinprotein 22
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
P0+/+	Wildtyp-Mäuse
P0-/-	P0-defiziente Mäuse
SA	Slowly adapting
SEM	Standardfehler, Standard Error of Mean
TBST	Tris buffered saline tween included- Waschpuffer
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
trk	Tyrosinkinase
VIP	Vasoaktives intestinales Peptid

## F. Literatur

- Airaksinen, M.S., Koltzenburg, M., Lewin, G.R., Masu, Y., Helbig, C., Wolf, E., Brem, G., Toyka, K.V., Thoenen, H., Meyer, M. (1996) Specific subtypes of cutaneous mechanoreceptors require neurotrophin-3 following peripheral target innervation. *Neuron* 16:287-295.
- Albers, K.M., Perrone, T.N., Goodness, T.P., Jones, M.E., Green, M.A., Davies, B.M. (1996) Cutaneous over expression of NT-3 increases sensory and sympathetic neuron number and enhances touch dome and hair follicle innervation. *J. Cell Biol.* 134, 2:487-497.
- Barbacid, M. (1994) The TRK family of neurotrophin receptors. *J. Neurobiol.*, Vol. 25:1386-1403
- Ben Othmane, K., Middleton, L.T., Loprest, L.J., Wilkinson, K.M., Lennon, F., Rozear, M.P. et al. (1993) Localization of a gene (CMT2A) for autosomal dominant Charcot-Marie-Tooth disease type 2 to chromosome 1p and evidence of genetic heterogeneity. *Genomics*, 17:370-375.
- Bennett, D.L.H., Koltzenburg, M., Priestley, J.V., Shelton, D.L., McMahon, S.B. (1998) Endogenous nerve growth factor regulates the sensitivity of nociceptors in the adult rat. *Eur. J. Neurosci.*, 10:1282-1291.
- Bergmann, I., Priestley, J.V., McMahon, S.B., Bröcker, E.-B., Toyka, K.V., Koltzenburg, M. (1997) Analysis of cutaneous sensory neurons in transgenic mice lacking the low affinity neurotrophin receptor p75. *Eur. J. Neurosci.*, 9:18-28.
- Bergoffen, J., Scherer, S.S., Wang, S., Scott, M.O., Bone, L.J., Paul, D.L. et al. (1993b) Connexin mutations in X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *Science*, 262:2039-2042.
- Bird, T.D., Kraft, G.H., Lipe, H.P., Kenney, K.L., Sumi, S.M. (1997) Clinical and pathological phenotype of the original family with Charcot-Marie-Tooth Type 1B: A 20-year study. *Ann. Neurol.*, 41:463-469.
- Buchman, V.L., Davies, A.M. (1993) Different neurotrophins are expressed and act in a developmental sequence to promote the survival of embryonic sensory neurons. *Development*, 118:989-1001.
- Carenini, S., Martini, R. (2000) Myelin-defiziente Mutanten des peripheren Nervensystems: Chancen für Behandlungsstrategien erblicher Neuropathien? In: *Neuroforum*, Spektrum-Verlag, pp 216-228.
- Chao, M.V., Bothwell, M.A., Ross, A.H., Koprowski, H. (1986) Gene transfer and molecular cloning of the human NGF receptor. *Science*, 232:518-521.

- Charcot, J.-M., Marie, P. (1886) Sur une forme particulière d'atrophie musculaire progressive souvent familial débutant par les pieds et les jambes et atteignant plus tard les mains. *Rev. Méd.*, 6:97.
- Cole, J.S., Messing, A., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M.-Y. (1994) Modulation of axon diameter and neurofilaments by hypomyelinating Schwann cells in transgenic mice. *J. Neurosci.*, 14(11):6956-6966.
- Davies, A.M., Bandtlow, C., Heumann, R., Korsching, S., Rohrer, H., Thoenen, H. (1987) Timing and site of nerve growth factor synthesis in developing skin in relation to innervation and expression of the receptor. *Nature*, 326:353-358.
- Davies, A.M., Lewin, G.R., Mendell, L.M., Jones, M.E., Albers, K.M. (1993) Altered expression of nerve growth factor in the skin of transgenic mice leads to changes in response to mechanical stimuli. *Neuroscience*, 56:789-792.
- Déjérine, J., Sottas, J. (1893) Sur la névrite: interstitielle, hypertrophique et progressive de l'enfance. *C. R. Soc. Biol. (Paris)* 45:63.
- De Jonghe, P., Timmerman, V., Ceuterick, C., Nelis, E., De Vriendt, E., Löfgren, A., Vercruyssen, A., Verellen, C., Van Maldergem, L., Martin, J.-J., Van Broeckhoven, C. (1999) The Thr124Met mutation in the peripheral myelin protein zero (MPZ) gene is associated with a clinically distinct Charcot-Marie-Tooth phenotype. *Brain*, 122:281-290.
- De Jonghe, P., Timmerman, V., Nelis, E., Martin, J.-J., Van Broeckhoven, C. (1997) Charcot-Marie-Tooth disease and related peripheral neuropathies. *J. Periph. Nerv. Syst.*, 2:370-387.
- De Waegh, S.M., Lee, V.M.-Y., Brady, S.T. (1992) Local modulation of neurofilament phosphorylation, axonal caliber and slow axonal transport by myelinating Schwann cells. *Cell*, 68:451-463.
- Diamond, J., Holmes, M., Coughlin, M. (1992) Endogenous NGF and nerve impulses regulate the collateral sprouting of sensory axons in the skin of the adult rat. *J. Neurosci.*, 12:1454-1466.
- Di Marco, E., Marchisio, P.C., Bondanza, S., Franzi, A.T., Cancedda, R., De Luca, M. (1991) Growth-regulated synthesis and secretion of biologically active nerve growth factor by human keratinocytes. *J. Biol. Chem.*, 266:21718-21722.
- Dyck, P.J. (1975) Inherited neuronal degeneration and atrophy affecting peripheral motor, sensory and autonomic neurons. In: *Peripheral Neuropathy*, Dyck, P.J., Thomas, P.K., Lambert, E.H. (eds.), Philadelphia: W.B.Saunders, pp 825-867.
- Dyck, P.J., Chance, P., Lebo, R., Carney, J.A. (1993) Hereditary motor and sensory neuropathies. In: *Peripheral Neuropathy*, Dyck, P.J., Thomas, P.K., Griffin, J.W., Low, P.A., Poduslo, J.F. (eds.), Philadelphia: W.B.Saunders, pp 1094-1136.

- Dyck, P.J., Gutrecht, J.A., Bastron, J.A. et al. (1968) Histologic and teased-fiber measurements of sural nerve in disorders of lower motor and primary sensory neurons. *Mayo Clinical Proc.* 43:81.
- Eide, F.F., Lowenstein, D.H., Reichardt, L.F. (1993) Neurotrophins and their receptors-Current concepts and implications for neurologic disease. *Exp. Neurol.*, 121:200-214.
- English, K.B. (1974) Cell types in cutaneous type I mechanoreceptors (Haarscheiben) and their alterations with injury. *Am. J. Anat.*, 141:105-126.
- English, K.B. (1977) Morphogenesis of Haarscheiben in rats. *J. Inv. Derm.*, 69:58-67.
- English, K.B., Burgess, P.R., Norman, D.K.-V. (1980) Development of the rat Merkel cells. *J. Comp. Neurol.*, 194:475-496.
- English, K.B., Harper, S., Stayner, N., Wang, Z.M., Davies, A.M. (1994) Localization of nerve growth factor (NGF) and low-affinity NGF receptors in touch domes and quantification of NGFmRNA in keratinocytes of adult rats. *J. Comp. Neurol.*, 344:470-480.
- Ernfors, P., Lee, K.-F., Kucera, J., Jaenisch, R. (1994) Lack of neurotrophin-3 leads to deficiencies in the peripheral nervous system and loss of limb proprioceptive afferents. *Cell*, 77:502-512
- Farinas, I., Jones, K.R., Backus, C., Wang, X.-Y., Reichardt, L.F. (1994) Severe sensory and sympathetic deficits in mice lacking neurotrophin-3. *Nature*, 369:658-661.
- Frei, R., Mötzing, S., Kinkelin, I., Schachner, M., Koltzenburg, M., Martini, R. (1999) Loss of distal axons and sensory Merkel cells and features indicative of muscle denervation in hindlimbs of P0- deficient mice. *J. Neurosci.*, 19(14): 6058-6067
- Giese, K.P., 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.
- Götz, R., Köster, R., Winkler, C., Raulf, F., Lottspeich, F., Scharl, M., Thoenen, H. (1994) Neurotrophin-6 is a new member of the nerve growth factor family. *Nature*, 372:266-269.
- Halata, Z. (1975) The mechanoreceptor of the Mammalian skin. Ultrastructure and morphological classification. *Adv. Anat. Embryol. Cell. Biol.*, 50:1-77.
- Halata, Z. (1993) Sensory innervation of the hairy skin (light- and electronmicroscopic study). *J. Invest. Dermatol.*, 101:75S-81S.
- Harding, A.E. (1995) From the syndrome of Charcot, Marie and Tooth to disorders of peripheral myelin proteins. *Brain*, 118:809-818.

- Harper, S., Davies, A.M. (1990) NGF mRNA expression in developing cutaneous epithelium related to innervation density. *Development*, 110:515-519.
- Hartschuh, W., Weihe, E., Reinecke, M. (1986) The Merkel Cell. In: *Biology of the Integument*, Bereiter-Hahn, H., Matolsky, A.G., Richards, K.S. (eds.), Berlin: Springer Verlag, pp 605-617.
- Hayasaka, K., Himoro, M., Sato, W., Takada, G., Uyemura, K., Shimizu, N. et al. (1993a) Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 1B is associated with mutations of the myelin P0 gene. *Nature Genet.*, 5:31-34.
- Hayasaka, K., Himoro, M., Sawaishi, Y., Nanao, K., Takahashi, T., Takada, G. et al. (1993c) De novo mutation of the myelin P0 gene in Déjérine-Sattos disease (hereditary motor and sensory neuropathy type III ). *Nat.Genet.* 5:266-268.
- Hayasaka, K., Takada, G., Ionasescu, V. V. (1993b) Mutation of the myelin P0 gene in Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 1B. *Hum. Mol. Genet.*, 2:1369-1372.
- Herrmann, D.N., Griffin, J.W., Hauer, P., Cornblath, D.R., McArthur, J.C. (1999) Epidermal nerve fiber density and sural nerve morphometry in peripheral neuropathies. *Neurology*, 53:1634-1640.
- Hoffman, P.N., Griffin, J.W., Price, D.L. (1984) Control of axonal caliber by neurofilament transport. *J. Cell Biol.*, 99:705-714.
- Holland, N.R., Crawford, T.O., Hauer, P., Cornblath, D.R., Griffin, J.W., McArthur, J.C. (1998) Small-fiber sensory neuropathies: Clinical course and neuropathology of idiopathic cases. *Ann. Neurol.*, 44:47-59.
- Holland, N.R., Stocks, A., Hauer, P., Cornblath, D.R., Griffin, J.W., McArthur, J.C. (1997) Intraepidermal nerve fiber density in patients with painful sensory neuropathy. *Neurology*, 48:708-711.
- Hsieh, S.T., Choi, S., Lin, W.M., Chang, Y.C., McArthur, J.C., Griffin, J.W. (1996) Epidermal denervation and its effects on keratinocytes and Langerhans cells. *J. Neurocyt.*, 25:513-524.
- Hsieh, S.T., Kidd, G.J., Crawford, T.O., Xu, Z., Lin, W.M., Trapp, B.D., Cleveland, D.W., Griffin, J.W. (1994) Regional modulation of neurofilament organization by myelination in normal axons. *J. Neurosci.*, 14:6392-6401.
- Iggo, A. (1974) Cutaneous receptors. In: *The Peripheral Nervous System*, Hubbard, J., (ed.), New York: Plenum Press, pp 347-404.
- Iggo, A., Muir, A.R. (1969) The structure and function of a slowly adapting touch corpuscle in hairy skin. *J. Physiol.*, 200:763-796.
- Ionasescu, V., Searby, C., Sheffield, V.C., Roklina, T., Nishimura, D., Ionasescu, R. (1996) Autosomal dominant Charcot-Marie-Tooth axonal neuropathy mapped on chromosom 7p (CMT2D). *Hum. Mol. Gen.*, 5:1373-1375.

- Ip, N.Y., Ibanez, C.F., Nye, S.H., McClain, J., Jones, P.F., Gies, D.R., Belluscio, L., Le Beau, M.M., Espinosa, R., Squinto, S.P., Perrson, H., Yancopoulos, G. (1992) Mammalian neurotrophin-4: structure, chromosomal localization, tissue distribution and receptor specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 89:3060-3064.
- Kennedy, W.R., Wendelschafer-Crabb, G., Brelje, T.C. (1994) Innervation and vasculature of human sweat glands: an immunohistochemistry-laser scanning confocal fluorescence microscopy study. *J. Neurosci.*, 14:6825-6833.
- Kennedy, W.R., Wendelschafer-Crabb, G., Johnson, T. (1996) Quantification of epidermal nerves in diabetic neuropathy. *Neurology* 47:1042-1048.
- Kinkelin, I., Stucky, C.L., Koltzenburg, M. (1999) Postnatal loss of Merkel cells, but not of slowly adapting mechanoreceptors in mice lacking the neurotrophin receptor p75. *Eur. J. Neurosci.*, 11:3963-3969.
- Klein, R., Jing, S.Q., Nanduri, V., O'Rourke, E., Barbacid, M. (1991a) The *trk* proto-oncogene encodes a receptor for nerve growth factor. *Cell*, 65:189-197.
- Korsching, S., Thoenen, H. (1988) Developmental changes of nerve growth factor levels in sympathetic ganglia and their target organs. *Dev. Biol.*, 126:40-46.
- Krimm, R.F., Davies, B.M., Albers, K.M. (1999) Cutaneous overexpression of neurotrophin-3 (NT-3) selectively restores sensory innervation in NT3 gene knockout mice. *J. Neurobiol.*, 43:40-49.
- Kucera, J., Fan, G., Jaenisch, R., Linnarsson, S., Enfors, P. (1995) Dependence of developing group Ia afferents on neurotrophin-3. *J. Comp. Neurol.*, 363:307-320.
- Kwon, J.M., Elliott, J.L., Yee, W.C., Ivanovich, J., Scavarda, N.J., Moolsintong, P.J. et al. (1996) Assignment of a second Charcot-Marie-Tooth type II locus to chromosome 3q. *Am. J. Hum. Genet.*, 59:258-262.
- Langerhans, P. (1868) Über die Nerven der menschlichen Haut. *Virchow's Archiv* 44:325-337.
- Lai, K.O. (1998) Cloning and expression of a novel neurotrophin, NT-7, from *C. elegans*. *Mol. Cell. Neurosci.*, 11:64-76.
- Lamballe, F., Klein, R., Barbacid, M. (1991) *trk C*, a new member of the *trk* family of tyrosine protein kinases, is a receptor for neurotrophin 3. *Cell*, 66:967-979.
- Lemke, G., Axel, R. (1985) Isolation and sequence of a cDNA encoding the major structural protein of the peripheral myelin. *Cell*, 40:501-508.
- Lemke, G., Lamar, E., Patterson, J. (1988) Isolation and analysis of the gene encoding peripheral myelin protein zero. *Neuron*, 1:73-83.

- Lewin, G.R., Barde, Y.-A. (1996) Physiology of the neurotrophins. *Ann. Rev. Neurosci.*, 19:289-317.
- Lindsay, R.M., Harnmar, A.J. (1989) Nerve growth factor regulates expression of neuropeptide genes in adult sensory neurons. *Nature*, 337:362-364.
- Li, Y., Hsieh, S.-T., Chien, H.-F., Zhang, X., McArthur, J.C., Griffin, J.W. (1997) Sensory and motor denervation influence epidermal thickness in rat foot glabrous skin. *Exp. Neurol.*, 147:452-462.
- Lupski, J.R., Montes de Oca-Luna, R., Slaugenhaupt, S. et al. (1991) DNA duplication associated with Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Cell*, 66:219-232.
- Martini, R. (2001) The effect of myelinating Schwann cells on axons. *Muscle & Nerve*, 24(4):456-466.
- Martini, R. (1997) Animal models for inherited peripheral neuropathies. *J. Anat.* 191:321-336.
- Martini, R., Mohajeri, M.H., Kasper, S., Giese, K.P., Schachner, M. (1995b) Mice doubly deficient in the genes for P0 and myelin basic protein show that both proteins contribute to the formation of the major dense line in peripheral nerve myelin. *J. Neurosci.*, 15:4488-4495.
- Martini, R., 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., Zielasek, J., Toyka, K.V., Giese, K.P., Schachner, M. (1995a) Protein zero (P0)-deficient mice show myelin degeneration in peripheral nerves characteristic of inherited human neuropathies. *Nat. Genet.*, 11:281-286.
- McArthur, J.C., Stocks, E.A., Hauer, P., Cornblath, D.R., Griffin, J.W. (1998) Epidermal nerve fiber density. *Arch. Neurol.*, 55:1513-1520.
- McCarthy, B.G., Hsieh, S.T., Stocks, A., Hauer, P., Macko, C., Cornblath, D.R., Griffin, J.W., McArthur, J.C. (1995) Cutaneous innervation in sensory neuropathies: Evaluation by skin biopsy. *Neurology*, 45:1848-1855.
- Merkel, F. (1875) Tastzellen und Tastkörperchen bei den Haustieren und beim Menschen. *Arch. Mikrosk. Anat.*, 11:636-652.
- Mills, L.R., Nurse, C.A., Diamond, J. (1984) Regional differences in the sensory nerve dependence of Merkel cell development in rat skin. *Soc. Neurosci. Abstr.*, 14:307-315.
- Mills, L.R., Nurse, C.A., Diamond, J. (1989) The neural dependency of Merkel cell development in the rat: The touch domes and foot pads contrasted. *Dev. Biol.*, 136:61-74.

- Moll, R., Löwe, A., Laufer, J., Franke, W.W. (1992). Cytokeratin 20 in Human Carcinomas. *Am. J. Path.*, 140:427-447.
- Moll, R., Moll, I., Franke, W.W. (1984) Identification of Merkel cells in human skin by specific cytokeratin antibodies: changes of cell density and distribution in fetal and adult plantar epidermis. *Differentiation*, 28:136-154.
- Moll, R., Schiller, D.L., Franke, W.W. (1990) Identification of Protein IT of the intestinal cytoskeleton as a novel type I cytokeratin with unusual properties and expression patterns. *J. Cell. Biol.*, 111:567-580.
- Narisawa, Y., Hashimoto, K. (1991) Immunohistochemical demonstration of nerve-Merkel cell complex in fetal human skin. *J. Dermatol. Sci.*, 2:361-370.
- Narisawa, Y., Kohda, H. (1995) Merkel cells do not require trophic maintenance from the nerves in adult human skin. *Br. J. Dermatol.*, 133:553-556.
- Nilsson, A.-S., Fainzilber, M., Falck, P., Ibanez, C.F. (1998) Neurotrophin-7: a novel member of the neurotrophin family from the zebrafish. *FEBS Letters*, 424:285-290.
- Nurse, C.A., Diamond, J. (1984) A fluorescent microscopic study of the development of rat touch domes and their Merkel cells. *Neuroscience*, 11(2):509-520.
- Nurse, C.A., Macintyre, L., Diamond, J. (1984a) A quantitative study of the time course of the Reduction in Merkel cell number within denervated rat touch domes. *Neuroscience*, 11:521-533.
- Nurse, C.A., Macintyre, L., Diamond, J. (1984b) Reinnervation of the rat touch dome restores the Merkel cell population reduced after denervation. *Neuroscience*, 13(2):563-571.
- Nurse, C.A., Mearow, K.M., Holmes, M., Visheau, B., Diamond, J. (1983) Merkel cell distribution in the epidermis as determined by quinacrine fluorescence. *Cell. Tiss. Res.*, 228:511-524.
- Ochiai, T., Suzuki, H. (1981) Fine structural and morphometric studies of the Merkel cell during fetal and postnatal development. *J. Invest. Dermat.*, 77:437-443.
- Okragly, A.J., Haak-Frendscho, M. (1997) An acid-treatment method for enhanced detection of GDNF in biological samples. *Exp. Neurol.*, 145:592-596.
- Osborne, N., Neuhoff, V. (1985) The chemical specificity of cells in the mammalian retina: Immunohistochemical evidence. *Funct. Biol. Med.*, 4:7-13.
- Pasche, F., Mérot, Y., Carraux, P., Saurat, J.-H. (1990) Relationship between Merkel cells and nerve endings during embryogenesis in the mouse epidermis. *J. Invest. Dermatol.*, 95:247-251.

- Ridley, A. (1969) Silver staining of nerve endings in human digital glabrous skin. *J. Anat.*, 104:41-48.
- Roa, B.B., Dyck, P.J., Marks, H.G., Chance, P.F., Lupski, J.R. (1993a) Déjérine-Sottas syndrom associated with point mutation in the peripheral myelin protein 22 (PMP 22) gene. *Nature Genet.*, 5:269-273.
- Roa, B.B., Garcia, C.A., Suter, U., Kulpa, D.A., Wise, C.A., Mueller, J., Welcher, A.A., Snipes, G.J., Shooter, E.M., Patel, P.I., Lupski, J.R. (1993b) Charcot-Marie-Tooth disease type 1A: Association with spontaneous point mutation in the PMP 22 gene. *N. Engl. J. Med.*, 329:96-101.
- Sahenk, Z., Chen, L. (1998) Abnormalities in the axonal cytoskeleton induced by a Connexin32 mutation in nerve xenografts. *J. Neurosci. Res.*, 51:174-184.
- Said, G.G., Slama, G., Selva, J. (1983) Progressive centripedal degeneration of axons in small fibre diabetic polyneuropathy. *Brain*, 106:791-807.
- Sanders, S., Nicholson, G.A., McLeod, J.G., Pollard, J.D. (1998) Charcot-Marie-Tooth disease: histopathological features of the peripheral myelin protein (PMP22) duplication (CMT1A) and connexin32 mutations (CMTX1). *Muscle & Nerve* 21:217-225.
- Scherer, S.S., Xu, Y.T., Nelles, E., Fischbeck, K.H., Willecke, K., Bone, L.J. (1998) Connexin32-null mice develop demyelinating peripheral neuropathy. *Glia*, 24:8-20.
- Snider, W.D. (1994) Functions of the Neurotrophins during Nervous System Development: What the Knockouts Are Teaching Us. *Cell*, 77:627-638.
- Thoenen, H., Bandtlow, C., Heumann, R. (1987) The physiological function of nerve growth factor in the central nervous system: Comparison with the periphery. *Rev. Physiol. Biochem. Pharm.*, 109:145-178.
- Thompson, R.J., Doran, J.F., Jackson, P., Dhillon, A.P., Rode, J. (1983) PGP 9.5 - a new marker for vertebrate neurons and neuroendocrine cells. *Brain Res.*, 278:224-228.
- Verge, V.M.K., Richardson, P.M., Wiesenfeld-Hallin, Z., Hökfelt, T. (1995) Differential influence of nerve growth factor on neuropeptide expression in vivo: A novel role in peptide suppression in adult sensory neurons. *J. Neurosci.*, 15:2081-2096.
- Wang, L., Hilliges, M., Jernberg, T., Wiegleb-Edström, D., Johansson, O. (1990) Protein gene product 9.5- immunoreactive nerve fibres and cells in human skin. *Cell. Tiss. Res.*, 261:25-33.
- Warner, L.E., Garcia, C.A., Lupski, J.R. (1999) Hereditary peripheral neuropathies: Clinical forms, genetics, and molecular mechanisms. *Ann. Rev. Med.*, 50:263-275.

- Warner, L.E., Hilz, M.J., Appel, S.H., Killian, J.M., Kolodny, E.H., Karpati, G., Carpenter, S., Watters, G.V., Wheeler, C., Witt, D., Bodell, A., Nelis, E., Van Broeckhoven, C., Lupski, J.R. (1996) Clinical phenotypes of different MPZ (P0) mutations may include Charcot-Marie-Tooth 1B, Déjérine-Sottas, and congenital hypomyelination. *Neuron*. 17:451-460.
- Warner, L.E., Mancias, P., Butler, I.J., McDonald, C.M., Keppen, L., Koob, K.G. (1998) Mutations in the early growth response 2 (EGR2) gene are associated with hereditary myelinopathies. *Nat. Gen.*, 18:382-384.
- Watson, D.F., Nachtman, F.N., Kuncl, R.W., Griffin, J.W. (1994) Altered neurofilament phosphorylation and beta tubulin isotypes in Charcot-Marie-Tooth disease type I. *Neurology*, 44:2383-2387.
- Wilkinson K.D., Lee, K., Deshpande, S., Duerksen-Hughes, P., Boss, J.M., Pohl, J. (1989) The neuron-specific protein PGP 9.5 is a ubiquitin carboxyl-terminal hydroxylase. *Science*, 246:670-673.
- Witt, A., Brady, S.T. (2000) Unwrapping new layers of complexity in axon/glia relationships. *Glia* 29:112-117.
- Wolf, C.J., Ma, Q.P., Allchorne, A., Poole, S. (1996) Peripheral cell types contributing to the hyperalgesic action of nerve growth factor in inflammation. *J. Neurosci.* 16(8):2716-2723.
- Yin, X., Crawford, T.O., Griffin, J.W., Tu, P.H., Lee, V.M.-Y., Li, C., Roder, J., Trapp, B.D. (1998) Myelin-associated glycoprotein is a myelin signal that modulates the caliber of myelinated axons. *J. Neurosci.*, 18(6):1953-1962.
- Young, P., Suter, U. (2001) Disease mechanisms and potential therapeutic strategies in Charcot-Marie-Tooth disease. *Brain Res. Rev.* 36: 213-221.
- Zelená, J. (1994) Merkel cell receptors. In: *Nerves and Mechanoreceptors*, Zelená, J. (ed), London: Chapman & Hall, pp 186-217.
- Zettler, C., McLeod, D.C., Zhou, X.-F., Rush, R.A. (1996) Detection of increased tissue concentrations of nerve growth factor with an improved extraction procedure. *J. Neurosci. Res.*, 46:581-594.
- Zielasek, J., Martini, R., Toyka, K.V. (1996) Functional abnormalities in P0- deficient mice resemble human hereditary neuropathies linked to P0 gene mutations. *Muscle & Nerve*, 19:946-952.

## **G. DANKSAGUNG**

Ich danke Herrn Prof. Dr. Martin Koltzenburg für die freundliche Überlassung des Themas, insbesondere für die mir gebotenen Arbeitsmöglichkeiten im Rahmen seiner ehemaligen Arbeitsgruppe an der neurologischen Universitätsklinik in Würzburg, sowie für die kritische Durchsicht des Manuskriptes.

Besonderer Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Rudolf Martini für die Bereitstellung der Mäuse und für die Übernahme des Korreferates. Er war stets bereit für eine produktive und fachliche Diskussion.

Ein ganz besonderer Dank gilt Dr. Ilka Kinkelin für die hervorragende Betreuung, für ihre fachlichen und methodischen Ratschläge und für ihren stetigen Optimismus.

"Hab nix verstanden, hat aber trotzdem Spaß gemacht"- vielen Dank für die Mühe bei der Rechtschreibprüfung, Stefan Kinkelin!

Außerdem möchte ich herzlich meiner Freundin Dr. Sabine Guth danken, die mich stets motiviert hat und in computertechnischen Fragen fast immer eine Lösung fand.

Wertvolle Hilfe erhielt ich von den Mitarbeitern der ehemaligen Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Koltzenburg, von Regula Frei aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Martini und von den Mitarbeiterinnen des histologischen Labors der neurologischen Universitätsklinik Würzburg.

## **H. LEBENS LAUF**

### **Persönliche Daten**

Name: Sandra Mötzing  
Geb.-Datum/-ort: 17. April 1972, Bad Hersfeld  
Familienstand: ledig  
Wohnort: Hans-Sachs-Weg 14  
97082 Würzburg  
Telefon: 0931/ 882708

### **Schul Ausbildung**

1978 - 1984 Grundschole und Förderstufe in Heringen  
1984 - 1991 Gesamtschole Heringen, Gymnasialzweig  
Abitur 1991

### **Berufsausbildung**

11/1991 - 09/1993 Staatliche Berufsfachschule für Med. Tech. Assistenten  
an der MTA- Schule Würzburg, Staatsexamen 1993

### **Hochschulausbildung**

11/1993 - 03/2001 Studium der Humanmedizin an der Universität Würzburg  
09/1995 Ärztliche Vorprüfung  
08/1996 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
03/1999 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
10/1999 - 09/2000 Praktisches Jahr  
11/2000 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

### **Berufliche Tätigkeit:**

seit Februar 2001 Ärztin im Praktikum an der Universitäts-Hautklinik  
Würzburg (Direktorin: Prof. Dr. Eva-B. Bröcker)

Würzburg, den 29. Januar 2002