



# Charakterisierung der Funktion des Chemokinrezeptors CCR2 bei der Aktivierung von Makrophagen in peripheren Nerven von Myelinprotein Null (P0) Mutanten

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften im Fachbereich Biologie  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von

Martina Oberländer

aus Frankfurt am Main

2009



Dekan:	Prof. Dr. Christian Klämbt
Erster Gutachter:	Prof. Dr. Martin Bühler
Zweiter Gutachter:	Prof. Dr. Peter Young
Tag der mündlichen Prüfung:	<u>11.12.2009</u>
Tag der Promotion:	<u>18.12.2009</u>





*Meinen Eltern*



## Zusammenfassung

### Charakterisierung der Funktion des Chemokinrezeptors CCR2 bei der Aktivierung von Makrophagen in peripheren Nerven von Myelinprotein Null (P0) Mutanten

- Martina Oberländer -

Hereditäre Neuropathien (Charcot-Marie-Tooth Erkrankungen, CMT) sind chronische Erkrankungen des peripheren Nervensystems, die durch eine gestörte Bildung von Myelinscheiden und deren Degeneration sowie durch axonalen Verlust gekennzeichnet sind. Klinische Merkmale dieser Nervenerkrankungen sind progrediente Paresen, Muskelatrophien und Sensibilitätsstörungen, die zu einer erheblichen Behinderung bis hin zur Rollstuhlabhängigkeit führen können. Als Ursache der CMT-Erkrankungen konnten Mutationen in Genen identifiziert werden, die für den Aufbau und den Erhalt der Myelinschicht von großer Bedeutung sind. Hierzu zählt das von Schwann-Zellen exprimierte Myelinprotein Null (P0), ein homophiles Adhäsionsmolekül das ausschließlich im kompakten Myelin des peripheren Nervensystems lokalisiert ist.

P0-defiziente Mäuse stellen ein etabliertes Tiermodell zur Untersuchung der Pathogenese einiger Formen erblicher Neuropathien dar. Heterozygote P0-Defizienz (P0<sup>+/-</sup>) führt zur Demyelinisierung von Axonen, homozygote P0-Defizienz (P0<sup>-/-</sup>) zur Dysmyelinisierung und axonalem Verlust. Studien in P0-defizienten Mäusen belegen, dass Makrophagen und T-Lymphozyten funktionell an der Pathogenese experimenteller erblicher Neuropathien beteiligt sind. Ein möglicher Faktor, der eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung und Rekrutierung von Makrophagen in periphere Nerven dieser Tiere spielt ist das von Schwann-Zellen sezernierte pro-inflammatorische Chemokin CCL2. CCL2 bindet vornehmlich an den CC Chemokinrezeptor CCR2, der von Makrophagen und aktivierten T-Lymphozyten exprimiert wird. In Bezug auf die Funktion von CCL2 in peripheren Nerven P0-defizienter Mäuse ist zu vermuten, dass CCR2 eine pathogenetisch relevante Rolle bei der Aktivierung von Immunzellen in Modellen für hereditäre Neuropathien spielt.

Durch die Verkreuzung von CCR2-defizienten mit P0-defizienten Mäusen war es erstmals möglich, die Auswirkungen eines CCR2-Mangels auf die Aktivierung von Immunzellen in periphere Nerven dieser Tiere sowie auf die Myelinschädigung peripherer Nerven zu untersuchen.

Immunhistochemische und elektronenmikroskopische Analysen des N. femoralis zeigen, dass der Chemokinrezeptor CCR2 keinen Einfluss auf die Generierung der endoneuralen Makrophagen-Antwort in P0<sup>+/-</sup>-Mäusen hat, ein Mangel an CCR2 jedoch zu mehr morphologisch aktivierten Makrophagen und zu einer Zunahme an demyelinisierten Axonen führt. Molekularbiologische Untersuchungen deuten darauf hin, dass CCR2 in P0<sup>+/-</sup> Mäusen die Aktivierung von Makrophagen durch anti-inflammatorische Cytokine wie Interleukin-10 und Interleukin-4 moduliert und somit eine verstärkte Demyelinisierung peripherer Nerven verhindert. In P0<sup>-/-</sup> Mäusen führt die CCR2-Defizienz zu einer signifikanten Reduktion endoneuraler Makrophagen im N. plantaris, jedoch ohne Auswirkungen auf den axonalen Schaden. Die Anzahl an endoneuralen T-Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten ist aufgrund einer CCR2-Defizienz in P0<sup>-/-</sup> als auch in P0<sup>+/-</sup> Mäusen nicht beeinträchtigt. Analysen mittels *Fluorescence-activated cell sorting* (FACS) konnten zeigen, dass die CCR2-Defizienz zu einer deutlichen Reduktion an Monozyten im peripheren Blut P0-defizienter Mäuse führt, ohne die intrinsische Generierung endoneuraler Makrophagen in P0<sup>+/-</sup> Mäusen zu beeinflussen. Die signifikante Reduktion endoneuraler Makrophagen im N. plantaris von P0<sup>-/-</sup> Mäusen ist demnach ein Hinweis auf die Bedeutung von CCR2 für die Rekrutierung hämatogener Makrophagen. Diese Ergebnisse belegen eine funktionelle Rolle des CCR2 Chemokinsystems in der Pathogenese experimenteller P0-assoziiierter Neuropathien, das für die Entwicklung von zukünftigen Therapiestrategien in Betracht gezogen werden kann.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>3</b>
1.1	Hereditäre Neuropathien.....	3
1.2	Neurophysiologische Grundlagen.....	4
1.3	Das Myelinprotein Null (P0) und seine Rolle bei hereditären Neuropathien.....	8
1.4	Tiermodelle hereditärer Neuropathien.....	10
1.4.1	P0-defiziente Mausmodelle.....	10
1.5	Die Rolle des Immunsystems in Tiermodellen hereditärer Neuropathien.....	13
1.5.1	Chemokine in der Pathogenese hereditärer Neuropathien.....	16
1.6	Zielsetzung.....	20
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>23</b>
2.1	Antikörper.....	23
2.2	Chemikalien.....	24
2.3	Gebrausfertige Kits.....	25
2.4	Geräte.....	26
2.5	Puffer und Lösungen.....	27
2.6	Oligonukleotide.....	30
2.7	Software.....	30
2.8	Tierzucht.....	31
2.9	Methoden.....	32
2.9.1	Genotypisierung.....	32
2.9.2	Rotarod-Testung.....	34
2.9.3	Tierpräparation.....	34
2.9.4	Histologie.....	35
2.9.5	quantitative <i>Realtime</i> -PCR (qRT-PCR).....	43
2.9.6	Proteome Profiler™ Assay (Maus-Cytokin Array).....	51
2.9.7	Durchflusszytometrie ( <i>Fluorescence-Activated Cell Sorting</i> ).....	53
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>57</b>
3.1	Verhaltenstestung: Rotarod-Test.....	57
3.1.1	Rotarod-Testung P0 <sup>+/-</sup> Mäuse.....	57
3.1.2	Rotarod-Testung P0 <sup>-/-</sup> Mäuse.....	59
3.2	Quantifizierung von Immunzellen.....	60

3.2.1	Makrophagen.....	61
3.2.2	T-Zellen.....	65
3.2.3	Neutrophile Granulozyten.....	68
3.3	Elektronenmikroskopische Analysen.....	71
3.3.1	Morphologische Analysen des N. quadriceps femoris.....	72
3.3.2	Morphologische Analysen des N. plantaris.....	77
3.4	quantitative <i>Realtime</i> -PCR (qRT-PCR) Analysen.....	79
3.4.1	Bestimmung der RNA-Integrität.....	79
3.4.2	Validierung der qRT-PCR.....	80
3.4.3	Expressionsanalysen.....	81
3.5	Proteome Profiler™ Assay (Maus-Cytokin Array).....	85
3.5.1	Cytokingehalt in P0 <sup>+/+</sup> CCR2 <sup>+/+</sup> und P0 <sup>+/+</sup> CCR2 <sup>-/-</sup> Mäusen.....	86
3.5.2	Cytokingehalt in P0 <sup>+/-</sup> CCR2 <sup>+/+</sup> und P0 <sup>+/-</sup> CCR2 <sup>-/-</sup> Mäusen.....	88
3.6	Durchflusszytometrie ( <i>Fluorescence-Activated Cell Sorting</i> ).....	91
3.6.1	Differenzierung und Quantifizierung hämatogener Leukozyten-Populationen.....	91
4	<b>Diskussion</b> .....	<b>97</b>
4.1	Einfluss von CCR2 auf die motorische Leistungsfähigkeit P0-defizienter Mäuse.....	98
4.2	Einfluss von CCR2 auf die Aktivierung von Makrophagen und die Ausprägung der Nervenpathologie in P0-defizienten Mausmodellen.....	99
4.3	Einfluss von CCR2 auf die Expression inflammatorischer Cytokine und Chemokine	104
4.4	Einfluss von CCR2 auf die Rekrutierung von T-Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten.....	110
4.5	Differenzierung von Leukozyten-Populationen im Blut P0-defizienter Mäuse.....	113
5	<b>Schlussfolgerung</b> .....	<b>117</b>
6	<b>Veröffentlichungen</b> .....	<b>119</b>
7	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>121</b>
8	<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>133</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Hereditäre Neuropathien

Hereditäre Neuropathien gehören mit einer Prävalenz von 1: 2500 zu den häufigsten genetisch bedingten neurologischen Erkrankungen (Skre, 1974). Es handelt sich um chronisch progrediente Polyneuropathiesyndrome, die im Erkrankungsverlauf zu motorischen und sensiblen neurologischen Defiziten führen (Suter et al., 2003). Die häufigste Form vererbbarer Neuropathien sind Charcot-Marie-Tooth Erkrankungen (CMT), die erstmalig im Jahr 1886 durch die französischen Neurologen Jean Pierre Charcot und Pierre Marie (Charcot und Marie, 1886) und ferner Henry Tooth (Tooth, 1886) beschrieben wurden. CMT-Neuropathien, bei denen sowohl motorische als auch sensorische Nervenfasern betroffen sind wurden über viele Jahre zunächst anhand klinischer und elektrophysiologischer Merkmale in verschiedene Subgruppen klassifiziert (Dyck et al., 1993).

Zu den hereditären Neuropathien der Gruppe CMT1 zählen hauptsächlich demyelinisierende Formen mit einer frühen Symptomatik beginnend im ersten oder zweiten Lebensjahrzehnt. CMT1-Neuropathien sind gekennzeichnet durch eine geringe Nervenleitgeschwindigkeit des Nervus medianus ( $< 38$  m/sec), progrediente Muskelatrophien und Paresen sowie der Ausbildung eines Hohlfußes (*pes cavus*). Ferner bestehen Sensibilitätsstörungen (Kuhlenbaumer et al., 2002; Young et al., 2003). Pathologisch ist die CMT1 durch einen ausgeprägten Verlust von Myelin und myelinisierten Axonen im peripheren Nervensystem gekennzeichnet; weiterhin ist die Proliferation halbmondförmiger Schwann-Zellen zu beobachten, die dünn-myelinisierte Axone wie Zwiebelschalen (sog. „onion bulbs“) umgeben (Shy et al., 2005). Axonale Neuropathien, die häufig nach dem 20. Lebensjahr auftreten werden als CMT2 klassifiziert. Die Symptome sind ähnlich der CMT1, jedoch ist die Nervenleitgeschwindigkeit des N. medianus in geringerem Maße beeinträchtigt ( $> 38$  m/sec) (Harding et al., 1980; Dyck et al., 1993). Der langsam fortschreitende Verlauf der CMT führt zu einer erheblichen Behinderung bis hin zur Rollstuhlabhängigkeit.

Neben der CMT, die synonym auch als hereditäre motorisch-sensible Neuropathie (HMSN) bezeichnet wird, gibt es schwere, früh einsetzende Verlaufsformen wie das Dejerine-Sottas-Syndrom (DSS) und die kongenitale hypomyelinisierende Neuropathie (CHN). Wird die schwere Form der Neuropathie klinisch bereits nach der Geburt festgestellt, bezeichnet man sie als CHN, eine spätere klinische Manifestation im Kindesalter wird als DSS charakterisiert (Suter et al., 2003). DSS- und CHN-Patienten weisen neben den klassischen CMT-Symptomen eine generalisierte Muskelschwäche, schwere Sensibilitätsstörungen und stark reduzierte Nervenleitgeschwindigkeiten ( $< 10$  m/sec) auf (Warner et al., 1997; Scherer et al., 2008).

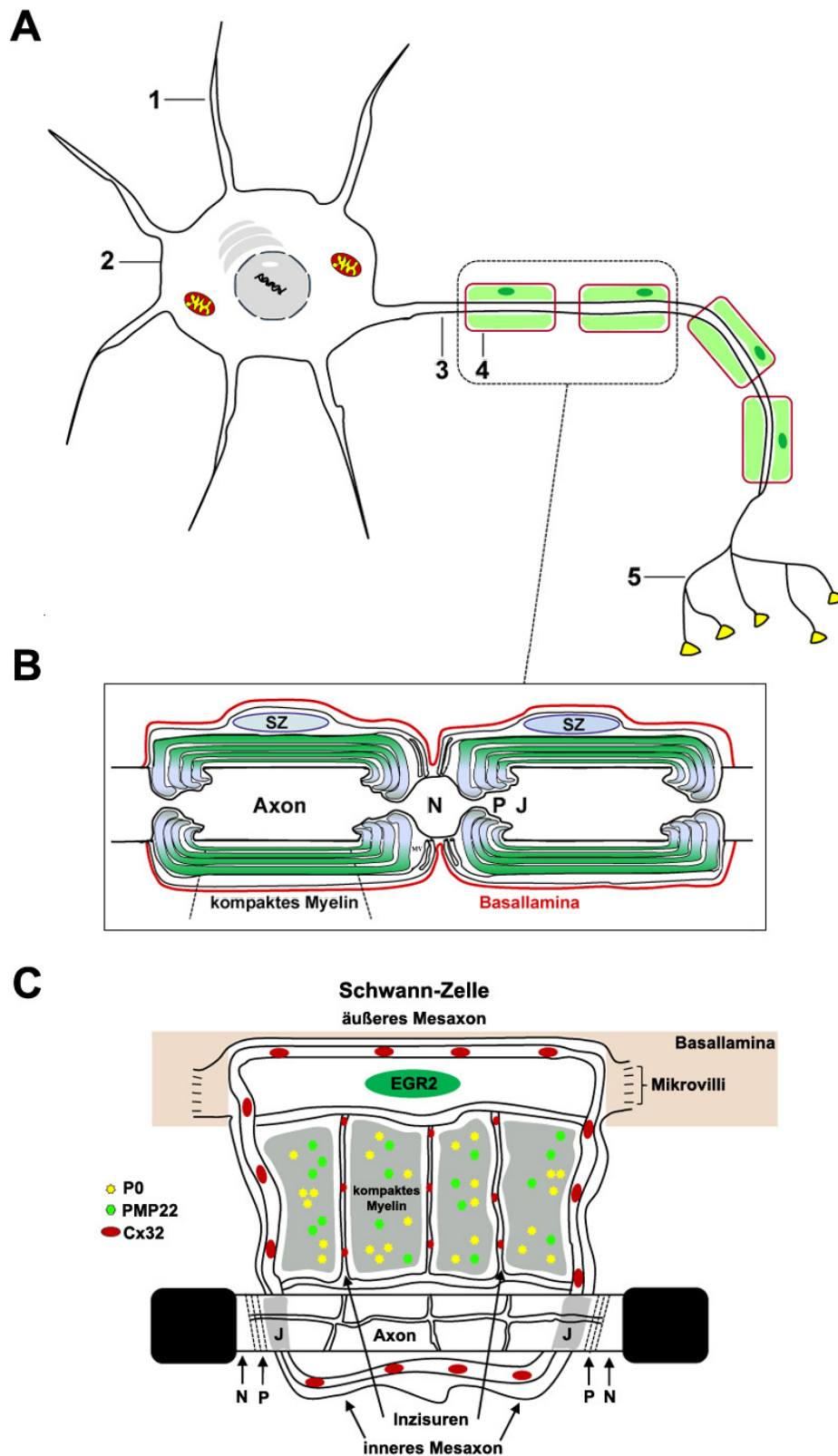
Molekulargenetische Untersuchungen machten es im Laufe der letzten Jahre möglich, mehr als 20 verschiedene Gene zu identifizieren, die mit einer CMT-Erkrankung in Verbindung stehen. Dabei befinden sich die meisten Mutationen in Genen, die für den Aufbau und den Erhalt der Myelinscheide von großer Bedeutung sind. Hierzu zählen vor allem das periphere Myelinprotein 22 (PMP22) (Lupski et al., 1991; Timmerman et al., 1992), das Myelinprotein Null (P0) (Hayasaka et al., 1993a), das *gap junction* Protein Connexin 32 (Cx32) (Bergoffen et al., 1993) sowie der Transkriptionsfaktor *early growth response 2* (EGR2) (Warner et al., 1998).

## 1.2 Neurophysiologische Grundlagen

Zu den grundlegenden Zellbausteinen des Nervensystems zählen Neurone, deren Aufgabe in der Weiterleitung und Übertragung von Signalen besteht. Ein weiterer wichtiger Bestandteil des Nervensystems sind Gliazellen, die als Stützelemente des neuronalen Bindegewebes fungieren.

Neurone weisen vier morphologisch definierte Bereiche auf (Abb. 1A). Der Zellkörper (Soma) enthält den Zellkern und eine Vielzahl spezifischer Organellen, wie beispielsweise Mitochondrien für Stoffwechselprozesse und das raue endoplasmatische Retikulum für die Proteinbiosynthese. Aus dem Soma entspringen zwei Typen von Fortsätzen, die als Dendriten und Axon (Neurit) kategorisiert sind. Ein Neuron kann zahlreiche verzweigte Dendriten besitzen, die dem Empfang von Signalen anderer Nervenzellen dienen.





**Abbildung 1.1:** (A) Schematische Darstellung eines myelinhaltigen Neurons mit definierten Bereichen: (1) Dendrit, (2) Zellsoma, (3) Axon, (4) Schwann-Zelle, (5) Telodendron mit synaptischen Endköpfen (B) schematische Architektur der Myelinscheide im Bereich eines Ranvier'schen Schnürrings. (SZ) Schwann-Zelle, (N) nodale Region, (P) paranodale Region, (J) juxtaparanodale Region. (C) Schematische Darstellung einer myelinisierenden Schwann-Zelle mit der Lokalisation von Proteinen, die mit der Pathogenese erblicher Neuropathien in Verbindung stehen (modifiziert nach Shy et al., 2006).

Aus dem Soma eines Neurons entspringt gewöhnlich nur ein einziges Axon, das als funktionelle Einheit dem Transport von Stoffwechselprodukten und der Erregungsweiterleitung dient. Myelinisierte Axone des peripheren Nervensystems sind von Schwann-Zellen umgeben, die längs eines Axons einen etwa 1 mm langen Teilabschnitt der Myelinscheide bilden. Zwischen den myelinisierten Abschnitten liegen unmyelinisierte Bereiche die als Ranvier'sche Schnürringe bezeichnet werden (Abb. 1B). Am Ende eines Axons befindet sich ein Verästelungsbereich, das Telodendron, an dessen Ende sich die synaptischen Endknöpfchen befinden. Diese präsynaptische Endigung des Axons bildet zusammen mit der Zellmembran der benachbarten Nervenzelle die Synapse. Durch die Ausschüttung spezifischer chemischer Botenstoffe (Neurotransmitter) in den synaptischen Spalt findet am postsynaptischen Neuron eine elektrische Erregung und somit die Weiterleitung eines Nervenimpulses statt. Die Verzweigungen eines Axons können Synapsen mit bis zu 1000 anderen Neuronen bilden.

Die Axone der Nervenzellen stehen mit Gliazellen in engem Kontakt. Neuroglia des zentralen Nervensystems (ZNS) werden von Cytoplasma-Ausläufern der Oligodendrozyten gebildet. Im peripheren Nervensystem werden Axone von Schwann-Zellen umgeben, die als Stützelement und elektrische Isolation gegen den Extrazellulärraum dienen. Die von Schwann-Zellen gebildete, in einer engen Spirale um das Axon angeordnete Lamellensubstanz wird als Myelin bezeichnet. Dabei unterscheidet man kompaktes und nicht-kompaktes Myelin, das sich an definierten Bereichen entlang des Axons befindet. Die Differenzierung von Schwann-Zellen sowie die Expression Myelin-assoziiierter Gene wie P0, PMP22 und Cx32 wird über Transkriptionsfaktoren wie beispielsweise den Zinkfinger-Transkriptionsfaktor EGR2 reguliert (LeBlanc et al., 2005; LeBlanc et al., 2006).

Die kompakte Myelinscheide besteht in ihrer Zusammensetzung aus Phospholipiden und Proteinen, zu denen hauptsächlich P0 und PMP22 sowie das basische Myelinprotein (MBP) und das Myelin-assoziierte Glykoprotein (MAG) zählen. Die um das Axon konzentrisch angeordneten Myelinschichten sind untereinander durch elektrostatische Wechselwirkungen und Protein-Protein Interaktionen stabilisiert (Shy et al.; 2006).

Nicht-kompaktes Myelin, das kein P0 enthält kann in der paranodalen und juxtapanodalen Region sowie in den cytoplasmatischen Unterbrechungen des kompakten Myelins (Schmidt-Lanterman Inzisuren) gefunden werden (Abb. 1C) (Shy et al., 2006). Durch *tight junctions* und *gap*

*junctions* werden benachbarte Myelinschichten im nicht-kompakten Myelin miteinander verbunden (Scherer et al., 2008). Dabei stellen *gap junctions* eine direkte Verbindung für die Diffusion von Ionen und kleinen Molekülen entlang der einzelnen Myelinschichten her (Balice-Gordon et al., 1998). Cx32 ist eines der wichtigsten *gap junction* Proteine und ist in der paranodalen Region und den Inzizuren der myelinisierenden Schwann-Zelle lokalisiert (Shy et al., 2002).

Großkalibrige, myelinisierte Nervenfasern (Durchmesser  $\geq 1\mu\text{m}$ ) können im Gegensatz zu unmyelinisierten, dünnen Nervenfasern für eine schnelle Erregungsweiterleitung elektrischer Impulse (Aktionspotentiale) sorgen. Da die Myelinschicht das Axons elektrochemisch gegenüber dem Extrazellulärraum sehr gut isoliert ist, finden Aktionspotentiale ausschließlich an den unmyelinisierten Abschnitten des Axons, den Ranvier'schen Schnürringen statt. In diesen Bereichen konzentrieren sich spannungsgesteuerte Natriumkanäle, wobei die dort auftretenden Ionenströme zum nächsten Schnürring übergreifen und dort durch eine Depolarisation ein neues Aktionspotential auslösen. Diese schnelle, springende Überwindung der Strecke zwischen zwei Schnürringen (Internodium) wird als saltatorische Erregungsleitung bezeichnet.

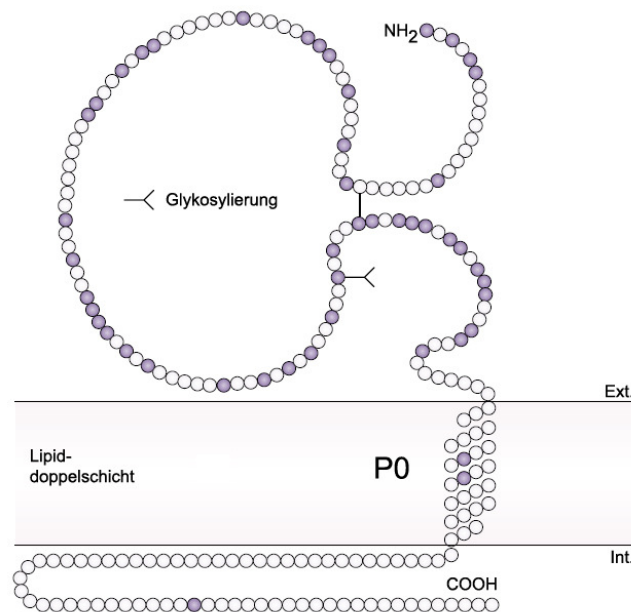
Die Demyelinisierung einer Nervenfaser führt zur Abnahme des elektrischen Widerstandes und zur Zunahme der Kapazität am Internodium. Weiterhin ist die Organisation der Ionenkanäle innerhalb der nodalen Region unterbrochen. Dies hat eine deutliche Verzögerung der Erregungsweiterleitung zur Folge wie sie im Krankheitsbild der erblichen Neuropathien beobachtet werden kann (Waxman et al.; 1995, Smith et al.; 2005).

### 1.3 Das Myelinprotein Null (P0) und seine Rolle bei hereditären Neuropathien

Bis zum heutigen Zeitpunkt konnten mehr als 100 verschiedene P0-Mutationen identifiziert werden (<http://www.molgen.ua.ac.be/CMTMutations>). Die meisten P0-Mutationen werden autosomal dominant vererbt und können in ihrer phänotypischen Ausprägung je nach Lage der Mutation stark variieren. Es ist bisher nur unzureichend geklärt, wie die Ausprägung des klinischen Phänotyps zustande kommt. Eine Punktmutation im P0-Gen kann u.a. zur Ausprägung der CMT Typ 1B (CMT1B) oder dem Dejerine-Sottas-Syndrom (DSS) führen (Warner et al., 1996).

Das 28 kDa schwere Glykoprotein P0 stellt den Hauptanteil der Proteinfraction im peripheren Myelin dar (Kirschner et al.; 2004). P0 ist im kompakten Myelin vorhanden und für die Strukturhaltung und Kompaktierung der Markscheide verantwortlich (Giese et al., 1992). Das für P0 kodierende Gen ist in Ratten, Mäusen (Lemke et al., 1988) und Menschen in sechs Exons unterteilt und ist auf einem 7 kb langen DNA-Abschnitt auf Chromosom 1q22-23 lokalisiert (Hayasaka et al., 1993b). P0 wird ausschließlich von Schwann Zellen exprimiert und wird daher nicht in anderen Gewebetypen, inklusive dem Myelin des zentralen Nervensystems vorgefunden (Hayasaka et al., 1993b).

Das zur Immunglobulin-Superfamilie gehörende P0-Protein (Abb. 1.2) besteht aus einer extrazellulären Domäne, einer Transmembrandomäne und einer cytoplasmatischen Domäne (Lemke et al., 1988; Uyemura et al., 1995). In vitro Studien haben gezeigt, dass P0 als homophiles Adhäsionsprotein fungieren kann (Filbin et al., 1990). Kristallographische Studien konnten überdies bestätigen, dass die extrazelluläre Domäne in *cis* homophile Tetramere bildet, die in *trans* mit Tetrameren von P0-Extrazellulärdomänen der angrenzenden Myelinschicht interagieren (Shapiro et al., 1996).



**Abbildung 1.2:** Schematische Darstellung des Myelinproteins P0. Die durch „*missense*“ Mutationen veränderten Aminosäuren, die einen krankhaften Phänotyp hervorrufen, sind als lilafarbene Kreise dargestellt. Ext.: extrazellulär, Int.: intrazellulär. (Suter et al., 2003)

Die durch eine genetische Veränderung im Myelinprotein P0 hervorgerufenen demyelinisierenden Effekte führen neben der Ausbildung dünner Myelinscheiden und der Bildung von Zwiebelschalenformationen auch zu axonalem Verlust (Thomas et al., 1996), der allen CMT-Erkrankungen gemein ist (Nave et al., 2007). Durch die Dekompaktierung der Myelinscheide sind die funktionellen Eigenschaften des Axons nicht mehr gegeben und machen eine adäquate Weiterleitung von Nervenimpulsen nicht mehr möglich. Es wird angenommen, dass die auf einer P0-Mutation basierende phänotypische Ausprägung der CMT mit einer tiefgreifenden Veränderung der Schwann-Zell-Axon Interaktion zusammenhängt (Berger et al., 2006). Dabei sind die zellulären und molekularen Mechanismen, die zu einem primären Verlust an Myelin sowie zur Demyelinisierung führen, weitgehend unbekannt. Ein grundlegender Erkenntnisgewinn zwischen der Interaktion von Schwann-Zellen mit ihren assoziierten Axonen, Verbindungen mit umgebenden Strukturen der extrazellulären Matrix, aber auch die Verbindung von Schwann-Zellen mit assoziierten Zelltypen wie Fibroblasten, residenten Makrophagen und immigrierten Zellen des Immunsystems mögen der Schlüssel für das Verständnis demyelinisierender CMT-Erkrankungen sein (Maier et al., 2002).

## 1.4 Tiermodelle hereditärer Neuropathien

Die Generierung Myelin-defizienter Mausmodelle machte es möglich, die Pathophysiologie hereditärer Neuropathien näher zu untersuchen und das Verständnis über die an der Pathologie maßgeblich beteiligten Faktoren zu erweitern. Spontane oder gentechnisch hergestellte Myelinmutanten entsprechen hinsichtlich ihres histopathologischen Phänotyps der humanen Erkrankung und stellen diesbezüglich etablierte Tiermodelle für die unterschiedlichen Krankheitsformen der CMT dar (Robertson et al., 2005).

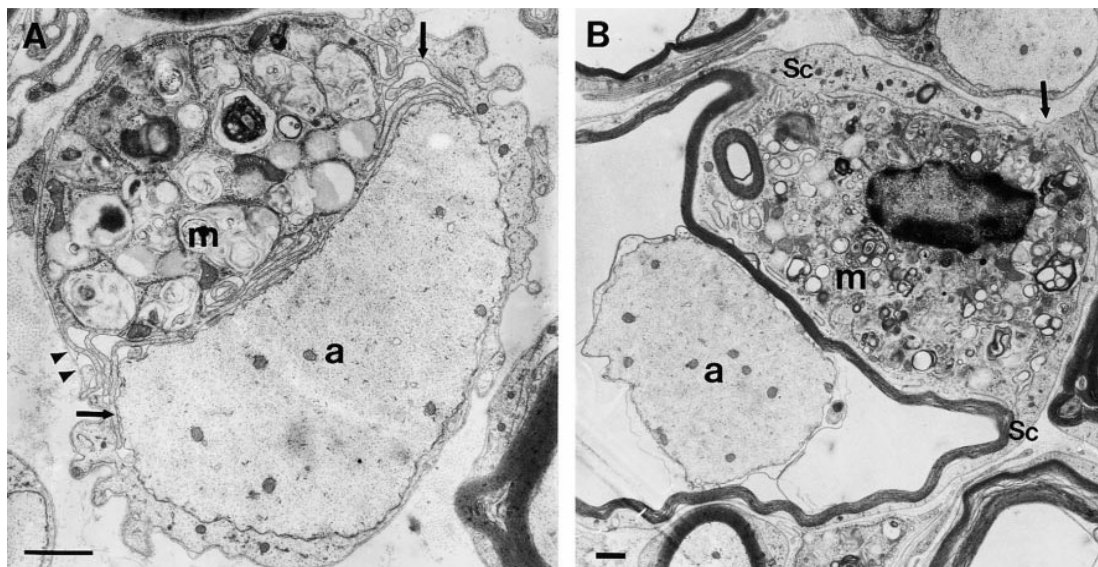
### 1.4.1 P0-defiziente Mausmodelle

P0-defiziente Mäuse wurden mit der Absicht generiert, die Funktion des Myelinproteins P0 in vivo zu charakterisieren (Giese et al., 1992). Durch die Inaktivierung des P0-Gens kommt es zu einer veränderten Expression Myelin-assoziiierter Gene, einschließlich einer Hochregulation des Myelin-assoziierten Glykoproteins (MAG) und des Proteolipid-Proteins-1 (PLP1), einer Deregulation von PMP22 sowie einer fehlerhaften Anlagerung unterschiedlicher Proteine im kompakten und nicht-kompakten Myelin, was letztendlich zur De- bzw. Dysmyelinisierung von Axonen führt (Xu et al., 2000).

Heterozygot-defiziente P0-Mäuse ( $P0^{+/-}$ ) entwickeln eine milde Neuropathie und können als ein Tiermodell für die humane CMT1B-Erkrankung angesehen werden (Martini et al.; 1997; Martini, 2005).  $P0^{+/-}$  Mäuse sind zunächst klinisch unauffällig und zeigen in den ersten vier Lebensmonaten eine normale Myelinisierung. Anschließend entwickeln die Mäuse eine progrediente demyelinisierende Neuropathie, die in motorischen, nicht aber sensiblen Nervenfasern zum Vorschein kommt (Martini et al., 1995; Shy et al., 1997; Samsam et al., 2002). Zu den typischen pathologischen Kennzeichen in  $P0^{+/-}$  Mäusen zählen demyelinisierte Axone und dünne Myelinscheiden, die Proliferation von Schwann-Zellen und der dadurch bedingten Ausbildung von Zwiebschalenformationen (Martini et al., 1995; Shy et al., 1997; Martini, 2005).

In den demyelinisierten Nerven von  $P0^{+/-}$  Mäusen kann mit zunehmendem Alter und mit dem Fortschreiten der Neuropathie eine steigende Anzahl von Immunzellen, insbesondere von  $CD8^+$  T-

Lymphozyten und Makrophagen beobachtet werden (Shy et al., 1997; Schmid et al., 2000). Die Anzahl endoneuraler Makrophagen ist bereits ab dem vierten Lebensmonat erhöht und stets um den Faktor 20 größer als die Anzahl endoneuraler CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Schmid et al., 2000). Inwieweit Immunzellen an der Pathogenese erblicher Neuropathien beteiligt sind sollte durch Kreuzungsexperimente von P0 mit RAG-1 (*recombination activating gene 1*)-defizienten Mäusen (Mombaerts et al., 1992), in denen die Reifung von T- und B-Lymphozyten unterbunden ist, geklärt werden. Es konnte eine Reduktion in der Anzahl endoneuraler CD8<sup>+</sup> T-Zellen und Makrophagen beobachtet werden, was zu einer deutlichen Reduktion demyelinisierter Nervenfasern führte (Schmid et al., 2000). Die genetisch bedingte Immundefizienz konnte durch den Transfer von Knochenmark aus immunkompetenten Wildtypmäusen wieder vollständig hergestellt werden und führte somit wieder zu einer Verschlechterung der Nervenpathologie (Maurer et al., 2001). Weiterhin konnten Transplantationsexperimente mit Knochenmark aus Mäusen, die das grünfluoreszierende Protein (gfp) exprimieren zeigen, dass die gesteigerte Anzahl an Makrophagen in peripheren Nerven von P0<sup>+/-</sup> Mäusen auf einer hauptsächlich intrinsischen Proliferation endoneuraler Makrophagen beruht (Maurer et al., 2003; Mueller et al., 2003).



**Abbildung 1.3:** Elektronenmikroskopische Abbildung aus dem Quadriceps-Nerv (N. quadriceps femoris) von P0<sup>+/-</sup> Mäusen im Alter von sechs Monaten. (A) Makrophage (m) mit Myelindebris beladen befindet sich in engen Kontakt mit einem demyelinisierten Axon (a). Der Makrophage befindet sich innerhalb der Schwann-Zell-eigenen Basallamina (Pfeilköpfe) und steht mit seinen mikrovilliartigen Fortsätzen in engen Kontakt mit dem Axon (Pfeil). (B) Makrophage (m) in engem Kontakt mit einer dünnen Myelinscheide, die teilweise von dem dazugehörigen Axon (a) abgelöst ist. Der Makrophage penetriert die Schwann-Zell-Basallamina (Sc) (Pfeil). Messbalken= 1,5  $\mu$ m (Carenini et al., 2001).

Makrophagen sind meist im gesamten Endoneurium peripherer Nerven verteilt und zeigen sich gelegentlich innerhalb der Schwann-Zell eigenen Basallamina (Carenini et al., 2001). Dort stehen sie über mikrovilliartige Fortsätze in engem Kontakt mit morphologisch intakten Myelinscheiden und sind aktiv an der Phagozytose von Myelindebris beteiligt (Schmid et al.; 2000; Carenini et al.; 2001).

Homozygote P0-knock-out Mäuse ( $P0^{-/-}$ ) zeigen einen schweren klinischen Phänotyp und histopathologische Veränderungen, die dem humanen Erscheinungsbild des Dejerine-Sottas-Syndroms ähneln (Warner et al., 1996; Wrabetz et al., 2006). In  $P0^{-/-}$  Mäusen ist die Bildung normaler Myelinscheiden gestört, was zu einer Dysmyelinisierung von Axonen und zu einem von Beginn an bestehenden, axonalen Verlust führt (Martini et al., 1995; Samsam et al., 2003). Der Verlust von Axonen betrifft vor allem distale Nervenendigungen, wie die Axone der Zehen an den Hinterläufen (Frei et al., 1999) und die Axone im Nervus plantaris und macht sich am deutlichsten innerhalb der ersten drei Lebensmonate bemerkbar (Samsam et al., 2003).

In peripheren Nerven von  $P0^{-/-}$  Mäusen kann eine altersbedingte Zunahme an CD8+ T-Zellen beobachtet werden (Berghoff et al., 2005). Im Gegensatz zu  $P0^{+/-}$  Mäusen zeigt die Anzahl an Makrophagen im dysmyelinisierenden Mausmodell keine konstante Zunahme, erreicht jedoch im dritten Lebensmonat ein Maximum, das im weiteren Krankheitsverlauf beträchtlich zurückgeht (Berghoff et al., 2005). Während in  $P0^{+/-}$  Mäusen hauptsächlich residente und zu einem geringeren Anteil hämatogene Makrophagen zu den erhöhten Zellzahlen beitragen (Maurer et al., 2003), sind die Makrophagen in  $P0^{-/-}$  Mäusen fast ausschließlich hämatogenen Ursprungs. Die Makrophagen befinden sich wie bei  $P0^{+/-}$  Mutanten nur im Endoneurium, dringen jedoch nicht durch die Schwann-Zell-eigene Basallamina in die Nervenfasern ein (Berghoff et al., 2005).

Die positiven Auswirkungen einer RAG-1-Defizienz auf die Nervenpathologie in  $P0^{+/-}$  Mäusen konnte in  $P0^{-/-}$  Mäusen nicht beobachtet werden. Hier führte die Entfernung reifer T- und B-Lymphozyten zu einer Verschlimmerung des axonalen Schadens (Berghoff et al., 2005). Dies lässt vermuten, dass T-Lymphozyten in der Pathogenese einer früh-einsetzenden Dysmyelinisierung eine neuroprotektive Wirkung auf das Überleben der Axone ausüben.



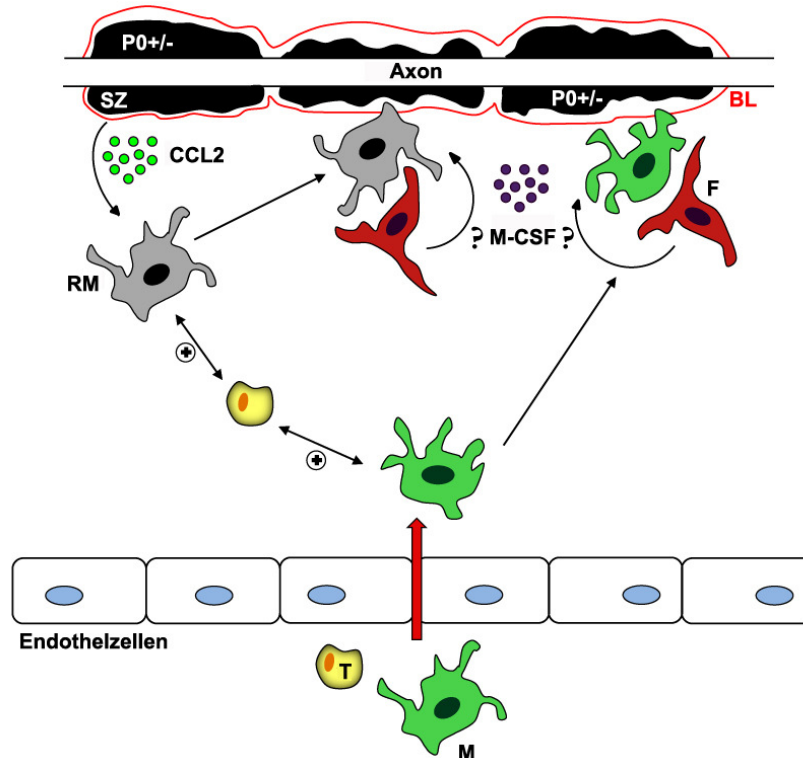
## 1.5 Die Rolle des Immunsystems in Tiermodellen hereditärer Neuropathien

Wie bereits in Kapitel 1.4.1 angesprochen, konnten jüngste Untersuchungen in P0- als auch in PMP22- und Cx32-defizienten Mäusen zeigen, dass Makrophagen und T-Lymphozyten eine aktive Rolle in der Pathogenese erblicher Neuropathien besitzen (Carenini et al., 2001; Kobsar et al., 2003; Berghoff et al., 2005; Kobsar et al., 2005). Die molekularen Mechanismen, die zur Aktivierung und Rekrutierung von Immunzellen in periphere Nerven führen sind weitgehend unbekannt. Man nimmt an, dass Aktivierungssignale für endoneurale Makrophagen von Schwann-Zellen ausgehen, die aufgrund ihres genetischen Defekts mit der Sekretion von Chemokinen und Cytokinen beginnen, bevor die demyelinisierenden Merkmale in Erscheinung treten (Wang Ip et al., 2006).

Ein möglicher Kandidat ist das Cytokin M-CSF (Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor), dessen Defizienz in P0<sup>+/-</sup> Mäusen zu einer verminderten Anzahl an endoneuralen Makrophagen und T-Zellen sowie zu einer Verbesserung der Nervenpathologie führt (Carenini et al., 2001). M-CSF ist weniger an dem Einstrom zirkulierender Makrophagen aus dem Blut beteiligt sondern vermittelt vielmehr die Proliferation residenter Makrophagen (Muller et al., 2007). Zudem kann in P0<sup>+/-</sup> Mäusen in der unmittelbaren Umgebung von Makrophagen eine hohe Anzahl endoneuraler Fibroblasten vorgefunden werden (Maurer et al.; 2003). Dies ist vergleichbar mit der Situation im Knochengewebe, wo M-CSF-sezernierende, Fibroblasten-ähnliche Zellen (Osteoblasten) nah anliegende Osteoklasten (Abkömmlinge der Monozyten-Makrophagen Zelllinie) aktivieren können (Teitelbaum, 2000). Es ist demnach denkbar, dass die Interaktion von Makrophagen und endoneuralen Fibroblasten eine kritische Rolle in der Pathogenese des genetisch bedingten Myelinverlustes spielt (Abb. 1.4).

Da der Rezeptor für M-CSF nicht auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen exprimiert wird (Raivich et al., 1998; Carenini et al., 2001) ist es noch unklar, welche molekularen Interaktionen zwischen Makrophagen und T-Zellen dazu führen, dass es zu einer Zunahme an CD8<sup>+</sup> T-Zellen in peripheren Nerven von P0<sup>+/-</sup> Mäusen kommt. Jüngste Studien konnten zeigen, dass das ausschließlich auf Makrophagen exprimierte Oberflächenmolekül Sialoadhesin den klinischen Phänotyp in P0<sup>+/-</sup> Mäusen

beeinflussen kann und möglicherweise bei der Regulation von T-Lymphozyten eine wichtige Rolle spielt (Kobsar et al., 2006).

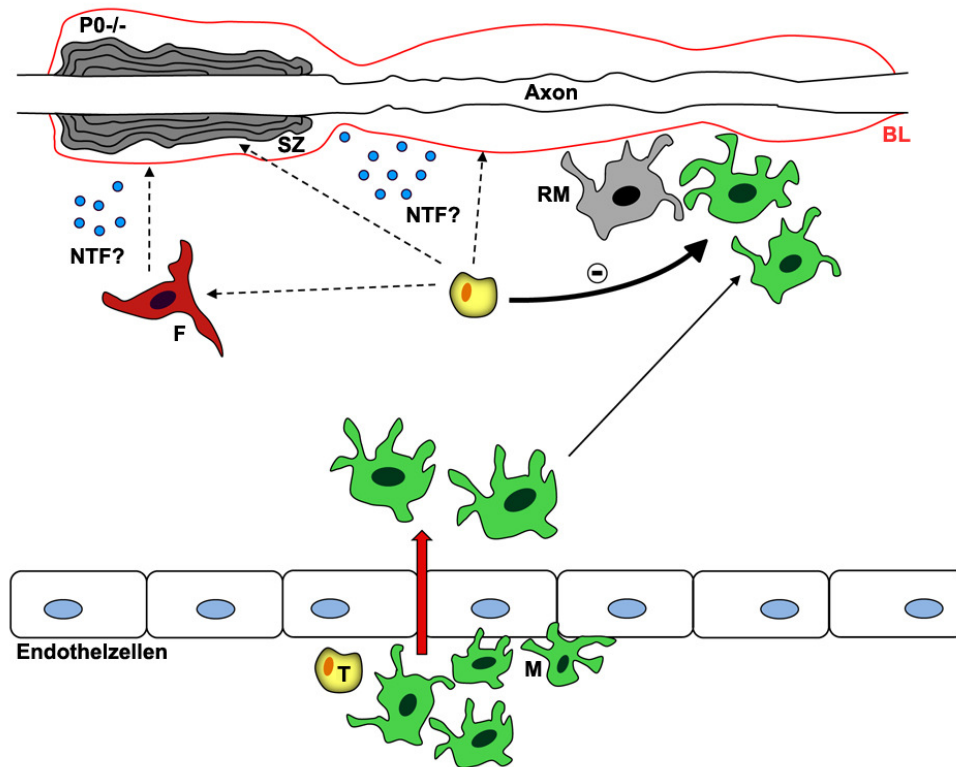


**Abbildung 1.4:** Mögliche Immunmechanismen im P0<sup>+/-</sup> Mausmodell für demyelinisierende Formen (CMT1B) erblicher Neuropathien. Die demyelinisierende Neuropathie wird hauptsächlich durch residente Makrophagen (RM) vermittelt, die die Schwann-Zell (SZ)-eigene Basallamina (BL) penetrieren und Myelindebris phagozytieren. Die Makrophagen-Aktivierung wird zum einen durch CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten (T) reguliert; weiterhin wird sie von der Sekretion inflammatorischer Chemokine/Cytokine beeinflusst, wie z.B. von dem Schwann-Zell-sezernierten CCL2. Zudem werden Makrophagen durch M-CSF aktiviert, das vermutlich von endoneuralen Fibroblasten (F) abstammt. Diese Zellen stehen oft in engem Kontakt mit Makrophagen (modifiziert nach Wang Ip et al., 2006).

Weiterhin können Chemokine den Krankheitsverlauf der primär genetisch bedingten Erkrankung beeinflussen, wie es für das Monozyten-chemoattraktive Protein-1 (MCP-1/CCL2) in P0<sup>+/-</sup> Mäusen und PMP22-Mutanten gezeigt werden konnte (Kobsar et al., 2005; Fischer et al., 2008). CCL2 wird unter verschiedensten pathologischen Bedingungen von Schwann-Zellen exprimiert und ist an der Rekrutierung und Aktivierung von Makrophagen beteiligt (Toews et al., 1998; Subang et al., 2001; Tofaris et al., 2002). Es wird vermutet, dass CCL2-aktivierte Makrophagen T-Zellen chemotaktisch anlocken können, die sich dann in CD8<sup>+</sup> T-Zellen differenzieren und im Gegenzug die Aktivierung residenter Makrophagen positiv beeinflussen (Hartung et al., 1998; Gold et al., 2005). Diese Hypothese wird durch die Tatsache gestützt, dass in RAG-1-defizienten P0<sup>+/-</sup> oder

Cx32<sup>-/-</sup> Doppelmutanten nicht nur die Anzahl von T-Lymphozyten, sondern auch die Anzahl von endoneuralen Makrophagen im Gegensatz zu immunkompetenten Myelinmutanten reduziert ist (Schmid et al., 2000; Kobsar et al., 2003). Darüber hinaus übersteigt die Anzahl an Makrophagen bei weitem die Anzahl an CD8<sup>+</sup> T-Zellen, womit angenommen werden kann, dass die hauptsächliche Aufgabe endoneuraler T-Lymphozyten in der Regulation phagozytierender Makrophagen besteht (Wang Ip et al., 2006).

In den dysmyelinisierenden Nerven von P0<sup>-/-</sup> Mäusen kommt dem Einfluss des Immunsystems eine andere Rolle zu. Dabei muss beachtet werden, dass der Schweregrad und das Fortschreiten der Neuropathie um einiges ausgeprägter ist als bei P0<sup>+/-</sup> Mäusen. Durch Kreuzungsexperimente mit RAG-1-defizienten Mäusen konnte im Gegensatz zu P0<sup>+/-</sup> Mäusen keine Reduktion in der Anzahl endoneuraler Makrophagen beobachtet werden, was zudem zu einer Zunahme des axonalen Schadens führte (Berghoff et al., 2005). Dies lässt vermuten, dass den Makrophagen eine cytotoxische Wirkung in Zusammenhang mit dysmyelinisierten Axonen zukommt. Durch den kompletten Mangel an reifen Lymphozyten, inklusive der T-Suppressor Zellen ist die Möglichkeit der Regulation cytotoxischer Makrophagen nicht mehr gegeben (Hartung, 1998). Somit wäre es endoneuralen Makrophagen in Abwesenheit von T-Lymphozyten möglich, zur weiteren Axon-Schädigung durch die Sekretion cytotoxischer Moleküle und Mediatoren wie beispielsweise proinflammatorischer Cytokine, freier Radikale, Prostaglandine (Gold et al., 2005) oder Matrix-Metalloproteinasen (Kieseier et al., 1998; Hartung et al., 2005) beizutragen (Wang Ip et al., 2006). In P0<sup>-/-</sup> Mäusen konnten endoneurale Makrophagen mit der Expression des Tumor-Nekrose-Faktors- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) und des Interleukins-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) in Verbindung gebracht werden (Berghoff et al., 2005). Es ist jedoch fraglich, ob T-Lymphozyten in P0<sup>-/-</sup> Mäusen eine direkte neuroprotektive Funktion auf das Überleben der Axone ausüben oder ob sie an der Steuerung neurotropher Signale, die durch Schwann-Zellen oder endoneurale Fibroblasten vermittelt werden, beteiligt sind (Abb. 1.5) (Wang Ip et al., 2006).



**Abbildung 1.5:** Mögliche Immunmechanismen im  $P0^{-/-}$  Mausmodell für dysmyelinisierende Formen (DSS) erblicher Neuropathien. In peripheren Nerven von  $P0^{-/-}$  Mäusen ist ein Einstrom hämatogener Makrophagen zu beobachten (M). Diese dringen nicht in die Schwann-Zelle (SZ)-eigene Basallamina (BL) ein, verstärken die axonopathischen Veränderungen jedoch durch die Sekretion pro-inflammatorischer Cytokine und werden dabei vermutlich negativ durch T-Lymphozyten reguliert. Weiterhin wird den T-Zellen im  $P0^{-/-}$  Modell eine neuroprotektive Rolle zugesprochen, da sie neurotrophe Faktoren (NTF) sezernieren und deren Expression in Schwann-Zellen regulieren können. Endoneurale Fibroblasten sind eine weitere denkbare Quelle für neurotrophe Faktoren (modifiziert nach Wang Ip et al., 2006).

### 1.5.1 Chemokine in der Pathogenese hereditärer Neuropathien

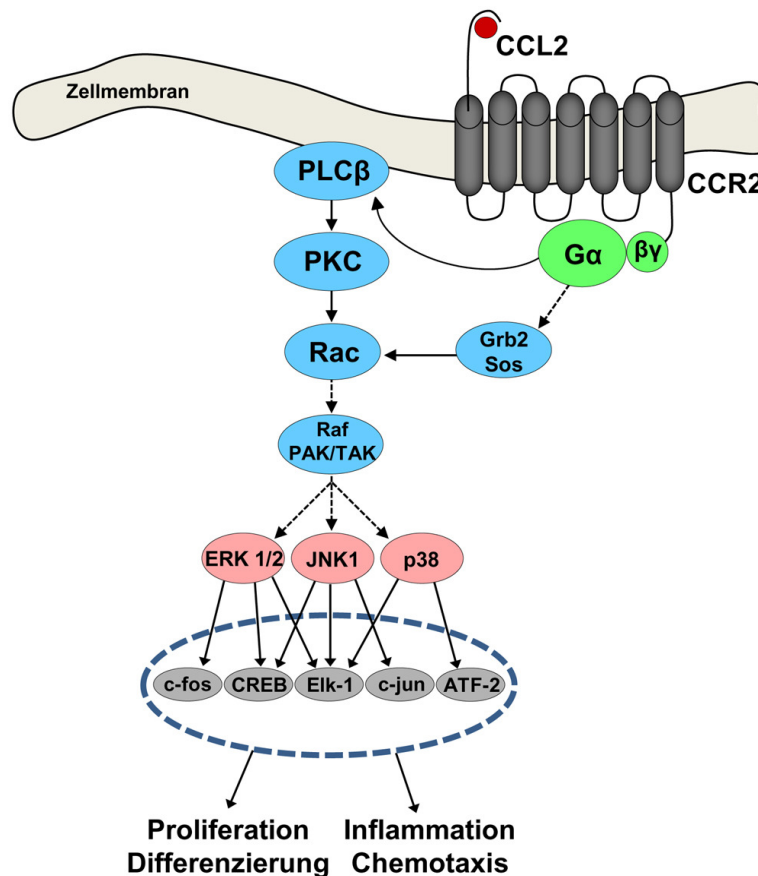
Chemokine (chemotaktische Cytokine) sind Proteine geringen Molekulargewichts (8-12 kDa) und werden anhand der Organisation und Position konservierter Cysteinreste in vier verschiedene Untergruppen eingeteilt (CXC, CC, C und CX3C) (Rollins, 1997; Bacon et al., 2002). Zur größten Familie zählen die CC Chemokine, die vor allem für die Zellrekrutierung und Migration mononukleärer Zellen in entzündliches Gewebe von großer Bedeutung sind (Charo et al., 2006). Weiterhin spielen Chemokine eine wichtige Rolle bei der Immunregulation, der Polarisation von T-Zellen, der Apoptose und Angiogenese sowie der Sekretion von Cytokinen und extrazellulären Matrixproteasen (Mackay, 2001).

Zu den am besten charakterisierten CC Chemokinen gehört das Monozyten-chemoattraktive Protein-1 (MCP-1), das nach systematischer Nomenklatur auch als „Chemokin-Ligand 2 (CCL2)“ bezeichnet wird (Zlotnik et al., 2000). CCL2 induziert die Infiltration und Aktivierung von Monozyten und Makrophagen in entzündliches Gewebe und kann bei der Entwicklung zahlreicher Erkrankungen wie Arteriosklerose, rheumatischer Arthritis, Multipler Sklerose oder Diabetes nachgewiesen werden (Harrington, 2000; Katrib et al., 2001; Mahad et al., 2006; Mine et al., 2006). CCL2 wird im peripheren Nervensystem nach experimenteller Axotomie verstärkt durch Schwann-Zellen exprimiert (Toews et al., 1998; Subang et al., 2001; Kleinschnitz et al., 2004; Perrin et al., 2005). In-vitro Studien belegen weiterhin, dass Schwann-Zellen durch die Sekretion von CCL2 Makrophagen rekrutieren können (Tofaris et al., 2002).

In  $P0^{+/-}$  Mäusen ist CCL2 bereits induziert und in erhöhtem Maße nachweisbar, bevor die Aktivierung von Makrophagen und die pathogenetischen Veränderungen innerhalb der peripheren Nerven erkennbar sind (Fischer et al., 2008). Zu Beginn der demyelinisierenden Neuropathie im Alter von sechs Monaten konnte in  $P0^{+/-}$  Mäusen durch die Inaktivierung des *ccl2*-Gens eine Reduktion endoneuraler Makrophagen beobachtet werden, jedoch ohne Auswirkungen auf die Nervenpathologie. Im Alter von zwölf Monaten zeigte die heterozygote Defizienz von CCL2 in  $P0^{+/-}$  Mäusen eine erhebliche Reduktion endoneuraler Makrophagen sowie eine deutliche Verbesserung des demyelinisierenden Phänotyps. Dagegen führt die homozygote Defizienz von CCL2 zu einer geringeren Reduktion endoneuraler Makrophagen, zeigt jedoch eine vermehrte Anzahl aktivierter, phagozytischer Makrophagen sowie eine Zunahme demyelinisierter Axone (Fischer et al., 2008). Dies wird möglicherweise durch die Kompensation anderer pro-inflammatorischer Cytokine wie  $TNF-\alpha$  und M-CSF reguliert, die bei der Proliferation und Aktivierung von Makrophagen eine wichtige Rolle spielen (Martini et al., 2008). Weiterhin ist eine direkte oder indirekte neuroprotektive Wirkung von CCL2 in verletzten Nerven denkbar (Flugel et al., 2001).

CCL2 bindet mit hoher Affinität an den CC Chemokinrezeptor 2 (CCR2) (Luther et al., 2001), der aus sieben Transmembrandomänen besteht und zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren gehört (Rollins, 1997). Durch die Bindung von CCL2 an CCR2 kommt es an der  $\alpha$ -Untereinheit des G-Proteins ( $G\alpha$ ) zum Austausch von GDP gegen GTP, was folglich zur Dissoziation der  $G\alpha$  von der  $G\beta\gamma$ -Untereinheiten führt und die Aktivierung einer intrazellulären

Signalkaskade einleitet (Abb. 1.6). Nachfolgend werden spezifische Kinasen, wie die Proteinkinase C (PKC) aktiviert, die in darauffolgenden Schritten die Phosphorylierung der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) einleiten kann. In Bezug auf die MAPK-Signalwege konnte gezeigt werden, dass durch die Interaktion von CCL2 und CCR2 die Aktivität von ERK1/2 (extrazellulär-regulierte Proteinkinase 1, 2), JNK1 (c-Jun-NH<sub>2</sub>-terminale Proteinkinase 1) und der p38-Proteinkinase stimuliert werden kann (Cambien et al., 2001; Jimenez-Sainz et al., 2003). Die Phosphorylierung verschiedener Transkriptionsfaktoren wie c-fos, c-jun oder Elk-1 durch MAP-Kinasen führt letztendlich zur Regulierung zahlreicher zellulärer Prozesse wie der Zelldifferenzierung, Aktivierung und Proliferation von Immunzellen und der Genregulation pro-inflammatorischer Cytokine wie TNF- $\alpha$ , IL-6 und IL-1 $\beta$ , (Pearson et al., 2001; Ogilvie et al., 2004; Cheng et al., 2008).



**Abbildung 1.6:** Schematische Darstellung der durch die Interaktion von CCL2 und CCR2 induzierten Signalkaskade, die durch zahlreiche Phosphorylierungsschritte spezifischer Kinasen zur Aktivierung der MAP-Kinasen ERK1 und 2, JNK1 und p38 führt.

CCR2 wird hauptsächlich von Monozyten und Makrophagen exprimiert, kann aber auch auf aktivierten T-Zellen, NK-Zellen und unreifen dendritischen Zellen nachgewiesen werden (Luther et al., 2001; Peters et al., 2001; Viola et al., 2008).

Die Interaktion von CCL2 und CCR2 spielt in zahlreichen inflammatorischen Prozessen eine wichtige Rolle bei der Rekrutierung und Aktivierung von Immunzellen. Allerdings sind die bisherigen Erkenntnisse über die Rolle von CCR2 in entzündlichen Erkrankungen des Nervensystems zuweilen widersprüchlich. Studien in CCR2-defizienten Mäusen konnten zeigen, dass die Entwicklung der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE), dem Tiermodell der Multiplen Sklerose in diesen Mäusen beeinträchtigt ist und CCR2 demnach als ein kritisches Molekül in der Pathogenese autoimmuner Erkrankungen angesehen werden kann (Fife et al., 2000; Izikson et al., 2000). Die Auswirkungen der EAE-Induktion sind möglicherweise jedoch auf einen unterschiedlichen genetischen Hintergrund der Mäuse zurückzuführen, da ungeachtet der CCR2-Defizienz neuroinflammatorische Infiltrate im ZNS beobachtet werden konnten (Gaupp et al., 2003). Weiterhin ist in CCR2-defizienten Mäusen die Entwicklung und Empfindlichkeit gegenüber neuropathischen Schmerzen reduziert (Abbadie et al., 2003; Zhang et al., 2007). Dies lässt eine Beteiligung von CCR2-vermittelten Signalen bei der Aktivierung spinaler Mikroglia (Makrophagen des ZNS) und hämatogener Makrophagen nach einer peripheren Nervenverletzung und der damit verbundenen Schmerzempfindung (Allodynie) vermuten (Abbadie et al., 2009). Die CCR2-abhängige Rekrutierung und Aktivierung von Immunzellen kann andererseits auch neuroprotektive Effekte vermitteln, wie Studien in APP-Mäusen, dem Tiermodell der Alzheimer-Erkrankungen zeigen konnten. Die durch eine CCR2-Defizienz verursachte Reduktion an Mikroglia führt zur vermehrten Ablagerung der Alzheimer-typischen A $\beta$ -Plaques und somit zu einem schnelleren Fortschreiten der neurodegenerativen Erkrankung (El Khoury et al., 2007). Die Funktion von CCR2 bei Erkrankungen des peripheren Nervensystems ist bisher nicht hinreichend geklärt. Studien in CCR2-defizienten Mäusen deuten darauf hin, dass CCR2 zu Beginn einer traumatischen Nervenverletzung an der Rekrutierung von Monozyten zum Entzündungsherd und der Beseitigung von Myelin- und Axondebris durch Makrophagen beteiligt ist (Siebert et al., 2000). In einem Acrylamid-induzierten Neuropathie-Modell konnte des Weiteren gezeigt werden, dass die CCR2-Defizienz in distalen Segmenten des Nervus ischiadicus zur Reduktion endoneuraler

Makrophagen führt, was eine bedeutende Rolle von CCR2 für den Einstrom von Makrophagen in distale Nervenendigungen vermuten lässt (Muller et al., 2008)

Welchen Einfluss CCR2 auf die Rekrutierung von Immunzellen bei erblichen Neuropathien spielt ist bislang ungeklärt. In Bezug auf die Funktion von CCL2 in  $P0^{+/-}$  Mäusen und die jüngsten Erkenntnisse bezüglich der CCL2/CCR2-Interaktion in peripheren Nerven ist zu vermuten, dass CCR2 eine pathogenetisch relevante Rolle bei der Rekrutierung von Makrophagen und der Nervendegeneration in Modellen für hereditäre Polyneuropathien spielt.

## 1.6 Zielsetzung

Untersuchungen an Tiermodellen für P0-assoziierte hereditäre Neuropathien konnten zeigen, dass die Pathogenese dieser primär genetisch bedingten Erkrankungen entscheidend durch das Immunsystem beeinflusst wird. Die molekularen Mechanismen, die diese Vorgänge kontrollieren sind weitestgehend unbekannt. Ein möglicher Kandidat ist das von Schwann-Zellen exprimierte Chemokin CCL2, das in peripheren Nerven P0-defizienter Mäuse in erhöhtem Maße vorgefunden werden kann und durch die Interaktion mit dem Chemokinrezeptor CCR2 zur Aktivierung von Makrophagen führt.

In der vorliegenden Arbeit soll die pathogenetische Bedeutung des Chemokinrezeptors CCR2 in peripheren Nerven von Myelinprotein Null (P0)-Mutanten charakterisiert werden. Durch immunhistochemische Untersuchungen des Nervus femoralis von  $P0^{+/-}$  Mäusen sowie des Nervus plantaris von  $P0^{-/-}$  Mäusen soll die Auswirkungen einer CCR2-Defizienz auf die Immigration und Aktivierung von Immunzellen analysiert werden. Elektronenmikroskopische Analysen sollen darüber hinaus klären, inwieweit CCR2 die Ausprägung der Myelinschädigung im N. femoralis und die axonale Degeneration im N. plantaris beeinflusst.

Weiterhin soll mittels funktioneller Verhaltenstests (Rotarod-Test) die Auswirkung eines CCR2-Mangels auf die motorische Leistungsfähigkeit von  $P0^{+/-}$  und  $P0^{-/-}$  Mäusen evaluiert werden.

Zur Aufklärung der molekularen Mechanismen in  $P0^{+/-}$  Mäusen sollen Expressionsanalysen mittels quantitativer *Realtime*-PCR Aufschluss über CCR2-abhängige Effekte auf die Aktivierung von Immunzellen geben. Dabei soll die Genexpression ausgewählter inflammatorischer Cytokine (M-



CSF, TNF- $\alpha$ , CCL2, IL-6, IL-10), die möglicherweise durch die CCR2-Defizienz moduliert wird, im N. quadriceps femoris untersucht werden. Zudem sollen CCR2-abhängige Unterschiede bezüglich der Expression inflammatorischer Cytokine und Chemokine in P0<sup>+/-</sup> Mäusen auf Proteinebene untersucht werden. Hierzu soll mithilfe eines *Proteome-Profiler*<sup>™</sup> Cytokin-Assays die relative Proteinmenge von vierzig ausgewählten Cytokinen und Chemokinen im N. quadriceps femoris von P0<sup>+/-</sup> Mäusen bestimmt werden.

Darüber hinaus soll geklärt werden, inwiefern sich die CCR2-Defizienz auf die Zusammensetzung bestimmter Monozyten-Populationen im peripheren Blut von P0<sup>+/-</sup> Mäusen auswirkt. Mittels *Fluorescence-activated cell sorting* (FACS) sollen verschiedene hämatogene Monozyten-Subpopulationen differenziert und die Menge der einzelnen Populationen quantifiziert werden.



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Antikörper

#### 2.1.1 Primärantikörper

7/4	AbD Serotec GmbH, Düsseldorf, DE
CD-3	BD Pharmingen, Franklin Lakes, NJ, USA
CD16/CD32	BD Pharmingen, Franklin Lakes, NJ, USA
F4/80	AbD Serotec GmbH, Düsseldorf, DE

#### 2.1.2 Primärantikörper (Fluoreszenzfarbstoff-konjugiert)

7/4-RPE	AbD Serotec GmbH, Düsseldorf, DE
Ly-6G + Ly-6C-FITC	BD Pharmingen, Franklin Lakes, NJ, USA
F4/80-APC	AbD Serotec GmbH, Düsseldorf, DE

#### 2.1.3 Sekundärantikörper (Biotin-konjugiert)

Kaninchen-anti-Ratte	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
Ziege-anti-Hamster	Jackson Laboratories, Inc., West Grove, PA, USA

#### 2.1.4 Sekundärantikörper (Meerrettichperoxidase-konjugiert)

Streptavidin-HRP	DakoCytomation, Glostrup, DK
------------------	------------------------------

#### 2.1.5 Sekundärantikörper (Streptavidin-Fluoreszenzfarbstoff-konjugiert)

Alexa-Fluor594®	Molecular Probes Europe, Leiden, NL
-----------------	-------------------------------------

## 2.2 Chemikalien

Aceton	J.T. Baker, Deventer, NL
Aceton, getrocknet	Merck KgaA, Darmstadt, DE
Agarose	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, DE
Albumin Fraktion V	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Ammoniumchlorid	Merck KgaA, Darmstadt, DE
Aprotinin	Sigma-Aldrich, München, DE
Azur II	Merck KgaA, Darmstadt, DE
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, München, DE
Blei(II)-nitrat	Merck KgaA, Darmstadt, DE
Blockierungsreagenz	Roche Diagnostics, Mannheim, DE
Borsäure	Merck KgaA, Darmstadt, DE
Coomassie Brillant Blau R 250	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
D(+) Saccharose	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Diethylether	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Diethylpyrocarbonat	Sigma-Aldrich, München, DE
Di-Natriumhydrogenphosphat	Merck KgaA, Darmstadt, DE
Ethanol	Merck KgaA, Darmstadt, DE
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Ethylendiamintetraessigsäure	MP Biomedicals, Illkirch, FR
<i>GeneRuler</i> <sup>™</sup> 100 bp DNA-Marker	MBI Fermentas, St.Leon-Rot, DE
Glutaraldehyd	Agar Scientific, Stansted, UK
Glycerin, 87%	Merck KgaA, Darmstadt, DE
HAES, 6%	Fresenius AG, Bad Homburg, DE
HPLC-Wasser	J.T. Baker, Deventer, NL
Imidiazol	Sigma-Aldrich, München, DE
Kaliumhydrogencarbonat	Merck KgaA, Darmstadt, DE
Leupeptin	Sigma-Aldrich, München, DE
Maleinsäure	Sigma-Aldrich, München, DE

Methanol	Merck KgaA, Darmstadt, DE
Methylbutan	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
<i>Mounting Medium</i> mit DAPI	Vectashield Labs, Peterborough, UK
Natriumazid	Merck KgaA, Darmstadt, DE
Natrium-Cacodylat	Merck KgaA, Darmstadt, DE
Natriumchlorid	Merck KgaA, Darmstadt, DE
Natriumcitrat	Merck KgaA, Darmstadt, DE
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat	Merck KgaA, Darmstadt, DE
Natriumhydroxid	Merck KgaA, Darmstadt, DE
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich, München, DE
Nonidet P-40	Roche Diagnostics, Mannheim, DE
Osmiumtetroxid	Science Services GmbH, München, DE
Paraformaldehyd	Merck KgaA, Darmstadt, DE
Sodium Dodecyl Sulfat	Merck KgaA, Darmstadt, DE
Tissue-Tek®	Sakura Finetek, Zoeterwoude, NL
Tris	Sigma-Aldrich, München, DE
Wasserstoffperoxid, 30%	Apotheke des Uniklinikums, Münster, DE

### 2.3 Gebrauchsfertige Kits

DNeasy Blood & Tissue Kit	Qiagen GmbH, Hilden, DE
ECL Plus Detection System	Amersham Bioscience, Little Chalfont, UK
Modified Spurr Embedding Kit	SERVA GmbH, Heidelberg, DE
Mouse Cytokine Array Kit	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
RedTaq® PCR Reaction Mix	Sigma-Aldrich, München, DE
RNeasy Micro Kit	Qiagen GmbH, Hilden, DE
QuantiTect Primer Assays	Qiagen GmbH, Hilden, DE
QuantiTect Rev. Transkriptionskit	Qiagen GmbH, Hilden, DE
QuantiTect SYBR-Green PCR Kit	Qiagen GmbH, Hilden, DE

## 2.4 Geräte

ABI Prism® 7700 RT-PCR- <i>Cycler</i>	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Alpha Imager EC	Alpha Innotech, San Leandro, CA, USA
<i>Bioanalyzer</i> 2100	Agilent Technologies, Waldbronn, DE
Biofuge Stratos, Zentrifuge	Haereus-Christ, Hanau, DE
Biometra Standard Power Pack 25	Biometra GmbH, Göttingen, DE
Biophotometer	Eppendorf GmbH, Hamburg, DE
Gellaufkammer	Harnischmacher Labortechnik, Kassel, DE
GeneAmp PCR- <i>Cycler</i> System 9700	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Hyperfilm	Amersham Bioscience, Little Chalfont, UK
Einbettungsgießform	Agar Scientific, Stansted, UK
Elektronenmikroskop Leo 906	Zeiss, Oberkochen, DE
FACs Calibur, Durchflusszytometer	BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA
Feinwaage	Sartorius AG, Göttingen, DE
Fluoreszenzmikroskop CMRX	Leica Microsystems, Nussloch, DE
Kryotom CM3050C	Leica Microsystems, Nussloch, DE
Kupfernetzchen, 200 mesh	Science Services GmbH, München, DE
Lupe KL1500 LCD	Leica Microsystems, Nussloch, DE
Milli QUF Plus	Millipore GmbH, Eschborn, DE
Picochip 6000 RNA- <i>Assay</i>	Agilent Technologies, Waldbronn, DE
Slow Scan CCD Kamera	ProsScan GmbH, Lagerlechfeld, DE
Shaker DOS-20S	Neolab, Heidelberg, DE
Spot Digitalkamera	Diagnostic Instr., Sterling Heights, USA
Thermomixer comfort	Eppendorf GmbH, Hamburg, DE
Ultracut E, Ultramikrotom	Reichard Microscope Service, Depew, USA
Ultra One Diamantmesser	W. Reichert-Labtec, Wolfratshausen, DE
Ultraturrax T8	IKA, Staufen, DE
Vortex Genie 2	Scientific Industries Inc., Bohemia, N.Y. , USA
Zentrifuge 5415C	Eppendorf GmbH, Hamburg, DE

## 2.5 Puffer und Lösungen

### Agarose-Gel 2 %

Agarose	2 g
10x TBE-Puffer	10 ml
Aqua dest.	ad. 100 ml

für ca. 10 min aufkochen, Zugabe von 20 µl Ethidiumbromid pro 100 ml Agarose-Gel (2 %)

### ACK-Puffer pH 7,4

NH <sub>4</sub> Cl 0,15 M	4 g
KHCO <sub>3</sub> 10 mM	500 mg
EDTA 0,5 M	100 µl
Aqua dest.	ad. 500 ml

### Bleicitrat

I: Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	0,665 g
Aqua dest. (CO <sub>2</sub> -frei)	7,5 ml
II: Na <sub>3</sub> (C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> ) 2H <sub>2</sub> O	0,88 g
Aqua dest. (CO <sub>2</sub> -frei)	7,5 ml

Lösung I mit Lösung II vorsichtig zu weißer, homogener Lösung mischen

NaOH 1 M	4 ml
Aqua dest. (CO <sub>2</sub> -frei)	ad. 25 ml

### Blockierungspuffer

Blockierungsreagenz	1 g
Maleinsäurepuffer pH 7,5	100 ml

### Elutionspuffer

PBS	50 ml
Imidiazol	0,34 g
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 30%	5 µl

**FACS-PBS**

NaN <sub>3</sub>	0,1 %
BSA	0,1 %
Zugabe zu 100 ml PBS-Puffer	

**Lysepuffer**

Nonidet P-40	1 %
Tris pH 8,0	20 mM
NaCl	137 mM
Glycerin	10 %
EDTA	2 mM
Aprotinin	10 µg/ml
Leupeptin	10 µg/ml
Aqua dest.	ad. 10 ml

**Maleinsäurepuffer pH 7,5**

Maleinsäure 0,1 M	11,6 g
NaCl 0,15 M	8,8 g
Aqua dest.	ad. 1000 ml

**Methylenblau-Färbelösung pH 9,0**

Methylenblau	1 g
Azur II	1 g
Saccharose	40 g
Formaldehyd, 37 %	2 Tropfen
Aqua dest.	ad. 100 ml

**Natrium-Cacodylatpuffer 0,2 M, pH 7,4**

C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> AsNaO <sub>2</sub> · 3H <sub>2</sub> O	42,8 g
Aqua dest.	ad. 1000 ml



**Paraformaldehyd-Lösung (PFA) 4 %, pH 7,4**

Paraformaldehyd 20 %	200 ml
PO <sub>4</sub> 0,2 M	500 ml
NaCl 5 M	30 ml
Aqua dest.	ad. 1000 ml

**Paraformaldehyd (PFA) 4 % mit Glutaraldehyd 2 %**

Paraformaldehyd 20 %	20 ml
Glutaraldehyd 25 %	8 ml
Na-Cacodylatpuffer 0,2 M	50 ml
Aqua dest.	ad. 100 ml

**Phosphat-gepufferte Saline (PBS)**

PO <sub>4</sub> 0,2 M	50 ml
NaCl 5 M	30 ml
Aqua dest.	ad. 1000 ml

**Phosphatpuffer (PO<sub>4</sub>) 0,2 M**

I: Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	35,6 g/l
II: NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	31,2 g/l

Lösung I vorlegen und mit Lösung II auf pH 7,4 titrieren

**Saccharose-Lösung 10 %**

D(+) Saccharose	10 g
Aqua dest.	ad. 100 ml

**Spurr's Medium (Kunstharz)**

ERL 4221D	10 g
D.E.R. 736	6 g
NSA	26 g
DMAE	0,4 g

**10x TBE-Puffer, pH 8,0**

Tris	1 M
Borsäure	830 mM
EDTA	10 mM

**10x TBS-Puffer , pH 7.5**

Tris-HCl	0,5 M
NaCl	1,5 M

**2.6 Oligonukleotide**

Name	Sequenz	Größe
S134	5'- TCA GAG ATG GCC AAG TTG AGC AGA -3'	24-mer
AS136	5'- TGG GGA TAC TGC TTA AAT GGG GCA A -3'	25-mer
AS121	5'- TTC CAT TGC TCA GCG GTG CT -3'	20-mer
S1295	5'- TCA GTT CCT TGT CCC CCG CTC TC -3'	23-mer
AS1772	5'- ACT TGT CTC TTC TGG GTA ATC AA -3'	23-mer
AS1606	5'- GGC TGC AGG GTC GCT CGG TGT TC -3'	23-mer

**2.7 Software**

Adobe Photoshop	Adobe, San José, CA, USA
AnalySIS	Soft Imaging Solutions GmbH, Münster, DE
Abi Prism 7700 SDS v1.2.3	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
iTEM	Soft Imaging Solutions GmbH, Münster, DE
Microsoft Office 2007	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
Relative-Expression Software Tool	<a href="http://www.gene-quantification.de">http://www.gene-quantification.de</a>
Spot Advanced 2.2	Diagnostic Instr., Sterling Heights, USA
WinMDI 2.8	<a href="http://www.cyto.purdue.edu/flowcyt/software/winmdi.htm">http://www.cyto.purdue.edu/flowcyt/software/winmdi.htm</a>

## 2.8 Tierzucht

Alle Versuchstiere wurden nach geltendem Tierschutzrecht in der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung (ZTE) des Universitätsklinikums Münster gehalten und gezüchtet.

### **P0<sup>+/-</sup> und P0<sup>-/-</sup> Mäuse**

P0-defiziente Mäuse (C57/Bl6 P0<sup>+/-</sup>, C57/Bl6 P0<sup>-/-</sup>) aus der laboreigenen Zucht wurden erstmals von Prof. Dr. Rudolf Martini, Entwicklungsneurobiologie, Universitätsklinikum Würzburg zur Verfügung gestellt. Heterozygot-defiziente P0 Mäuse (P0<sup>+/-</sup>), die sich durch die Dekompaktierung und Degeneration der Myelinscheide auszeichnen (siehe Kapitel 1.4.1) stellen ein etabliertes Modell für die humane Form der Charcot-Marie-Tooth Typ 1B Erkrankung dar. Homozygot-defiziente P0 Mäuse (P0<sup>-/-</sup>) sind durch Dysmyelinisierung und axonale Degeneration charakterisiert und dienen als Modell für das Dejerine-Sottas Syndrom.

### **CCR2<sup>-/-</sup> Mäuse**

CCR2-defiziente Mäuse (C57/Bl6.129F2 – Cmkbr2<sup>tm1Kuz</sup>) aus der laboreigenen Zucht wurden ursprünglich von Dr. William A. Kuziel, Chapel Hill, NC, USA zur Verfügung gestellt. CCR2-defiziente Mäuse sind nicht mehr in der Lage den CC Chemokinrezeptor 2 (CCR2) zu exprimieren. Die CCR2-Defizienz ist charakterisiert durch eine fehlerhafte Th1-Immunantwort mit verminderter Leukozyten-Adhäsion an das Gefäßsystem sowie verminderter Monozyten-Immigration zum inflammatorischen Gewebe, was mit einer geringeren Suszeptibilität für Infektionen durch pro-inflammatorische Stimuli einhergehen kann (Kuziel et al., 1997).

### **P0<sup>+/-</sup>CCR2<sup>-/-</sup> und P0<sup>-/-</sup>CCR2<sup>-/-</sup> Mäuse**

Durch die Verkreuzung von P0<sup>+/-</sup> Tieren mit CCR2<sup>-/-</sup> Tieren wurden in der F1-Generation P0<sup>+/-</sup>CCR2<sup>+/-</sup> Tiere erhalten. Die Verkreuzung der heterozygoten P0/CCR2 Tiere führte in der F2-Generation zu Tieren mit dem gewünschten Genotyp P0<sup>+/-</sup>CCR2<sup>-/-</sup>, P0<sup>+/-</sup>CCR2<sup>+/+</sup> sowie P0<sup>-/-</sup>CCR2<sup>-/-</sup> und P0<sup>-/-</sup>CCR2<sup>+/+</sup>. CCR2-kompetente und CCR2-defiziente P0-Wildtyp Mäuse (P0<sup>+/+</sup>CCR2<sup>+/+</sup>, P0<sup>+/+</sup>CCR2<sup>-/-</sup>) aus der gleichen Zucht dienten als Kontrolltiere.

## 2.9 Methoden

### 2.9.1 Genotypisierung P0- und CCR2-defizienter Mäuse

Der genetische Hintergrund der zu untersuchenden Mäuse wurde mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ermittelt. Dabei wurde jeder Maus ein ca. 0,3 cm langes Stück der Schwanzspitze entfernt und die genomische DNA (gDNA) mit Hilfe des DNeasy Blood & Tissue Kits (Qiagen GmbH, Hilden) extrahiert. Die Aufreinigung der gDNA erfolgte nach Angaben des Herstellerprotokolls.

Die Amplifikation der gDNA mittels PCR erfolgte mit für jeden Genotyp spezifischen Primern. Zur Untersuchung des genetischen P0-Hintergrundes wurden die Primer S1295, AS1606 und AS1772 genutzt. Liegt ein P0-Wildtypallel vor, generiert das Primerpaar S1295 und AS1772 ein 500 Basenpaar (bp) langes PCR-Produkt, bei einem P0-defizienten Allel ( $P0^{-/-}$ ) liefern die Primerpaare S1295 und AS1606 ein PCR-Produkt mit einer Länge von 334 bp. Handelt es sich bei der Genotypisierung um ein heterozygoten P0-Tier ( $P0^{+/-}$ ), werden sowohl das P0-Wildtyp, als auch das P0-defiziente Allel amplifiziert.

Für die Bestimmung des CCR2-Hintergrundes wurden die Primer S134, AS121 und AS136 verwendet. Bei Vorliegen eines CCR2-Wildtyp-tieres bildet das Primerpaar S134 und AS136 ein 400 bp langes PCR-Produkt. Das CCR2-defiziente Allel resultiert in einem 450 bp langen PCR-Produkt, das durch das Primerpaar S134 und AS121 hervorgeht.

Zur Amplifikation der spezifischen DNA-Abschnitte wurde die aufgereinigte gDNA mit folgenden Komponenten in einem PCR-Reaktionsgefäß zusammenpipettiert:

Tabelle 2.1: PCR-Mastermix für eine Probe genomischer DNA

Komponente	Menge
Red-Taq-Mastermix	12,5 µl
HPLC-Wasser	10 µl
Primer 1 (10 pmol)	1 µl
Primer 2 (10 pmol)	1 µl
gDNA	0,5 µl

Für jedes Gen wurde die zu untersuchende gDNA-Probe mit beiden Primerpaaren angesetzt. Die PCR-Produkte wurden anschließend in einem PCR-Thermocycler mit optimierter Temperatur und Zykluszahl für die Primerpaare amplifiziert.

Tabelle 2.2: PCR-Zyklus für die Genotypisierung P0-defizienter Mäuse

Schritt	Temperatur	Zeit
1. Aktivierung der Polymerase	94°C	1 min
2. Denaturierung der gDNA	94°C	15 sec
3. Primerbindung (Annealing)	55°C	30 sec
4. Elongation	72 °C	30 sec
5. Wiederholung Schritt 2-4 (39x)		
6. Finale Elongation	72°C	7 min

Tabelle 2.3: PCR-Zyklus für die Genotypisierung CCR2-defizienter Mäuse

Schritt	Temperatur	Zeit
1. Aktivierung der Polymerase	95°C	15 min
2. Denaturierung der gDNA	94°C	50 sec
3. Primerbindung (Annealing)	55°C	50 sec
4. Elongation	72 °C	1 min
5. Wiederholung Schritt 2-4 (39x)		
6. Finale Elongation	72°C	7 min

Nach Beendigung des PCR-Prozesses wurden 5 µl des jeweiligen PCR-Produktes und 2 µl 100 bp DNA-Längenstandard auf ein 2% Agarosegel (inkl. Ethidiumbromidlösung) aufgetragen. Nach erfolgter elektrophoretischer Auftrennung bei 130 V für 20 min wurde das Gel unter UV-Licht fotografiert und anschließend ausgewertet. Mit Hilfe des aufgetragenen Längenstandards konnte die DNA-Größe der zu untersuchenden Probe ermittelt werden.

### 2.9.2 Rotarod-Testung

Um die motorischen Fähigkeiten der myelindefizienten P0-Tiere in Abhängigkeit von CCR2 beurteilen zu können, wurde der Rotarod-Test durchgeführt. Hierbei müssen die Mäuse versuchen, auf einer rotierenden, sich beschleunigenden Walze zu laufen. Die Tiere werden dabei auf die sich bereits drehende Walze gesetzt, die innerhalb von 300 Sekunden von 4 U/min auf 40 U/min beschleunigt. Sobald sich eine Maus nicht mehr auf der Walze halten kann und herunterfällt, wird eine Lichtschranke passiert und die Zeit des Laufs gestoppt.

Die Rotarod-Testung wurde bei P0<sup>+/-</sup> Tieren im Alter von sechs und zwölf Monaten durchgeführt, aufgrund des Schweregrades der Erkrankung bei P0<sup>-/-</sup> Tieren wurde auf die Testung im zwölften Lebensmonat verzichtet. Die Tiere wurden an sieben aufeinanderfolgenden Tagen für jeweils fünf Trainingsdurchläufe auf die Walze gesetzt. Aus den fünf täglichen Testungen wurde der Mittelwert errechnet und im Verlauf gegen die Zeit analysiert.

### 2.9.3 Tierpräparation

Die Entnahme des Femoralis-Nerv (N. femoralis) erfolgte bei P0<sup>+/-</sup> Tieren im Alter von sechs und zwölf Monaten. Da sich P0<sup>-/-</sup> Mäuse durch eine weiter distal betonte Neuropathie auszeichnen, wurde in diesem Mausmodell der Plantaris-Nerv (N. plantaris) entnommen. Durch den schweren Krankheitsverlauf bei P0<sup>-/-</sup> Mäusen wurden ausschließlich Tiere im Alter von sechs Monaten analysiert.

Tiere im entsprechenden Alter wurden zur Perfusion in eine tiefe Ethernarkose versetzt und auf einem Präparationsbrett fixiert. Der Brustkorb wurde mit einem Schnitt unterhalb des Sternums geöffnet, gefolgt von einem Rippen-durchtrennenden, horizontalen Einschnitt des Zwerchfells bis ca. zwei Zentimeter über der Herzhöhe. Thoraxwand und Sternum wurden seitlich fixiert und das Herz freigelegt. Das noch schlagende Herz wurde mit einer Kanüle, an der das Infusionsbesteck angeschlossen war, am linken Ventrikel punktiert und das rechte Atrium anschließend mit einer feinen Schere eingeschnitten.

Zum Entbluten und Verhindern von intravaskulären Thromben wurden die Mäuse zunächst für ca. eine Minute mit 6 %igem HAES perfundiert. Anschließend wurden die Tiere für weitere 5 min mit

4 %iger PFA-Lösung perfundiert, um eine gute Fixation des Gewebes zu erreichen. Die Entnahme der peripheren Nerven erfolgte unter dem Operationsmikroskop.

## 2.9.4 Histologie

### 2.9.4.1 Fixierung und Einbettung peripherer Nerven für die Immunhistochemie

Das entnommenen Gewebe wurde für immunhistochemische Zwecke nach der Perfusion drei Stunden in 4 %igem PFA nachfixiert, danach dreimal je 15 min in 0,1 M Phosphatpuffer ( $\text{PO}_4$ ) gewaschen und anschließend in 10 % Saccharose-Lösung überführt (4°C, über Nacht).

Zum Einfrieren der Nervenfragmente wurden diese in eine mit TissueTek® gefüllte Silikonform eingebettet, in ein mit flüssigem Stickstoff gekühltes Dimethylbutanbad gehalten und die Blöcke bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert.

Im nächsten Arbeitsschritt wurden von den in TissueTek® eingebetteten Nerven am Kryotom 10 µm dicke Kryoquerschnitte angefertigt. Bei einer Kammertemperatur von -24°C und einer Objekthaltertemperatur von -18°C wurden die Gewebeschnitte auf spezielle SuperFrost®-Objektträger aufgenommen und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert

### 2.9.4.2 Fixierung peripherer Nerven für die Elektronenmikroskopie

Für elektronenmikroskopische Analysen wurden die Nerven nach der Entnahme in 4 %igem PFA mit 2 % Glutaraldehyd über Nacht bei 4°C postfixiert. Am nächsten Tag wurden die Nerven gründlich mit 0,1 M Natrium-Cacodylatpuffer gewaschen und anschließend für zwei Stunden mit 2 % Osmiumtetroxid in 0,1 M Natrium-Cacodylatpuffer inkubiert. Osmiumtetroxid dient als Kontrastmittel für die Elektronenmikroskopie. Nach Entfernen der Osmiumlösung wurden die Nerven dreimal je 5 min in 0,1 M Natrium-Cacodylatpuffer gewaschen. Es folgte eine aufsteigende Acetonreihe mit anschließender Inkubation in Spurr's Medium (siehe Tab. 2.4).

Tabelle 2.4: Protokoll zur Nerveneinbettung in Spurr's Medium (Kunstharz)

Schritt	Zeit
Aceton 30 %, 50 %, 70 %, 90 %, 96 %	jeweils 10 min
Aceton 100 % (getrocknet)	3 x 10 min
Spurr : Aceton 100 % (getrocknet) 1:2	1 h
Spurr : Aceton 100 % (getrocknet) 2:1	1h
Spurr	Über Nacht bei 4°C

Die Nerven wurden anschließend in einer mit Spurr gefüllten Silikonform eingebettet. Das Kunstharz wurde dann für 24 Stunden bei 60°C auspolymerisiert. Die Blöckchen wurden bis zur Weiterverarbeitung bei Raumtemperatur gelagert (Schmid et al., 2000).

#### 2.9.4.3 Anfertigung von Semi- und Ultradünnschnitten für die Elektronenmikroskopie

Für morphologische Analysen des N. femoralis und N. plantaris wurden in Vorbereitung auf die Elektronenmikroskopie Semidünnschnitte der in Kunstharz eingebetteten Nerven am Ultramikrotom angefertigt. Mit einem Glasmesser wurden 50 µm dicke Querschnitte angefertigt, die in einem, sich am Glasmesser befindlichen, wassergefüllten Schälchen aufgefangen wurden. Die Schnitte wurden mit Hilfe eines Pinsels auf einen Objektträger transferiert, der mit HPLC-Wasser benetzt war. Dieser wurde auf einer Heizplatte bei 60°C getrocknet und die Schnitte anschließend für drei Minuten mit Methylenblau gefärbt. Nach einem Waschschrift und erneuter Trocknung bei 60°C wurde die Qualität des Schnittes im Lichtmikroskop begutachtet.

Wurde auf Semidünnebene eine gute Position innerhalb des Nerven gefunden, folgte die Anfertigung von Ultradünnschnitten. Hierzu wurde ein spezielles Diamantmesser mit integrierter Auffangschale für die Schnitte verwendet. Es wurden Querschnitte mit einer Dicke von 70 nm angefertigt, die in der wassergefüllten Auffangschale silbern bis golden schimmern. Das Strecken der Schnitte mit Chloroform-Dampf diente dazu, Falten und Unebenheiten im Präparat zu vermeiden.



Die Schnitte wurden anschließend auf die matte Seite eines Kupfernetzchen (Grid) aufgenommen und bis zur Analyse im Elektronenmikroskop in einer speziellen Grid-Box aufbewahrt.

#### 2.9.4.4 Kontrastieren von Ultradünnschnitten

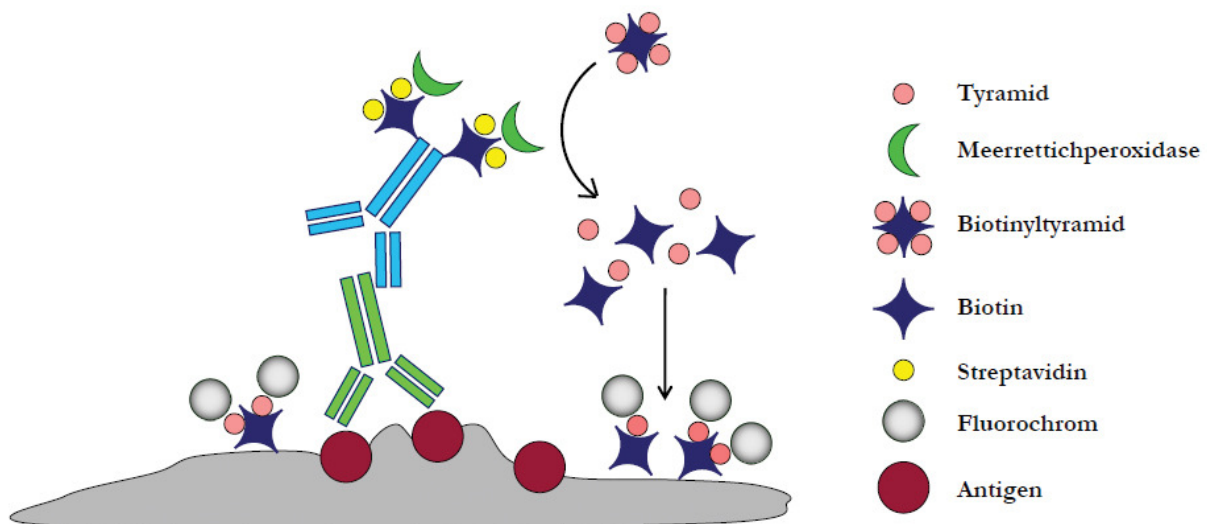
Um die feinen Nervenstrukturen im Elektronenmikroskop sichtbar zu machen, müssen die Gewebepreparate zuvor mit Bleicitrat kontrastiert werden. Die aus Bleinitrat ( $\text{PbNO}_3$ ) und Natriumcitrat ( $\text{Na}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)2\text{H}_2\text{O}$ ) hergestellte Bleicitrat-Lösung ( $\text{PbC}_6\text{H}_5\text{O}_7$ ) wird dabei durch einen Filter auf eine nummerierte Haftmatte in einer Petrischale getropft. Der Kupfergrid wird mit der glänzenden Seite nach unten in den Bleicitrat-Topfen gelegt und für 5 min inkubiert. Anschließend wird der Grid vorsichtig mit einer spitzen Pinzette aus dem Bleicitrat entnommen und mit  $\text{CO}_2$ -freiem Wasser in mehreren Schritten gut abgespült. Um das überschüssige Wasser zu entfernen wird der Grid vorsichtig auf Filterpapier abgetropft und anschließend in der Grid-Box bis zur Betrachtung im Elektronenmikroskop verwahrt.

#### 2.9.4.5 Immunhistochemie

Zur Quantifizierung immunrelevanter Zellen in peripheren Nerven von P0-defizienten Mäusen wurden Kryoschnitte des N. femoralis und N. plantaris immunhistochemisch gefärbt und anschließend fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Die Verwendung fluoreszierender Farbstoffe, sog. Fluorochrome, die durch Licht einer bestimmten Wellenlänge zur Emission von Licht einer anderen Wellenlänge angeregt werden, macht es dabei möglich, ein bestimmtes Antigen zu detektieren.

Die Färbung von Makrophagen, T-Zellen und neutrophilen Granulozyten erfolgte mittels tyramidamplifizierter Avidin-Biotin Methode, die im Gegensatz zur einfachen Avidin-Biotin-Färbung für eine ausreichende Intensität des Fluoreszenzsignals sorgt. Der zu untersuchende Gefrierschnitt wird dabei zunächst mit einem spezifischen Antikörper gefärbt, der gegen das gesuchte Epitop gerichtet ist. Danach folgt die Inkubation eines, gegen die Tierspezies des Primärantikörpers gerichteten Biotin-konjugierten Sekundärantikörpers. Im Anschluss folgt die Bindung einer Streptavidin-gekoppelten Meerrettichperoxidase an den Antikörperkomplex, der im

nächsten Schritt mit Biotinyl-Tyramid versetzt wird. Biotinyl-Tyramid dient als Substrat für die Peroxidase und wird von dieser in wasserunlösliches Biotin umgesetzt, das am Epitop präzipitiert (Hopman et al., 1998). Durch die Zugabe des Streptavidin-Chromogen-Komplexes AlexaFluor 594<sup>®</sup> kommt es aufgrund der durch das Biotinyl-Tyramid verursachten und damit vervielfältigten Biotin-Bindungsmöglichkeiten zu einer deutlichen Verstärkung des Fluoreszenzsignals. Die Konservierung der Nervenschnitte erfolgte abschließend durch die Zugabe eines mit DAPI (4',6-Diamino-2-Phenylindol) beinhaltendem Einbettmediums und der Versiegelung mit einem Deckglas. Der Fluoreszenzfarbstoff DAPI ist ein geeigneter Marker für die Anfärbung von Zellkernen, da er sich durch die spezifische Bindung an die Basen Adenin und Thymin in der kleinen Furche der DNA anlagert. Durch die Anregung mit UV-Licht fluoresziert DAPI im sichtbaren Bereich in blauer Farbe.



**Abbildung 2.1:** Schematische Darstellung der immunhistochemischen Färbung nach Tyramid-amplifizierter Avidin-Biotin Methode. Der gegen das zu untersuchende Antigen spezifische Primärantikörper ist hellgrün gefärbt, der konjugierende Sekundärantikörper hellblau.

### 2.9.4.5.1 Immunhistochemische Quantifizierung von Makrophagen

Die spezifische Färbung endoneuraler Makrophagen wurde mit einem gegen das Oberflächenmolekül F4/80 gerichteten Antikörper durchgeführt. F4/80 ist ein 160 kDa schweres Glykoprotein, das ausschließlich auf der Oberfläche von Makrophagen und Mikroglia exprimiert wird.

Tabelle 2.5: Protokoll zur immunhistochemischen Färbung von Makrophagen

Schritt	Konzentration	Zeit	Lösungsmittel
Waschen		3 x 5min	PBS
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	3 % v/v	15 min	Methanol
Waschen		3 x 5min	H <sub>2</sub> O/PBS
Blockierungspuffer		15 min	
1. Antikörper (F4/80)	1 : 250	ÜN bei 4°C	Blockierungspuffer
Waschen		3 x 5min	PBS
2. Antikörper (BRbaR)	1 : 100	45 min	Blockierungspuffer
Waschen		3 x 5min	PBS
Streptavidin-HRP	1 : 100	45 min	Blockierungspuffer
Waschen		3 x 5min	PBS
Biotinyl-Tyramid	1 : 100	10 min	Elutionspuffer
Waschen		3 x 5min	H <sub>2</sub> O/PBS
AlexaFluor594®	1 : 100	45 min	Blockierungspuffer
Waschen		3 x 5min	PBS
DAPI			

BRbaR: Biotinylierter Kaninchen-anti-Ratte Antikörper; Streptavidin-HRP: Streptavidin-Myeloperoxidase Konjugat; ÜN: über Nacht.

### 2.9.4.5.2 Immunhistochemische Quantifizierung von T-Lymphozyten

T-Lymphozyten exprimieren auf ihrer Oberfläche den membranständigen Rezeptor CD3 (*Cluster of differentiation-3*). Der CD3-Rezeptor spielt eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion und ist nach seiner Aktivierung an der Zelloberfläche mit dem T-Zell-Rezeptor (TCR) verbunden. Für die immunhistochemische Färbung von T-Zellen wurde ein monoklonaler CD3-Antikörper verwendet.

Tabelle 2.6: Protokoll zur immunhistochemischen Färbung von T-Zellen

Schritt	Konzentration	Zeit	Lösungsmittel
Waschen		3 x 5min	PBS
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	3 % v/v	15 min	Methanol
Waschen		3 x 5min	H <sub>2</sub> O/PBS
Blockierungspuffer		15 min	
1. Antikörper (CD3)	1 : 100	ÜN bei 4°C	Blockierungspuffer
Waschen		3 x 5min	PBS
2. Antikörper (BGoaHa)	1 : 100	45 min	Blockierungspuffer
Waschen		3 x 5min	PBS
Streptavidin-HRP	1 : 100	45 min	Blockierungspuffer
Waschen		3 x 5min	PBS
Biotinyl-Tyramid	1 : 100	10 min	Elutionspuffer
Waschen		3 x 5min	H <sub>2</sub> O/PBS
AlexaFluor594®	1 : 100	45 min	Blockierungspuffer
Waschen		3 x 5min	PBS
DAPI			

BGoaHa: Biotinylierter Ziege-anti-Hamster Antikörper; Streptavidin-HRP: Streptavidin-Meerrettichperoxidase Konjugat; ÜN: über Nacht.

### 2.9.4.5.3 Immunhistochemische Quantifizierung von neutrophilen Granulozyten

Die Färbung neutrophiler Granulozyten erfolgte mit einem monoklonalen Antikörper gegen das 40 kDa schwere 7/4-Oberflächenmolekül, das ausschließlich von polymorphkernigen Leukozyten exprimiert wird.

Tabelle 2.7: Protokoll zur immunhistochemischen Färbung von neutrophilen Granulozyten

Schritt	Konzentration	Zeit	Lösungsmittel
Waschen		3 x 5min	PBS
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	3 % v/v	15 min	Methanol
Waschen		3 x 5min	H <sub>2</sub> O/PBS
Blockierungspuffer		15 min	
1. Antikörper (7/4)	1 : 200	ÜN bei 4°C	Blockierungspuffer
Waschen		3 x 5min	PBS
2. Antikörper (BRbaR)	1 : 100	45 min	Blockierungspuffer
Waschen		3 x 5min	PBS
Streptavidin-HRP	1 : 100	45 min	Blockierungspuffer
Waschen		3 x 5min	PBS
Biotinyl-Tyramid	1 : 100	10 min	Elutionspuffer
Waschen		3 x 5min	H <sub>2</sub> O/PBS
AlexaFluor594®	1 : 100	45 min	Blockierungspuffer
Waschen		3 x 5min	PBS
DAPI			

BRbaR: Biotinylierter Kaninchen-anti-Ratte Antikörper; Streptavidin-HRP: Streptavidin-Myeloperoxidase Konjugat; ÜN: über Nacht.

#### 2.9.4.6 Fluoreszenzmikroskopie

Mithilfe der Fluoreszenzmikroskopie ist es möglich, mit fluoreszierenden Stoffen (Fluorochrome) gefärbte Antigene auf dem zu untersuchenden Präparat sichtbar zu machen und zu detektieren. Die Anregung von Fluorochromen mit Licht einer bestimmten Wellenlänge führt zur Emission von langwelligerem Licht, welches als Vorgang der Fluoreszenz bezeichnet wird. Die zu untersuchenden Zelltypen wurden mit den Fluorochromen AlexaFluor 594<sup>®</sup> (Absorptionsmaximum 594 nm, Emissionsmaximum 618 nm) und DAPI (Absorptionsmaximum 358 nm, Emissionsmaximum 461 nm) gefärbt. AlexaFluor 594<sup>®</sup>-gefärbte Antigene erscheinen auf dem Präparat in roter Farbe, durch DAPI-gefärbte Zellkerne leuchten im Fluoreszenzmikroskop blau.

Die immunhistochemisch-gefärbten Objektträger wurden in 200-facher Vergrößerung analysiert und digital fotografiert. Von jedem zu untersuchendem Tier wurden für die Quantifizierung von Makrophagen, T-Zellen und neutrophilen Granulozyten jeweils zwölf Nervenquerschnitte ausgewertet und daraus der Mittelwert mit Standardabweichung ermittelt. Dabei wurden nur Immunzellen gezählt, die sowohl für das mit AlexaFluor 594<sup>®</sup>-gefärbte Antigen als auch für DAPI positive Signale zeigten.

#### 2.9.4.7 Transmissions-Elektronenmikroskopie

Das Transmissionslektronenmikroskop (TEM) ähnelt im Prinzip einem umgekehrten Lichtmikroskop, doch werden hier ein Elektronen- anstelle eines Lichtstrahls und magnetische Spulen anstelle von Glaslinsen verwendet. Dabei ist die Wellenlänge der Elektronen abhängig von ihrer Geschwindigkeit, die über die Beschleunigungsspannung geregelt wird. Aufgrund der viel kleineren Wellenlängen der Elektronen im Vergleich zur Wellenlänge des sichtbaren Lichts wird im TEM eine bessere Auflösung von bis zu 2 nm bei biologischen Proben erreicht.

Da Elektronen durch die Kollision mit Luftmolekülen gestreut werden, muss im Strahlengang zuerst die Luft abgepumpt und ein Vakuum hergestellt werden. Dies hat zur Konsequenz, dass kein lebendes Material im TEM betrachtet werden kann. Ausgehend von ihrer Quelle werden die Elektronen über eine nahegelegene Anode beschleunigt. Der Elektronenstrahl wird dann durch magnetische Spulen, die sich in bestimmten Intervallen entlang des Mikroskops befinden

gebündelt. Über eine Luftschleuse wird die zu untersuchende Probe in das TEM eingeschleust, wo sie dann auf den Elektronenstrahl trifft. Kontrast wird mit den elektronendichten Schwermetallen Osmium und Blei erreicht, die lokal Elektronen streuen und sie somit dem Strahl entziehen, der die Probe durchtritt. Nicht gestreute Elektronen werden dagegen gebündelt und erreichen den Leuchtschirm.

Die mit Osmiumtetroxid und Bleicitrat kontrastierten Nervenquerschnitte wurden bei 600-facher Vergrößerung im TEM begutachtet, digital fotografiert und anschließend ausgewertet. Die demyelinisierende Pathologie im N. quadriceps femoris von P0<sup>+/-</sup> Mäusen wurde anhand der Anzahl dünn-myelinisierter und demyelinisierter Axone sowie der Anzahl an Axonen mit Zwiebelschalenbildung, den sog. „onion bulbs“ und phagozytierenden Makrophagen charakterisiert. Die Nervenpathologie im N. plantaris von P0<sup>-/-</sup> Mäusen wurde anhand der Gesamtzahl an Axonen bewertet.

### 2.9.5 Quantitative *Realtime*-PCR (qRT-PCR)

Molekularbiologische Veränderungen, die durch eine CCR2-Defizienz in den demyelinisierenden Nerven von P0<sup>+/-</sup> Mäusen hervorgerufen werden und zu einer Regulation von pro- und anti-inflammatorischen Cytokinen und Chemokinen führen können, wurden mithilfe der quantitativen *Realtime* PCR-Methode (qRT-PCR) untersucht. Dabei wurden Cytokine in Betracht gezogen, die möglicherweise eine CCR2-Defizienz regulieren und in der inflammatorischen Immunantwort bei P0<sup>+/-</sup> Mäusen involviert sind.

Im Gegensatz zur konventionellen PCR, bei der eine quantitative Analyse der amplifizierten DNA-Kopien aufgrund schwankender Verhältnisse der DNA-Ausgangsmenge sehr unpräzise ist, macht es die Verwendung der qRT-PCR möglich, während der gesamten Amplifikation mithilfe fluoreszierender Reporterfarbstoffe die Zunahme des generierten PCR-Produkts zu detektieren. Bei einer idealen Effizienz der PCR-Reaktion führt jeder Amplifikationszyklus zu einer Verdopplung der DNA-Moleküle und einer damit verbundenen proportionalen Zunahme der Fluoreszenz, was eine exakte Berechnung der DNA-Ausgangsmenge möglich macht (Pfaffl et al., 2002).

### 2.9.5.1 Präparation und Fixierung peripher Nerven

Die zu untersuchenden Tiere wurden bis zum Eintritt des Todes in eine tiefe Ethernarkose versetzt und anschließend auf einem Präparationsbrett fixiert. Der N. femoralis wurde ventral durch einen Schnitt vom Oberschenkel in Richtung Hüfte freigelegt und die beiden Nervenäste N. quadriceps femoris und N. saphenus femoris voneinander getrennt. Das Nervengewebe wurde umgehend in ein Reaktionsgefäß überführt, in flüssigem Stickstoff kryoprotektioniert und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C gelagert.

### 2.9.5.2 RNA-Extraktion aus peripheren Nerven

Zur Extraktion der RNA aus dem Nervengewebe und der gleichzeitigen Entfernung von DNA, Lipiden und Proteinen wurde das RNeasy-Micro Kit (Qiagen GmbH) verwendet. Die Verwendung dieses Kits macht es möglich, aus den geringen Mengen an entnommenem Nervengewebe kleinste Mengen von total-RNA selektiv zu isolieren. Durch das Herausfiltern von RNA-Molekülen mit einer Größe  $\leq 200$  Nukleotide wird weiterhin eine Anreicherung von mRNA Molekülen erreicht. Aufgrund der geringen RNA-Mengen wurden die motorischen Äste des Femoralis-Nerven (N. quadriceps femoris) von je zwei Tieren in einem Reaktionsgefäß zusammen geführt. Durch die Zugabe von Lysepuffer und der Gewebekomogenisation mit einem Ultraturrax wurde für einen ausreichenden Zellaufschluß gesorgt. Die Extraktion der RNA erfolgte nach den Angaben des Herstellerprotokolls (Qiagen GmbH). Die extrahierte RNA wurde in einem Endvolumen von 15  $\mu$ l RNase-freiem Wasser eluiert und bis zur Weiterverwendung bei -80°C gelagert.

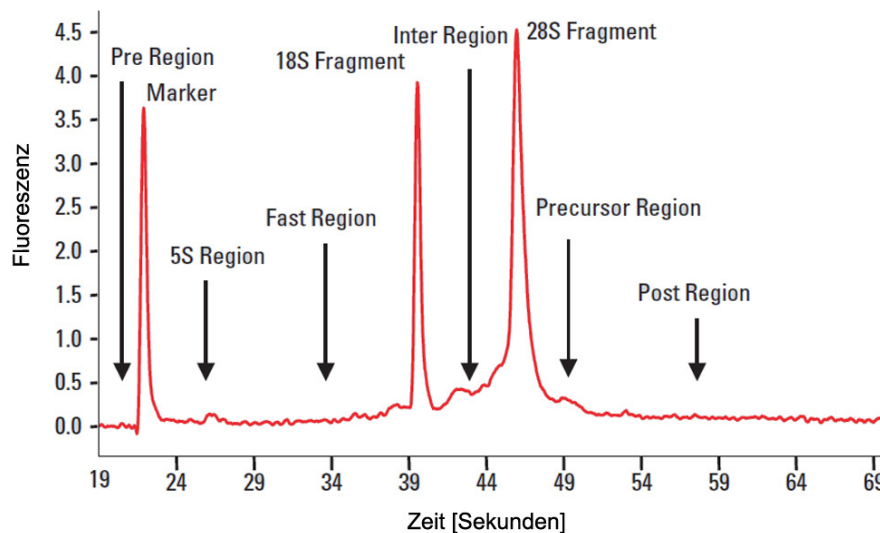
### 2.9.5.3 Bestimmung der RNA-Integrität

Im Verlauf der Genexpression besitzt das mRNA-Molekül als transkriptives Zwischenelement auf dem Informationsweg vom Gen zum Protein eine bedeutende Rolle. Die Integrität der mRNA ist somit eine wichtige Voraussetzung für die Proteinsynthese der exprimierten Gene. Aufgrund einer relativ hohen Instabilität des mRNA-Moleküls sowie der Gefahr der Degradation durch exogene



Ribonukleasen ist eine Qualitäts- und Integritätskontrolle der RNA für Expressionsstudien mittels qRT-PCR unabdingbar.

Eine standardisierte Qualitätskontrolle wurde für die folgenden Genexpressionsstudien mit dem Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) durchgeführt. Mithilfe dieser Methode, die auf dem Prinzip der Micro-Kapillarelektrophorese (Lab-on-a-chip Verfahren) beruht, ist es möglich, kleinste Mengen an RNA zu detektieren. Die RNA-Proben werden durch gelhaltige Mikrokanäle eines RNA-Chips anhand ihres Molekulargewichtes elektrophoretisch aufgetrennt und die RNA-Fragmente durch laserinduzierte Fluoreszenzdetektion erfasst. Zur Darstellung werden die Laufweiten-Elutionszeiten der einzelnen Proben mit vordefinierten RNA-Größen in Korrelation gebracht und als digitales Elektropherogramm dargestellt (Abb. 2.2)



**Abbildung 2.2:** Exemplarische Darstellung eines Elektropherogramms. Unterschiedliche Regionen und Spitzenwerte der 18S- und 28S-RNA innerhalb des Elektropherogramms repräsentieren definierte Bestandteile der total-RNA. Diesen Regionen werden Qualitätswerte zugeordnet, aus denen sich das RNA-Integritätsmaß (RIN) ableiten lässt (nach Mueller et al., 2004).

Das Elektropherogramm visualisiert die zeitabhängige Größenseparation einzelner RNA-Fragmente, die in verschiedene definierte Regionen unterteilt sind (Mueller et al., 2004; Schroeder et al., 2006). Diesen Regionen werden definierte Qualitätswerte auf einer Skala von 1 bis 10 zugewiesen, aus denen sich das RNA-Integritätsmaß (RIN) errechnet. Die RNA-Integrität ist umso größer, je höher der RIN-Wert ist.

Zur Bestimmung der RNA-Integrität wurde von jeder Probe 1 µl entnommen und auf einen RNA-Pico-Chip aufgetragen. Für die folgenden Experimente wurden ausschließlich RNA-Proben mit einer RIN  $\geq 6$  eingesetzt.

#### 2.9.5.4 cDNA-Synthese

Um die in der mRNA enthaltenen Sequenzinformationen rückläufig in cDNA (*complementary* DNA) umzusetzen, wurde das Prinzip der Reversen Transkription angewandt. Der Einsatz von Oligo-(dT)-Primern, die komplementär am Poly-(A)-Schwanz der mRNA binden, ermöglicht die Transkription der mRNA-Sequenz in einen komplementären cDNA-Strang. Nach erfolgter cDNA-Synthese wird der RNA-Strang von der RNase-H-Domäne der reversen Transkriptase abgebaut, so dass ein einzelsträngiges cDNA-Molekül mit komplementärer Sequenz zum ursprünglichen mRNA-Molekül vorliegt.

Die aus peripheren Nerven isolierte RNA wurde mithilfe des QuantiTect Reverse-Transkriptions-Kit (Qiagen GmbH) in cDNA umgeschrieben. Hierzu wurden 12 µl der isolierten RNA eingesetzt, die cDNA-Synthese erfolgte nach Angaben des Herstellerprotokolls.

#### 2.9.5.5 Oligonukleotide für die qRT-PCR Expressionsanalysen

Für die Expressionsanalysen der zu untersuchenden Kandidatengene wurden kommerziell erhältliche, für die qRT-PCR optimierte Primer eingesetzt (QuantiTect Primer Assaya, Qiagen GmbH). Es wurden ausschließlich Primer eingesetzt, die über mehrere Exons hinweg binden und somit ausschließlich transkribierte cDNA amplifizieren.

Tabelle 2.8: Primer für die Expressionsanalysen der Kandidatengene

Kandidatengen	QuantiTect Primer	Größe
Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)	QT01658692	144 bp
Tumor-Nekrose Faktor $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )	QT00104006	112 bp
Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor (M-CSF)	QT01164324	83 bp
Chemokin (CC-Motiv)-Ligand 2 (CCL2)	QT00167832	118 bp
Interleukin 6 (IL-6)	QT00098875	128 bp
Interleukin 10 (IL-10)	QT00106169	103 bp

### 2.9.5.6 Quantitative Real Time PCR (qRT-PCR)

Dem Prinzip der konventionellen PCR folgend wurde bei der qRT-PCR die einzelsträngige cDNA über einen für die Kandidatengene spezifischen Oligonukleotidprimer als Initiationsstelle der hier verwendeten HotStar Taq<sup>®</sup> DNA-Polymerase nach folgendem Ansatz (Tab. 2.9) amplifiziert. Die zu untersuchenden Proben pro Kandidatengen, Referenzkontrolle und Negativkontrolle wurden in Duplikaten analysiert.

Tabelle 2.9: Reaktionsansatz einer Probe für die qRT-PCR

Komponente	Menge
SYBR-Green PCR-Mastermix	5 $\mu$ l
10x Quantitect Primer Assay	1 $\mu$ l
RNase-freies Wasser	3 $\mu$ l
cDNA-Probe	1 $\mu$ l
	$\Sigma$ 10 $\mu$ l

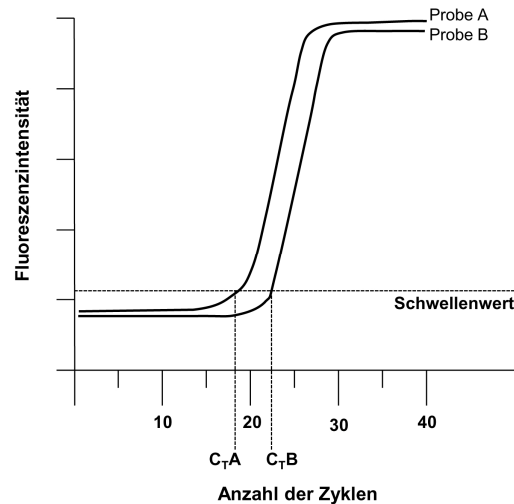
Die qRT-PCR-Analysen wurden mit einem ABI PRISM<sup>®</sup> 7700 RT-PCR Cycler (Applied Biosystems) nach dem SYBR-Green-Mastermix-Protokoll (Qiagen GmbH) durchgeführt (Tab. 2.10).

Tabelle 2.10: Zyklenstruktur der qRT-PCR

Schritt	Temperatur	Zeit
1. Aktivierung der Polymerase	95°C	10 min
2. Denaturierung	94°C	15 sec
3. Primerbindung (Annealing)	55°C	30 sec
4. Elongation	72 °C	30 sec
5. Wiederholung Schritt 2-4 (39x)		
6. Schmelzkurvenanalyse	60°C-95°C	15 sec

Für die Genexpressionsanalysen wurde als Reporterfluoreszenzfarbstoff SYBR-Green eingesetzt. Dieser Cyanin-Farbstoff bindet ausschließlich doppelsträngige DNA und fluoresziert im gebundenen Zustand nach Anregung mit Licht, frei in Lösung zeigt der Farbstoff keine Fluoreszenz (Bustin, 2000). Während der qRT-PCR steigt das SYBR-Green Fluoreszenzsignal mit der Menge an amplifizierter doppelsträngiger DNA.

Im Verlauf einer qRT-PCR (Abb. 2.3) ist zu Beginn der Amplifikation das detektierbare Fluoreszenzsignal noch so schwach, dass es nicht vom vorherrschenden Hintergrundrauschen zu unterscheiden ist. Mit fortschreitender Zykluszahl und zunehmendem PCR-Produkt steigt das Fluoreszenzsignal exponentiell an und kann einen festgelegten Schwellenwert bezüglich der Hintergrundsignale überschreiten. Dabei wird der Zyklus, in dem die Fluoreszenz den Schwellenwert erstmals überschreitet und die Amplifikationskurve in den exponentiellen Verlauf eintritt als  $C_T$ -Wert (*threshold cycle*) bezeichnet. Die ermittelten  $C_T$ -Werte der einzelnen qRT-PCR-Analysen stellen die Basis für die Berechnung der relativen Expression der Kandidatengene in den untersuchten Gruppen dar. Je höher die Ausgangsmenge an mRNA ist, desto niedriger ist der  $C_T$ -Wert bzw. die Zykluszahl, die für die Überschreitung des Schwellenwertes nötig ist.



**Abbildung 2.3:** schematische Darstellung der qRT-PCR Amplifikationskurve zweier Proben, bei denen die Fluoreszenzintensität gegen die Anzahl der Zyklen aufgetragen ist. Der Schwellenwert dient als Ausgangspunkt zur Berechnung der DNA-Ausgangsmenge einer bestimmten Probe beim Start der qRT-PCR. Der  $C_T$ -Wert spiegelt den Zyklus wieder, bei dem das Fluoreszenzsignal der jeweiligen Probe erstmalig einen messbaren Zuwachs verzeichnet.

Die durch eine CCR2-Defizienz veränderte Expression der untersuchten Gene wurde mithilfe der relativen Quantifizierung berechnet. Die Expression der Kandidatengene wurde dabei zunächst mit der eines nicht regulierten Referenzgens (*housekeeping gene*; HKG) normalisiert. Zur Normalisierung wurde die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) als Referenzgen verwendet. Die relativen Expressionsdaten der untersuchten Gruppen wurden anschließend auf die Expressionsdaten der Kontrollgruppe bezogen.

Die Berechnung des Expressionsunterschiedes zwischen der Kontroll- und Untersuchungsgruppe erfolgte nach dem Effizienz-korrigierten Modell der  $\Delta\Delta C_T$ -Methode (Abb. 2.4).

Mit der Software „Relative Expression Software Tool (REST)“ (Pfaffl et al., 2002) wurden die Expressionsdaten der einzelnen Gruppen als Mittelwerte (MW) zusammengefasst und anschließend die mittleren Expressionsunterschiede (R) der untersuchten Gruppen, sowie die Varianzen der einzelnen Expressionen über ein bestimmtes HKG normalisiert. Die Statistik zur Berechnung der Expressionsunterschiede basiert auf einem robusten und von einer Normalverteilung unabhängigen Randomisierungstest, bei dem 1000 Randomisierungen für jede einzelne Untersuchung pro Kandidatengen durchgeführt wurden. Die Effizienz (E) der qRT-PCR aller untersuchten Gruppen wurde auf einen Wert von 90% festgelegt. Dieser Wert beruht auf Untersuchungen und

Ergebnissen eines experimentellen Berechnungsmodells zur Kinetik der *Realtime*-PCR Effizienz (Tichopad et al., 2003).

$$R = \frac{(E_{\text{Kandidatengen}})^{\Delta C_{T \text{ Kandidatengen}} (MW_{\text{Kontrolle}} - MW_{\text{Probe}})}}{(E_{\text{HKG}})^{\Delta C_{T \text{ HKG}} (MW_{\text{Kontrolle}} - MW_{\text{Probe}})}}$$

Abbildung 2.4: Formel zur Effizienz-korrigierten  $\Delta\Delta C_T$ -Methode (R: Expressionsdifferenz, E: Effizienz)

### 2.9.5.7 Validierung der qRT-PCR

Die Schmelzkurvenanalyse am Ende einer qRT-PCR macht es möglich, die korrekte Amplifikation der Fragmente zu überprüfen. Dabei wird im Verlauf der Schmelzkurvenanalyse die Temperatur von 60°C auf 95°C erhöht, was ein Aufschmelzen der doppelsträngigen DNA-Moleküle bewirkt, sobald die spezifische Schmelztemperatur der jeweiligen Produktlänge und dessen GC- und AT-Regionen erreicht wird. Bei korrekter Amplifikation wird ausschließlich eine der Fragmentlänge entsprechende Schmelztemperatur detektiert. Mehrere Schmelztemperaturen deuten auf eine unspezifische Primeranlagerung (Primerdimere) und somit auf eine unspezifische Amplifikation hin. Da SYBR-Green nur in Verbindung mit doppelsträngiger DNA ein Fluoreszenzsignal emittiert, kommt es mit zunehmender Konzentration an einzelsträngiger DNA zu einer Abnahme der detektierbaren Fluoreszenz

Zur Kontrolle der korrekten Amplifikation wurden nach Abschluss der qRT-PCR einige Stichproben auf ein Agarosegel (2 %) aufgetragen und elektrophoretisch getrennt. Bei korrekter Amplifikation der cDNA wurde jeweils eine Bande in der entsprechenden Größe detektiert.

### 2.9.6 Proteome Profiler™ Array (Maus Cytokin-Array)

Die Verwendung des *Proteome Profiler*™ Cytokin-Arrays (R&D Systems) macht es möglich, die relative Menge verschiedener Cytokine und Chemokine innerhalb einer Probe gleichzeitig zu bestimmen. Dabei werden Gewebelysate mit einem Gemisch biotinylierter Detektions-Antikörper versetzt und auf einer Nitrozellulose-Membran inkubiert, die bereits mit 40 ausgewählten Erstantikörpern markiert ist. Cytokine und Chemokine, die in der zu untersuchenden Probe vorhanden sind, binden über den entsprechenden Detektions-Antikörper an den immobilisierten Erstantikörper auf der Membran. Der Antikörperkomplex wird letztendlich mit der Streptavidin-Meeretichperoxidase (HRP) konjugiert und mit ECL-Substratlösung inkubiert. Das durch die Chemolumineszenz hervorgerufene Signal auf der Membran wird über einen Autoradiographie-Film detektiert. Das an jedem Punkt detektierte Lichtsignal ist proportional zu der Menge an gebundenem Cytokin.

Untersucht wurden Nervenlysate des N. quadriceps femoris von  $P0^{+/-}CCR2^{+/-}$  und  $P0^{+/-}CCR2^{-/-}$  Mäusen sowie den entsprechenden Wildtyp-Kontrollen im Alter von zwölf Monaten. Pro Gruppe wurden jeweils zwei Messungen mit dem *Proteome Profiler*™ Cytokin-Array durchgeführt.

#### 2.9.6.1 Protein-Extraktion aus peripheren Nerven

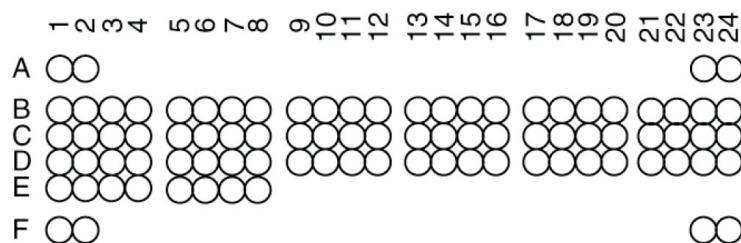
Das Nervengewebe wurde wie unter Punkt 2.9.5.1 beschrieben entnommen. Für die Analyse des N. quadriceps femoris wurden die Nervenäste von je zwei Tieren in einem Reaktionsgefäß vereint. Die Gewebeproben wurden mit 100 µl Lysepuffer versetzt, mit einem Ultraturrax homogenisiert und die Zellen zusätzlich mit einem Ultraschallgerät behandelt, um für einen ausreichenden Zellaufschluß zu sorgen. Die Gewebelysate wurden anschließend für 20 min bei 14000 rpm, 4°C zentrifugiert und der Überstand abgenommen.

Die Bestimmung des Proteingehalts erfolgte nach *Bradford*. Hierbei wurde der Farbstoff Coomassie-Blau verwendet, der mit basischen Aminosäuren reagiert und dabei sein Absorptionsmaximum hin zu 595 nm verschiebt. Durch die Messung der Absorption bei 595 nm kann somit die Konzentration der zu untersuchenden Proteinlösungen bestimmt werden. Zur Bestimmung des Proteingehalts wurden 2 µl der zu untersuchenden Probe in eine Lösung aus 500 µl HPLC-Wasser

und 498 µl Coomassie-Blau gegeben und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Für den Nullwert (Blank) wurden 500 µl HPLC-Wasser und 500 µl Coomassie-Blau verwendet. Die Proben wurden anschließend in eine Plastikkuvette überführt und im Biophotometer (Eppendorf GmbH) bei 595 nm gemessen. Als Proteinstandard für die Eichung wurde bovines Serumalbumin (BSA) eingesetzt.

### 2.9.6.2 Durchführung

Zur Untersuchung des Cytokin- und Chemokingehalts in peripheren Nerven von P0-defizienten Mäusen wurden jeweils 100 µg Protein einer Probe mit 15 µl des biotinylierten Detektions-Antikörpermischungsversetzt und auf der mit Antikörpern gegen 40 Cytokine und Chemokine markierten Membran inkubiert. Die Durchführung des *Proteome Profiler*<sup>™</sup> Cytokin-Assays erfolgte nach Angaben des Herstellerprotokolls (R&D Systems). Die Detektion der einzelnen Cytokine und Chemokine erfolgte durch ein chemolumineszentes Signal, das auf einen Autoradiographie-Film aufgenommen wurde. Die Expositionszeit betrug jeweils 10 min. Die Filme wurden anschließend mithilfe eines Phospho-Imagers densitometrisch analysiert. Die einzelnen Punkte (Spots) entsprechen dabei bestimmten Cytokinen und Chemokinen, die in Duplikaten angeordnet sind (siehe Abb. 2.5). Jeder Cytokin-/Chemokin-Spot, die Positivkontrolle sowie der Hintergrund (Blank) werden dabei einer Intensitätsmessung unterzogen. Nach Abzug des Blank-Wertes von jeder Probe wurden die Werte aus den einzelnen Messungen gemittelt und die relative Veränderung des Cytokin-Niveaus als Pixeldichte mit Standardfehler dargestellt.



**Abbildung 2.5:** Schematische Darstellung des *Proteome Profiler*<sup>™</sup> Cytokin-Assays. Jeder Spot entspricht einem bestimmten Cytokin oder Chemokin, das in Duplikaten angeordnet ist.



Koordinate	Target/Kontrolle	Koordinate	Target/Kontrolle
A1, A2	Positivkontrolle	C17, C18	IL-16
A23, A24	Positivkontrolle	C19, C20	IL-17
B1, B2	CXCL13	C21, C22	IL-23
B3, B4	C5a	C23, C24	IL-27
B5, B6	G-CSF	D1, D2	CXCL10 (IP-10)
B7, B8	GM-CSF	D3, D4	CXCL11
B9, B10	CCL1	D5, D6	KC
B11, B12	CCL11 (Eotaxin)	D7, D8	M-CSF
B13, B14	sICAM (CD54)	D9, D10	CCL2 (MCP-1)
B15, B16	IFN- $\gamma$	D11, D12	CCL12 (MCP-5)
B17, B18	IL-1 $\alpha$	D13, D14	CXCL9
B19, B20	IL-1 $\beta$	D15, D16	CCL3 (MIP-1 $\alpha$ )
B21, B22	IL-1ra	D17, D18	CCL4 (MIP-1 $\beta$ )
B23, B24	IL-2	D19, D20	MIP-2
C1, C2	IL-3	D21, D22	CCL5 (RANTES)
C3, C4	IL-4	D23, D24	CXCL12
C5, C6	IL-5	E1, E2	CCL17
C7, C8	IL-6	E3, E4	TIMP-1
C9, C10	IL-7	E5, E6	TNF- $\alpha$
C11, C12	IL-10	E7, E8	TREM-1
C13, C14	IL-13	F1, F2	Positivkontrolle
C15, C16	IL-12	F23, F24	Negativkontrolle

Tabelle 2.11: Übersicht der einzelnen Spot-Koordinaten mit den dazugehörigen Cytokinen, Chemokinen bzw. Kontrollen.

### 2.9.7 Durchflusszytometrie (*Fluorescence-Activated Cell Sorting*)

Mithilfe eines fluoreszenzaktivierten Zellsorters (FACS) können durch die Verwendung fluoreszenzmarkierter Antikörper einzelne Zellpopulationen klassifiziert und differenziert werden. Die fluoreszenzmarkierten Zellen werden im Zellsorter durch eine feine Kapillare gedrückt, wobei ein feiner Flüssigkeitsstrahl entsteht, der von einem Laserstrahl erfasst wird. Fotodetektoren messen dabei die Lichtstreuung, die ein Maß für die Größe und Granularität einer Zelle darstellt, sowie die Emission der verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe. Das emittierte Licht lässt auf die Bindung der markierten monoklonalen Antikörper und damit auf die Expression der Oberflächenproteine in jeder Zelle schließen.

In der vorliegenden Arbeit wurden Antikörper verwendet, die an die Fluorochrome Fluorescein-Iso-Thio-Cyanat (FITC: Absorptionsmaximum 495 nm, Emissionsmaximum 530 nm), R-Phycoerythrin (PE: Absorptionsmaximum 564 nm, Emissionsmaximum 575 nm) und Allophycocyanin (APC: Absorptionsmaximum 650 nm, Emissionsmaximum 660 nm) gekoppelt waren (Tsou et al. 2007).

#### 2.9.7.1 Gewinnung von peripherem Blut aus Mäusen

Die zu untersuchenden Mäuse wurden in eine tiefe Ethernarkose versetzt und auf einem Präparationsbrett fixiert. Die Öffnung des Brustkorbs und die Freilegung des Herzens erfolgte wie unter Schritt 2.9.3 beschrieben. Das noch schlagende Herz wurde mit einer Kanüle, an der eine Spritze angeschlossen war, am linken Atrium punktiert und das Blut durch Aufziehen der Spritze entnommen. Das periphere Blut wurde umgehend in ein EDTA-Röhrchen gegeben, um die Agglutination des Blutes zu verhindern.

#### 2.9.7.2 FACS-Färbung von murinen Leukozyten

Murine Leukozyten wurden mit fluoreszierenden Antikörpern gegen die Oberflächenmoleküle F4/80 (Makrophagen), 7/4 (Neutrophile und Monozyten) und Ly-6G/Ly-6C (polymorphkernige Leukozyten) gefärbt. Zu Beginn der Färbung muss das entnommene periphere Blut zunächst von roten Blutkörperchen depletiert werden. Dazu werden 500 µl des entnommenen Blutes in ein FACS-Röhrchen gegeben und mit 4 ml ACK-Puffer versetzt, die Proben gevortext und für 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 10 min zentrifugiert (1200 rpm bei 4°C) und die Zellen zweimal mit FACS-PBS gewaschen. Um eine Bindung der Fluorochrome an die Fc-Rezeptoren der zu untersuchenden Zelltypen zu verhindern, wurden die Proben für 30 min mit einem Antikörper gegen die Oberflächenantigene CD16/CD32 inkubiert (1:500). Nach einem 10-minütigen Zentrifugationsschritt (1200 rpm bei 4°C) wurden die Proben zweimal mit FACS-PBS gewaschen und anschließend in 100 µl FACS-PBS resuspendiert. Die fluoreszenzmarkierten Antikörper F4/80-APC (1:1000), Ly-6G/Ly-6C-FITC (1:200) und 7/4-PE (1:50) wurden in der

entsprechenden Verdünnung zur Probe gegeben und für 30 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Nach einem letzten Waschschrift und der Zellresuspension in 100 µl FACS-PBS erfolgte die Messung der Proben im FACS-Gerät.

Zur Durchführung wurde ein FACsQualibur (BD Bioscience) mit dazugehöriger Software (CellQuest) verwendet. Die Messung des gestreuten Lichts durch sensible Fotodetektoren liefert Informationen über die Größe (Forward Scatter, FSC) und die Granularität (Sideward Scatter, SSC), sowie der Fluoreszenzemission der Zellen, die in einem Konturenprofil dargestellt werden. Die Größe und Intensität der abgebildeten Kreisflächen spiegelt die Anzahl der Zellen mit den jeweiligen Eigenschaften wieder.

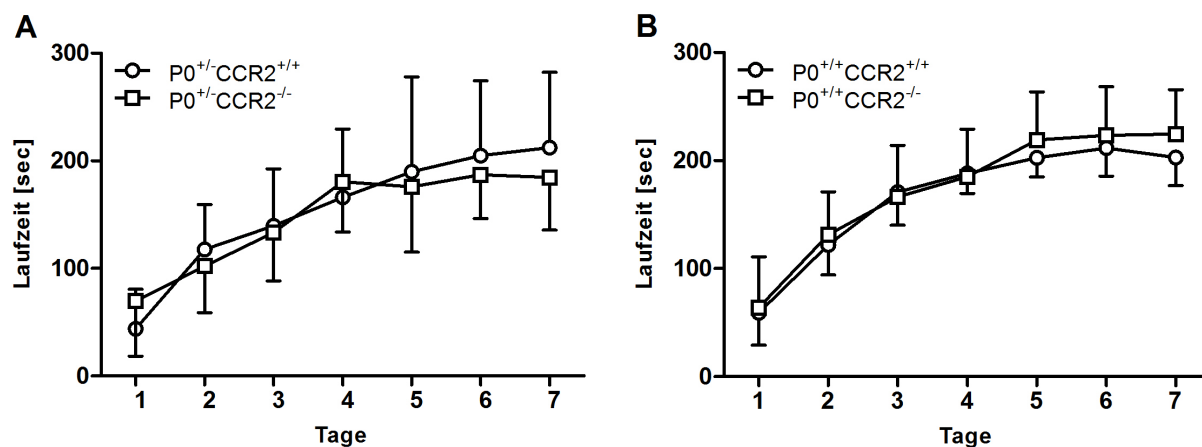


### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Verhaltenstestung: Rotarod-Test

Um die motorischen Fähigkeiten der P0-defizienten Tiere in Abhängigkeit von CCR2 beurteilen zu können, wurden die Mäuse im Alter von sechs und zwölf Monaten einer Rotarod-Testung unterzogen. Mithilfe dieses Verhaltenstests lässt sich ermitteln, wie lange es einer Maus möglich ist, die Balance auf einer rotierenden, sich beschleunigenden Walze zu halten. Innerhalb eines 300-sekündigen Testlaufes beschleunigt die Walze von 4 auf 40 Umdrehungen pro Minute. Jede zu untersuchende Maus wurde zum entsprechenden Zeitpunkt an sieben aufeinanderfolgenden Tagen jeweils fünfmal täglich getestet. Der daraus errechnete Mittelwert wurde als Gesamtlaufzeit für die einzelnen Versuchstage dargestellt.

##### 3.1.1 Rotarod-Testung mit P0<sup>+/-</sup> Mäusen

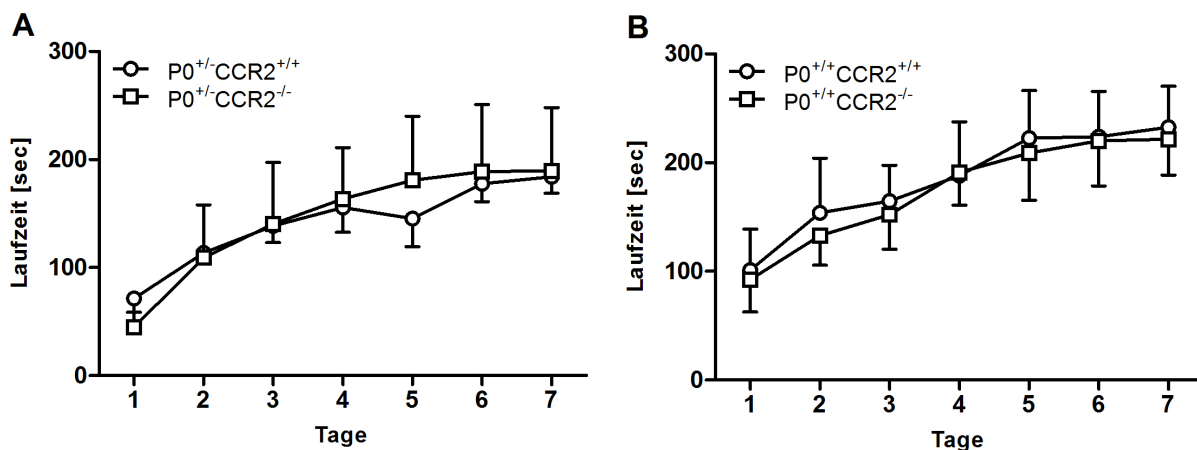


**Abbildung 3.1:** Auswertung des Rotarod-Tests im Alter von sechs Monaten. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung der jeweiligen Laufzeit auf der rotierenden Walze für P0<sup>+/-</sup>CCR2<sup>+/+</sup> (n=5) und P0<sup>+/-</sup>CCR2<sup>-/-</sup> (n=6) Mäuse (A) im Vergleich zu P0<sup>+/+</sup>CCR2<sup>+/+</sup> (n=7) und P0<sup>+/+</sup>CCR2<sup>-/-</sup> (n=6) Mäusen (B).

Im Alter von sechs Monaten kann in P0<sup>+/-</sup>CCR2<sup>+/+</sup> und P0<sup>+/-</sup>CCR2<sup>-/-</sup> Mäusen sowie in den beiden Wildtypkontrollen über einen Zeitraum von sieben Tagen hinweg eine Zunahme der motorischen Leistung beobachtet werden (Abb. 3.1). Im Vergleich zu P0<sup>+/-</sup>CCR2<sup>+/+</sup> Mäusen, bei denen an Tag 1

eine Laufzeitleistung von  $43,8 \pm 36,7$  sec zu verzeichnen ist, können sich  $P0^{+/-}CCR2^{-/-}$  Tiere durchschnittlich  $69,7 \pm 51,2$  sec auf der rotierenden Walze halten. An Tag 7 liegt die Laufleistung der  $P0^{+/-}CCR2^{+/+}$  Mäuse bei  $212,4 \pm 70,0$  sec, die der  $P0^{+/-}CCR2^{-/-}$  Mäuse leicht darunter bei  $184,5 \pm 49,0$  sec. Während des gesamten Untersuchungszeitraums ist kein signifikanter Unterschied in der motorischen Leistung zwischen beiden Gruppen zu beobachten (Abb. 3.1A). Die  $CCR2$ -Defizienz führt in sechs Monate alten  $P0^{+/-}$  Mäusen zu keiner Veränderung bezüglich der motorischen Leistungsfähigkeit auf dem Rotarod.

Altersgleiche  $P0^{+/+}CCR2^{+/+}$  und  $P0^{+/+}CCR2^{-/-}$  Mäuse zeigen im Vergleich zu den heterozygoten  $P0$ -Mutanten keine signifikanten Veränderungen bezüglich der motorischen Leistung (Abb. 3.1B).  $P0^{+/+}CCR2^{+/+}$  Mäuse starten an Tag 1 mit einer Laufzeit von  $59,2 \pm 30,0$  sec,  $P0^{+/+}CCR2^{-/-}$  können sich vergleichsweise gut mit  $63,9 \pm 46,9$  sec auf der rotierenden Walze halten. An Tag 7 liegt die Laufzeit der  $P0^{+/+}CCR2^{+/+}$  Tiere bei  $202,8 \pm 25,9$  sec, die der  $P0^{+/+}CCR2^{-/-}$  Tiere liegt knapp darüber bei  $224,6 \pm 40,9$  sec. Während der gesamten Testungsphase wurde zwischen diesen beiden Gruppen ebenfalls kein signifikanter Unterschied erreicht.



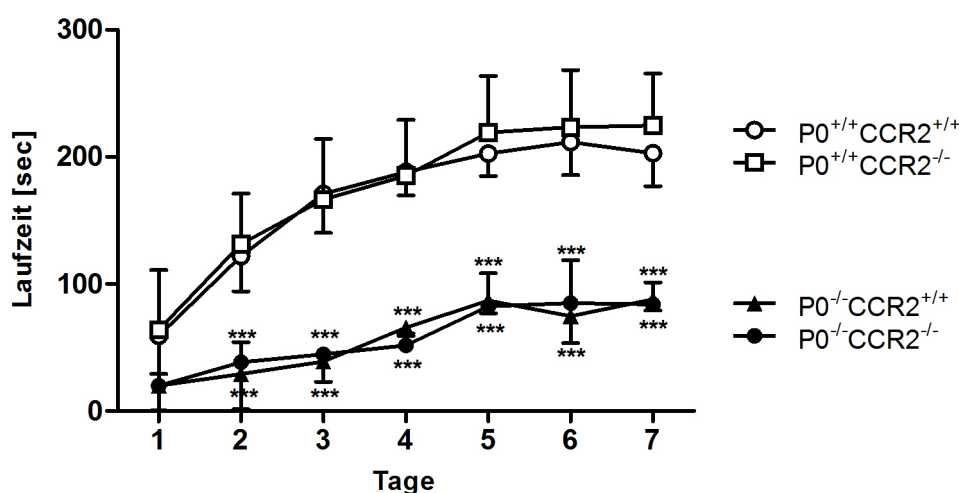
**Abbildung 3.2:** Auswertung des Rotarod-Tests im Alter von zwölf Monaten. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung der jeweiligen Laufzeit auf der rotierenden Walze für  $P0^{+/-}CCR2^{+/+}$  ( $n=5$ ) und  $P0^{+/-}CCR2^{-/-}$  ( $n=8$ ) Mäuse (A) im Vergleich zu  $P0^{+/+}CCR2^{+/+}$  ( $n=6$ ) und  $P0^{+/+}CCR2^{-/-}$  ( $n=8$ ) Mäusen (B).

Im Alter von zwölf Monaten kann wie zuvor in allen vier untersuchten Gruppen über einen Zeitraum von sieben Tagen hinweg eine Zunahme der motorischen Leistung beobachtet werden (Abb. 3.2).  $P0^{+/-}CCR2^{+/+}$  Mäuse, deren Laufleistung an Tag 1 bei  $71,3 \pm 27,0$  sec liegt, laufen am

vierten Tag  $155,5 \pm 22,8$  sec auf der rotierenden Walze, zeigen an Tag 5 einen kleinen Leistungseinbruch und fallen auf  $145,4 \pm 26,0$  sec Laufzeit zurück. Bis Tag 7 steigt die Laufzeit auf  $184,1 \pm 15,2$  sec an.  $P0^{+/-}CCR2^{-/-}$  Tiere starten an Tag 1 mit einer schlechteren Laufzeit von  $44,9 \pm 13,8$  sec, verzeichnen jedoch im Gegensatz zu den  $P0^{+/-}CCR2^{+/+}$  Mäusen während der Versuchszeit keinen Leistungseinbruch (Abb. 3.2A). An Tag 7 beträgt die Laufzeit der  $P0^{+/-}CCR2^{-/-}$  Tiere auf der rotierenden Walze  $189,5 \pm 58,5$  sec. Bezüglich der motorischen Leistungsfähigkeit auf dem Rotarod lässt sich bei zwölf Monate alten  $P0^{+/-}$  Mäusen kein CCR2-abhängiger Unterschied erkennen.

Wie zuvor bei sechs Monate alten Mäusen beobachtet, zeigt sich bei zwölf Monate alten  $P0^{+/-}CCR2^{+/+}$  und  $P0^{+/-}CCR2^{-/-}$  Mäusen kein signifikanter Unterschied bezüglich der motorischen Leistungsfähigkeit zu  $P0^{+/+}CCR2^{+/+}$  und  $P0^{+/+}CCR2^{-/-}$  Mäusen über den Testverlauf hinweg (Abb. 3.2B). Die Laufzeit der  $P0^{+/+}CCR2^{+/+}$  Tiere beträgt am ersten Versuchstag  $101 \pm 37,8$  sec, die Laufzeit der  $P0^{+/+}CCR2^{-/-}$  Tiere ist mit  $92,4 \pm 27,7$  sec vergleichsweise gut.  $P0^{+/+}CCR2^{+/+}$  Mäuse erreichen an Tag 7 eine Laufzeit von  $232,5 \pm 37,8$  sec,  $P0^{+/+}CCR2^{-/-}$  können sich am siebten Versuchstag  $221,7 \pm 33,0$  sec lang auf der rotierenden Walze halten.

### 3.1.2 Rotarod-Testung mit $P0^{-/-}$ Mäusen



**Abbildung 3.3:** Auswertung des Rotarod-Tests im Alter von sechs Monaten. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung der jeweiligen Laufzeit auf der rotierenden Walze für  $P0^{-/-}CCR2^{+/+}$  ( $n=4$ ) und  $P0^{-/-}CCR2^{-/-}$  ( $n=3$ ) Mäuse im Vergleich zu  $P0^{+/+}CCR2^{+/+}$  ( $n=7$ ) und  $P0^{+/+}CCR2^{-/-}$  ( $n=6$ ) Mäusen. Signifikanz nach ANOVA sowie Bonferroni *post-hoc*-Test zwischen  $P0^{-/-}CCR2^{+/+}$  und  $P0^{+/+}CCR2^{+/+}/P0^{+/+}CCR2^{-/-}$  Mäusen sowie  $P0^{-/-}CCR2^{-/-}$  und  $P0^{+/+}CCR2^{+/+}/P0^{+/+}CCR2^{-/-}$  Mäusen. \*\*\*  $p < 0,001$ .

Zwischen sechs Monate alten  $P0^{-/-}CCR2^{+/+}$  und  $P0^{-/-}CCR2^{-/-}$ -Tieren zeigen sich während der gesamten Versuchszeit keine signifikanten Unterschiede (Abb. 3.3). Die stark in ihrer motorischen Leistung eingeschränkten  $P0^{-/-}$  Tiere weisen bezüglich der Laufzeit auf dem Rotarod jedoch signifikante Unterschiede zu den beiden Wildtyp-Kontrollgruppen auf ( $p < 0,001$ ). Aufgrund des schweren Krankheitsbildes können sich die  $P0^{-/-}CCR2^{+/+}$  Mäuse an Tag 1 nur  $19,2 \pm 19,5$  sec und die  $P0^{-/-}CCR2^{-/-}$  Mäuse  $19,8 \pm 9,3$  sec auf dem Laufgrad halten, bevor sie von der rotierenden Walze herunterfallen. An den fortlaufenden Untersuchungstagen nimmt die Laufzeit in beiden Gruppen stetig zu, bis sie an Tag 7 bei  $P0^{-/-}CCR2^{+/+}$  Tieren  $87,9 \pm 8,9$  sec und bei  $P0^{-/-}CCR2^{-/-}$  Tieren  $83,9 \pm 17,2$  sec ein Maximum erreicht. Die CCR2-Defizienz führt in sechs Monate alten  $P0^{-/-}$  Mäusen zu keiner Veränderung bezüglich der motorischen Leistungsfähigkeit auf dem Rotarod. Aufgrund des Schweregrads der Erkrankung wurde auf die Rotarod-Testung im Alter von 12 Monaten bei  $P0^{-/-}$  Mäusen verzichtet.

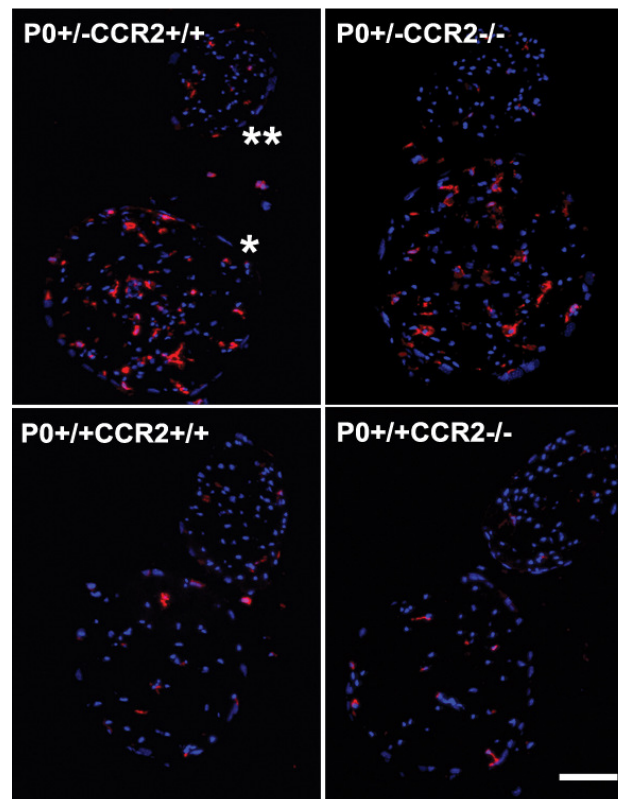
### 3.2 Quantifizierung von Immunzellen

Sowohl in den demyelinisierten Nerven von  $P0^{+/+}$  Mäusen als auch in den dysmyelinisierten Nerven von  $P0^{-/-}$  Mäusen zeigt sich eine erhöhte Anzahl von Immunzellen, v.a. von Makrophagen, die durch die Chemokin- und Cytokinexpression myelinbildender Schwann Zellen aktiviert werden können und einen erheblichen Einfluss auf den Krankheitsverlauf haben. Welche Rolle der Chemokinrezeptor CCR2 bei der Rekrutierung und Aktivierung immunrelevanter Zellen wie Makrophagen, T-Zellen und neutrophilen Granulozyten spielt, sollte mithilfe immunhistochemischer Färbungen untersucht werden. Hierzu wurden Immunzellen im N. femoralis von  $P0^{+/+}$  Mäusen im Alter von sechs und zwölf Monaten und im N. plantaris von  $P0^{-/-}$  Mäusen im Alter von sechs Monaten quantifiziert und Unterschiede bezüglich der CCR2-Defizienz analysiert. CCR2-kompetente und CCR2-defiziente  $P0$ -Wildtypmäuse dienten als Kontrollgruppe.



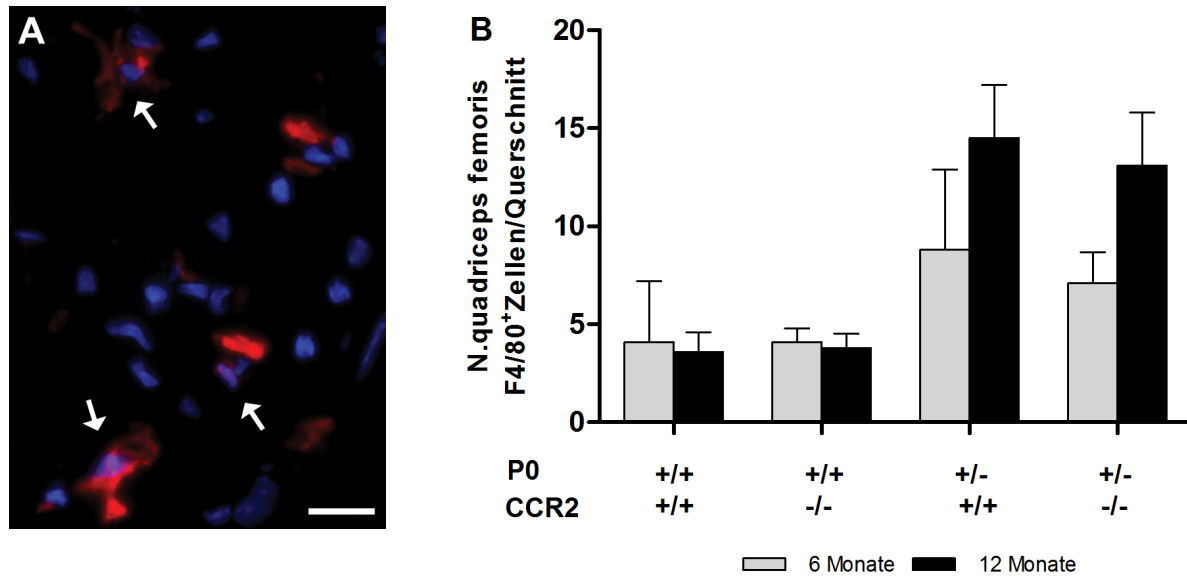
### 3.2.1 Quantifizierung endoneuraler Makrophagen

#### 3.2.1.1 Quantifizierung endoneuraler Makrophagen im N. femoralis



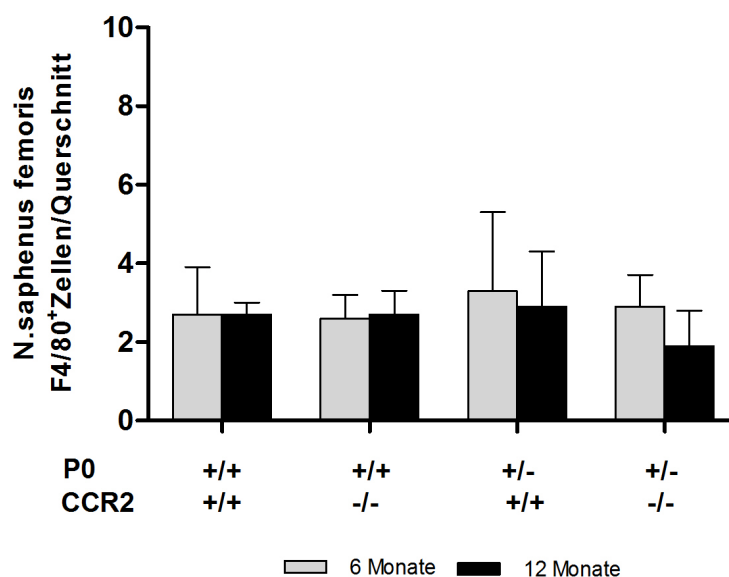
**Abbildung 3.4:** Immunhistochemische Färbung F4/80(+) Makrophagen (rot) auf 10  $\mu$ m dicken Gefrierschnitten des N. femoralis. Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gefärbt. Im N. quadriceps femoris (\*) P0-defizienter Tiere sind mehr Makrophagen zu beobachten als in den Wildtypkontrollen. Im N. saphenus femoris (\*\*) zeigt sich in allen untersuchten Gruppen nur eine geringe Anzahl an F4/80(+) Makrophagen. Messbalken= 20  $\mu$ m

Im Alter von sechs Monaten konnten bei P0<sup>+/-</sup> Tieren in Abhängigkeit von CCR2 keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl endoneuraler Makrophagen im N. quadriceps femoris (motorischer Ast) beobachtet werden (Abb. 3.5B). In Nervenquerschnitten von P0<sup>+/-</sup>CCR2<sup>+/+</sup> Mäusen wurden  $8,8 \pm 4,1$  F4/80(+) Zellen/Querschnitt gezählt, in P0<sup>+/-</sup>CCR2<sup>-/-</sup> Mäusen lag die Zellzahl/Querschnitt bei durchschnittlich  $7,1 \pm 1,6$ . Im N. quadriceps femoris von P0<sup>+/+</sup>CCR2<sup>+/+</sup> Kontrollmäusen wurden  $4,1 \pm 3,1$  Zellen/Querschnitt und in P0<sup>+/+</sup>CCR2<sup>-/-</sup> Mäusen  $4,1 \pm 0,7$  Zellen/Querschnitt detektiert.



**Abbildung 3.5:** **A:** Immunhistochemische Färbung: Ausschnitt aus dem N. quadriceps femoris mit deutlich erkennbaren F4/80(+) Makrophagen (rot). Zellkerne sind mit DAPI (blau) gefärbt. Messbalken= 10 µm. **B:** Quantifizierung endoneuraler Makrophagen im N. quadriceps femoris von P0/CCR2 Mäusen im Alter von sechs und zwölf Monaten. Wildtypkontrolltiere zeigen zu beiden Zeitpunkten eine geringe Anzahl an F4/80(+) Makrophagen während bei P0-defizienten Mäusen eine altersabhängige Zunahme der Makrophagen zu beobachten ist. Zwischen P0<sup>-/-</sup>CCR2<sup>+/+</sup> und P0<sup>-/-</sup>CCR2<sup>-/-</sup> Mäusen zeigt sich zu beiden Zeitpunkten kein signifikanter Unterschied bezüglich der Anzahl endoneuraler Makrophagen. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichung. 6 Monate: P0<sup>+/+</sup>CCR2<sup>+/+</sup> (n=4), P0<sup>+/+</sup>CCR2<sup>-/-</sup> (n=4), P0<sup>+/-</sup>CCR2<sup>+/+</sup> (n=5), P0<sup>+/-</sup>CCR2<sup>-/-</sup> (n=5); 12 Monate: P0<sup>+/+</sup>CCR2<sup>+/+</sup> (n=4), P0<sup>+/+</sup>CCR2<sup>-/-</sup> (n=3), P0<sup>+/-</sup>CCR2<sup>+/+</sup> (n=6), P0<sup>+/-</sup>CCR2<sup>-/-</sup> (n=7).

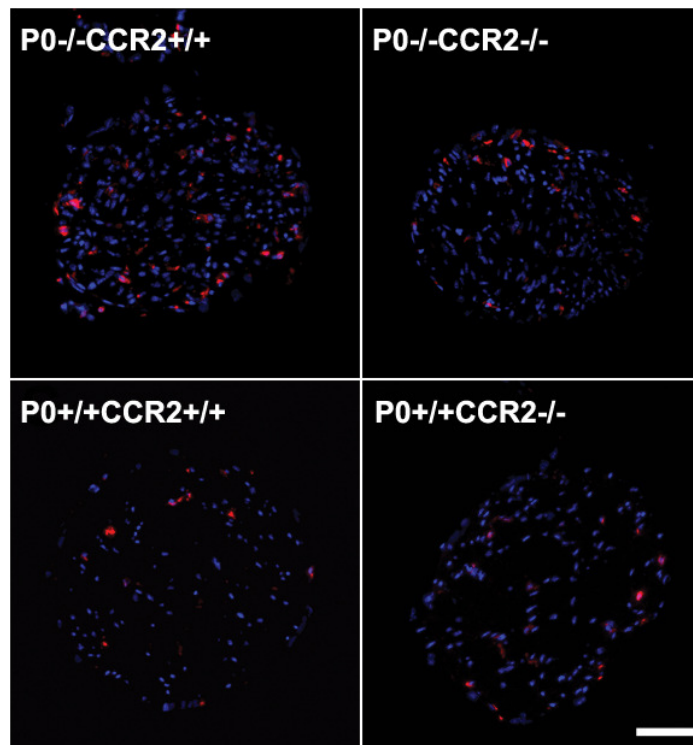
Im Alter von zwölf Monaten zeigte sich bei P0<sup>-/-</sup> Tieren eine altersabhängige Zunahme an F4/80(+) Makrophagen, jedoch wurde auch zu dem späteren Zeitpunkt kein CCR2-abhängiger Unterschied bezüglich der Makrophagen-Anzahl beobachtet (Abb. 3.5B). P0<sup>+/-</sup>CCR2<sup>+/+</sup> Mäuse wiesen eine Zellzahl von  $14,5 \pm 2,7$  pro Querschnitt auf, im N. quadriceps femoris von P0<sup>+/-</sup>CCR2<sup>-/-</sup> Mäusen konnten  $13,1 \pm 2,7$  Zellen/Querschnitt detektiert werden. In den korrespondierenden Wildtyp-Kontrollgruppen zeigte sich keine altersabhängige Zunahme an F4/80(+) Makrophagen und es wurde wie im Alter von sechs Monaten eine geringe Anzahl an endoneuralen Makrophagen im N. quadriceps femoris beobachtet (P0<sup>+/+</sup>CCR2<sup>+/+</sup>  $3,6 \pm 1,0$  Zellen/Querschnitt, P0<sup>+/+</sup>CCR2<sup>-/-</sup>  $3,8 \pm 0,7$  Zellen/Querschnitt). Bezüglich der Zellmorphologie endoneuraler Makrophagen wurden keine CCR2-abhängigen Unterschiede in P0<sup>-/-</sup> und P0<sup>+/+</sup> Mäusen beobachtet.



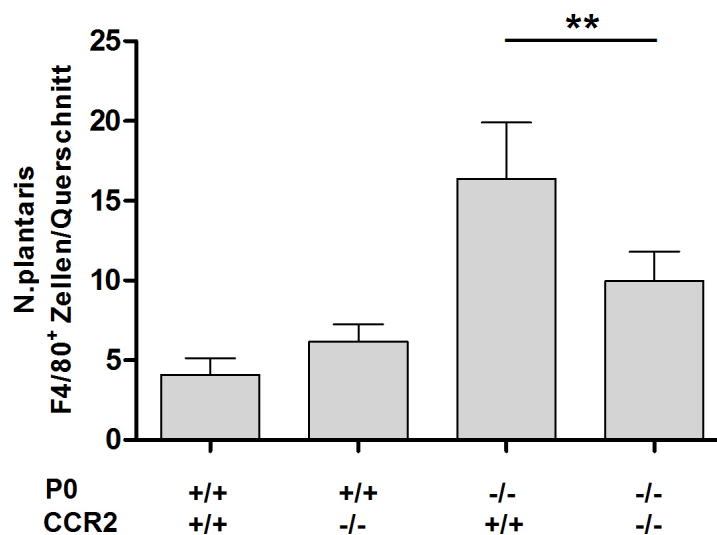
**Abbildung 3.6:** Quantifizierung endoneuraler Makrophagen im N. saphenus femoris von P0/CCR2 Mäusen im Alter von sechs und zwölf Monaten. Alle Gruppen zeigen zu beiden Zeitpunkten wenig F4/80(+) Makrophagen. Bezüglich der CCR2-Defizienz konnten keine Unterschiede festgestellt werden. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichung. 6 Monate: P0<sup>+/-</sup>CCR2<sup>+/+</sup> (n=4), P0<sup>+/-</sup>CCR2<sup>-/-</sup> (n=4), P0<sup>+/-</sup>CCR2<sup>+/+</sup> (n=5), P0<sup>+/-</sup>CCR2<sup>-/-</sup> (n=5); 12 Monate: P0<sup>+/-</sup>CCR2<sup>+/+</sup> (n=4), P0<sup>+/-</sup>CCR2<sup>-/-</sup> (n=3), P0<sup>+/-</sup>CCR2<sup>+/+</sup> (n=6), P0<sup>+/-</sup>CCR2<sup>-/-</sup> (n=7).

F4/80(+) Makrophagen konnten zu beiden analysierten Zeitpunkten in geringem Maße im N. saphenus femoris (sensibler Ast) detektiert werden (Abb. 3.6). Es zeigte sich weder eine altersabhängige Zunahme noch konnten signifikante Unterschiede in der Anzahl F4/80(+) Makrophagen bezüglich der CCR2-Defizienz in den zu untersuchenden Gruppen festgestellt werden. Im Alter von sechs Monaten konnten im N. saphenus femoris folgende Zellzahlen detektiert werden: P0<sup>+/-</sup>CCR2<sup>+/+</sup> 3,3 ± 2,0 Zellen/Querschnitt, P0<sup>+/-</sup>CCR2<sup>-/-</sup> 2,9 ± 0,8 Zellen/Querschnitt, P0<sup>+/-</sup>CCR2<sup>+/+</sup> 2,7 ± 1,2 Zellen/Querschnitt, P0<sup>+/-</sup>CCR2<sup>-/-</sup> 2,6 ± 0,6 Zellen/Querschnitt. Im Alter von 12 Monaten errechneten sich folgende Zellzahlen: P0<sup>+/-</sup>CCR2<sup>+/+</sup> 2,9 ± 1,4 Zellen/Querschnitt, P0<sup>+/-</sup>CCR2<sup>-/-</sup> 1,9 ± 0,9 Zellen/Querschnitt, P0<sup>+/-</sup>CCR2<sup>+/+</sup> 2,7 ± 0,3 Zellen/Querschnitt, P0<sup>+/-</sup>CCR2<sup>-/-</sup> 2,7 ± 0,6 Zellen/Querschnitt.

### 3.2.1.2 Quantifizierung endoneuraler Makrophagen im N. plantaris



**Abbildung 3.7:** Repräsentative Querschnitte des N. plantaris von P0/CCR2 Mäusen im Alter von sechs Monaten nach immunhistochemischer Färbung mit dem Makrophagen-spezifischen Marker F4/80 (rot). Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gefärbt. Im N. plantaris CCR2-defizienter P0<sup>-/-</sup> Tiere ist eine geringere Anzahl endoneuraler Makrophagen detektierbar als in CCR2-kompetenten P0<sup>-/-</sup> Tieren. In Nervenquerschnitten von Wildtyp-Kontrollmäusen ist nur eine geringe Anzahl an endoneuralen Makrophagen detektierbar. Messbalken= 20 µm

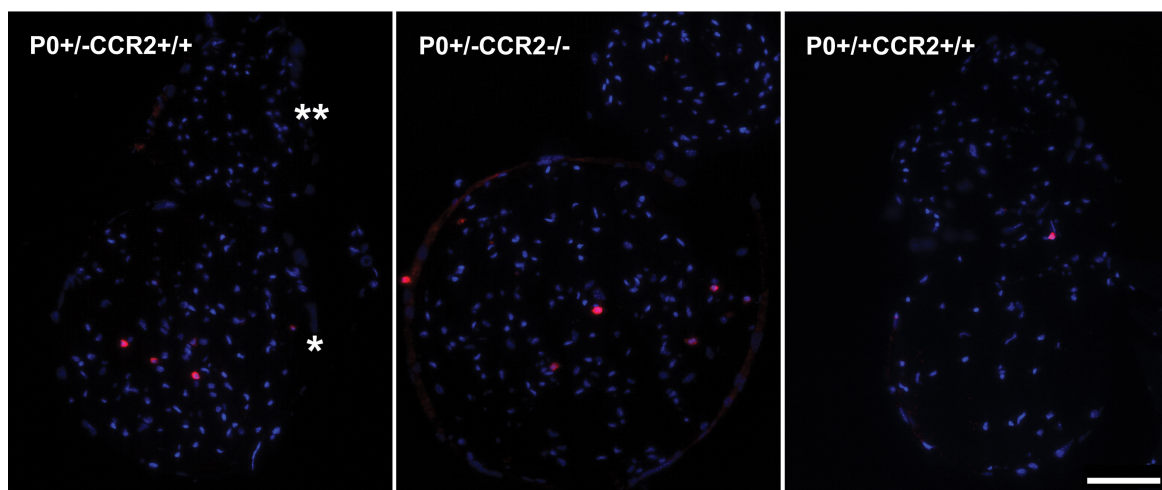


**Abbildung 3.8:** Quantifizierung endoneuraler Makrophagen im N. plantaris von P0/CCR2 Mäusen im Alter von sechs Monaten. In P0<sup>-/+</sup>CCR2<sup>-/-</sup> Mäusen ist die Anzahl F4/80(+) Makrophagen signifikant reduziert im Vergleich zu P0<sup>-/+</sup>CCR2<sup>+/+</sup> Mäusen. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichung. Signifikanz nach ANOVA sowie Bonferroni *post-hoc*-Test \*\* p < 0,01. P0<sup>+/+</sup>CCR2<sup>+/+</sup> (n=4), P0<sup>+/+</sup>CCR2<sup>-/-</sup> (n=4), P0<sup>-/+</sup>CCR2<sup>+/+</sup> (n=5), P0<sup>-/+</sup>CCR2<sup>-/-</sup> (n=5).

Der Effekt von CCR2 auf die Makrophagen-Rekrutierung und -Aktivierung wurde weiterhin im N. plantaris sechs Monate alter  $P0^{-/-}$  Mäuse untersucht. Die CCR2-Defizienz führte bei  $P0^{-/-}$  Mäusen zu einer signifikanten Reduktion endoneuraler Makrophagen (Abb. 3.8). Bei  $P0^{-/-}CCR2^{+/+}$  Tieren betrug die Anzahl F4/80(+) Zellen  $16,4 \pm 3,4$  pro Schnitt wohingegen die Makrophagenanzahl bei  $P0^{-/-}CCR2^{-/-}$  auf  $10,0 \pm 1,8$  Zellen/Querschnitt signifikant reduziert war (\*\* $p < 0,01$ ). In beiden Wildtyp-Kontrollgruppen war eine geringe Anzahl F4/80(+) Makrophagen detektierbar ( $P0^{+/+}CCR2^{+/+}$ :  $4,1 \pm 1,0$ ;  $P0^{+/+}CCR2^{-/-}$ :  $6,2 \pm 1,1$ ). Die CCR2-Defizienz führte bezüglich der Zellmorphologie zu keinem Unterschied innerhalb der untersuchten Gruppen.

### 3.2.2 Quantifizierung endoneuraler T-Zellen

#### 3.2.2.1 Quantifizierung endoneuraler T-Zellen im N. femoralis

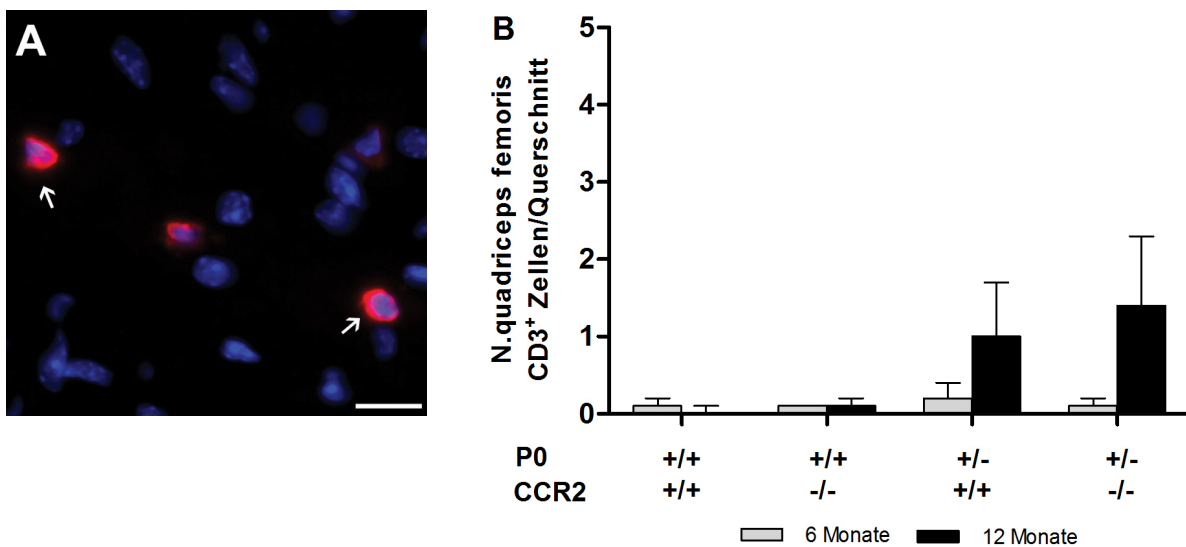


**Abbildung 3.9:** Immunhistochemische Färbung CD3(+) T-Zellen. Die Abbildung zeigt repräsentative Nervenquerschnitte des N. femoralis von  $P0/CCR2$  Mäusen im Alter von zwölf Monaten. Eine geringe Anzahl von T-Zellen ist im N. quadriceps femoris (\*) von  $P0$ -defizienten Mäusen detektierbar, wohingegen die entsprechenden Wildtyp-Kontrolltiere fast keine T-Zellen aufweisen. Im N. saphenus femoris (\*\*) sind in allen untersuchten Gruppen keine CD3(+) T-Zellen detektierbar. Bezüglich der Anzahl an T-Zellen zeigen sich keine CCR2-abhängigen Unterschiede. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gefärbt. Messbalken= 20  $\mu$ m

Im Alter von sechs Monaten konnten in allen untersuchten Gruppen nur wenige CD3(+) T-Zellen detektiert werden (Abb. 3.9). In  $P0^{+/+}CCR2^{+/+}$  Mäusen lag die Anzahl endoneuraler T-Zellen bei  $0,2 \pm 0,2$  Zellen/Querschnitt, in  $P0^{+/+}CCR2^{-/-}$  Mäusen wurden durchschnittlich  $0,1 \pm 0,1$  Zellen/Querschnitt im N. quadriceps femoris gezählt. Es zeigten sich keine CCR2-abhängigen

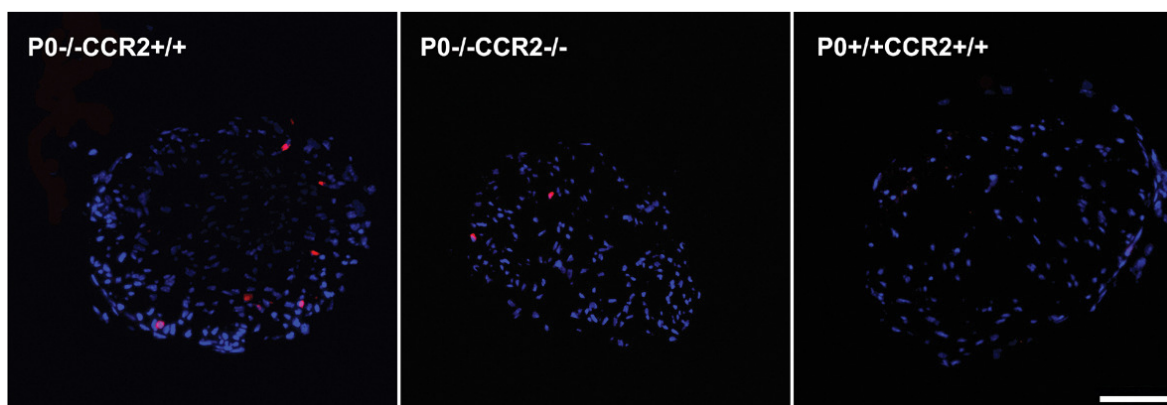
Unterschiede in  $P0^{+/-}$  Mäusen. In den beiden Wildtyp-Kontrollgruppen lag die Anzahl endoneuraler T-Zellen jeweils bei  $0,1 \pm 0,0$  Zellen/Querschnitt (Abb. 3.10B).

Im Alter von zwölf Monaten zeigte sich im N. quadriceps femoris bei  $P0^{+/-}$  Tieren eine altersabhängige Zunahme an  $CD3(+)$  T-Zellen, während in den Wildtyp-Kontrollen keine Veränderung bezüglich der Anzahl an T-Zellen zu beobachten war.  $CCR2$  hat auch zu einem späteren Zeitpunkt keinen Einfluss auf die Anzahl endoneuraler T-Zellen. In  $P0^{+/-}CCR2^{+/+}$  konnten im Alter von 12 Monaten  $1,0 \pm 0,7$  Zellen/Querschnitt im N. quadriceps femoris gezählt werden, in  $P0^{+/-}CCR2^{-/-}$  Mäusen lag die Anzahl an T-Zellen bei  $1,4 \pm 0,9$  Zellen/Querschnitt. Bei  $P0^{+/+}CCR2^{+/+}$  Tieren wurden im Alter von zwölf Monaten keine T-Zellen detektiert, im N. quadriceps femoris bei  $P0^{+/+}CCR2^{-/-}$  Tieren lag die Zellzahl bei  $0,1 \pm 0,1$  Zellen/Querschnitt. Im N. saphenus femoris konnten in allen vier untersuchten Gruppen zu keinem Zeitpunkt endoneurale  $CD3(+)$  T-Zellen detektiert werden.

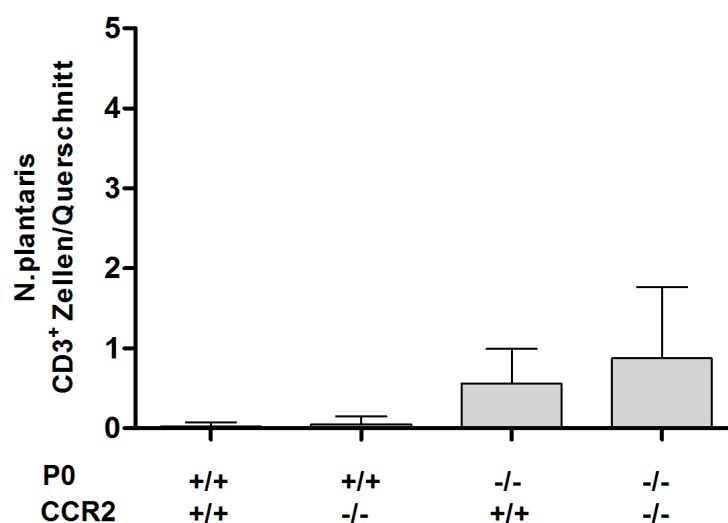


**Abbildung 3.10:** A: Immunhistochemische Färbung: Ausschnitt aus dem N. quadriceps femoris mit deutlich erkennbaren  $CD3(+)$  T-Zellen (rot). Zellkerne sind mit DAPI (blau) gefärbt. Messbalken= 10  $\mu$ m. B: Quantifizierung endoneuraler T-Zellen im N. quadriceps femoris von  $P0/CCR2$  Mäusen. In den Wildtypkontrollen sind zu beiden Zeitpunkten fast keine T-Zellen detektierbar. In  $P0^{+/-}$  Mäusen zeigt sich eine altersbedingte Zunahme an  $CD3(+)$  T-Zellen, jedoch sind im Alter von sechs und zwölf Monaten keine  $CCR2$ -abhängigen Unterschiede feststellbar. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichung. 6 Monate:  $P0^{+/+}CCR2^{+/+}$  (n=3),  $P0^{+/+}CCR2^{-/-}$  (n=3),  $P0^{+/-}CCR2^{+/+}$  (n=4),  $P0^{+/-}CCR2^{-/-}$  (n=4); 12 Monate:  $P0^{+/+}CCR2^{+/+}$  (n=4),  $P0^{+/+}CCR2^{-/-}$  (n=3),  $P0^{+/-}CCR2^{+/+}$  (n=6),  $P0^{+/-}CCR2^{-/-}$  (n=7).

### 3.2.2.2 Quantifizierung endoneuraler T-Zellen im N. plantaris



**Abbildung 3.11:** Immunhistochemische Färbung CD3(+) T-Zellen (rot) auf Nervenquerschnitten des N. plantaris von P0/CCR2 Mäusen im Alter von sechs Monaten. Im N. plantaris P0-defizienter Mäuse ist eine geringe Anzahl an T-Zellen detektierbar, während in den entsprechenden Wildtypkontrollen fast keine T-Zellen zu beobachten sind. Bezüglich der Anzahl an T-Zellen zeigen sich keine CCR2-abhängigen Unterschiede. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gefärbt. Messbalken = 20  $\mu$ m



**Abbildung 3.12:** Quantifizierung endoneuraler T-Zellen im N. plantaris von P0/CCR2 Mäusen im Alter von sechs Monaten. Zwischen P0<sup>-/-</sup>CCR2<sup>+/+</sup> und P0<sup>-/-</sup>CCR2<sup>-/-</sup> Mäusen konnten keine Unterschiede bezüglich der Anzahl an CD3(+) T-Zellen beobachtet werden. Im N. plantaris der Wildtypkontrollen sind fast keine T-Zellen detektierbar. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichung. P0<sup>+/+</sup>CCR2<sup>+/+</sup> (n=4), P0<sup>+/+</sup>CCR2<sup>-/-</sup> (n=4), P0<sup>-/-</sup>CCR2<sup>+/+</sup> (n=5), P0<sup>-/-</sup>CCR2<sup>-/-</sup> (n=4).

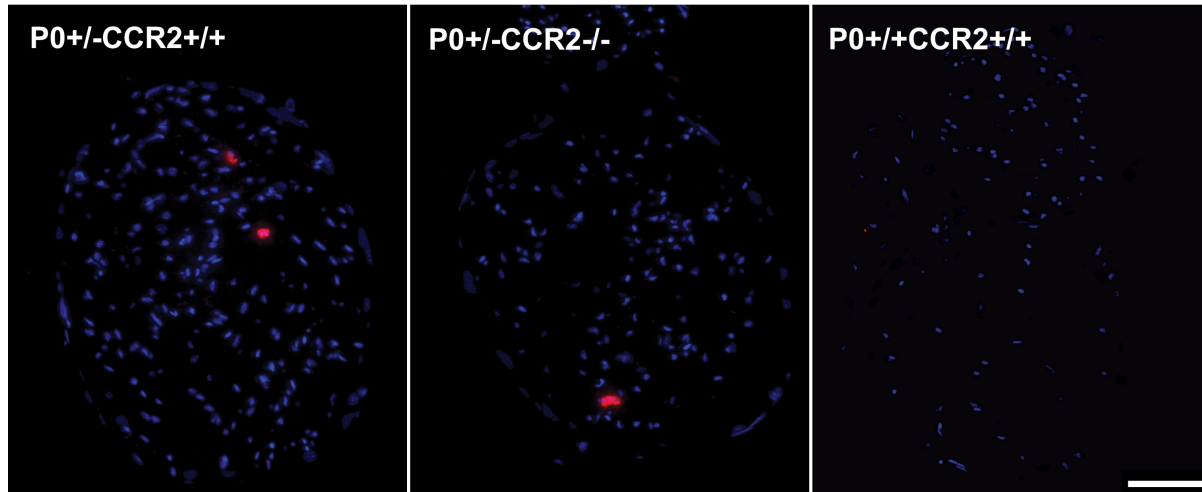
Bei der Quantifizierung endoneuraler T-Zellen im N. plantaris zeigen sich im Alter von sechs Monaten keine CCR2-abhängigen Unterschiede in homozygot-defizienten P0-Mäusen (Abb. 3.12). Während die Zellzahl in P0<sup>-/-</sup>CCR2<sup>+/+</sup> Mäusen bei  $0,6 \pm 0,4$  Zellen/Querschnitt und in P0<sup>-/-</sup>CCR2<sup>-/-</sup> Mäusen bei  $0,9 \pm 0,9$  Zellen/Querschnitt lag, konnte in den Wildtypkontrollen eine sehr geringe



Anzahl an CD3(+) T-Zellen detektiert werden ( $P0^{+/+}CCR2^{+/+}$   $0,03 \pm 0,1$  Zellen/Querschnitt;  $P0^{+/+}CCR2^{-/-}$   $0,05 \pm 0,1$  Zellen/Querschnitt).

### 3.2.3 Quantifizierung neutrophiler Granulozyten

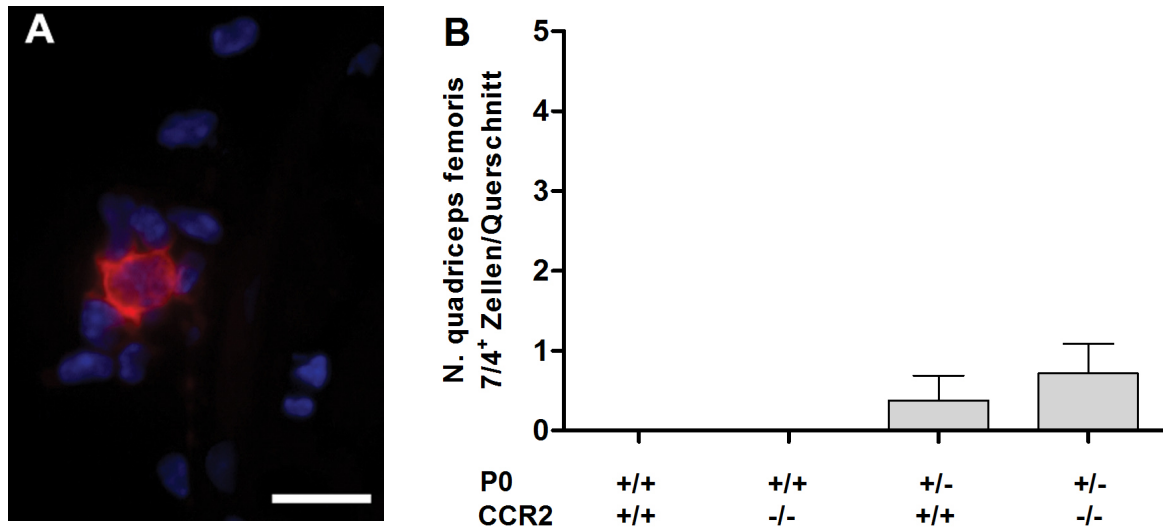
#### 3.2.3.1 Quantifizierung neutrophiler Granulozyten im N. femoralis



**Abbildung 3.13:** Immunhistochemische Färbung 7/4(+) neutrophiler Granulozyten (rot) auf Nervenquerschnitten des N. quadriceps femoris von P0/CCR2 Mäusen im Alter von zwölf Monaten. Im N. quadriceps femoris P0-defizienter Mäuse ist eine geringe Anzahl neutrophiler Granulozyten detektierbar, während in den entsprechenden Wildtypkontrollen keine 7/4(+) Zellen zu beobachten sind. Es zeigen sich keine CCR2-abhängigen Unterschiede bezüglich der Anzahl neutrophiler Granulozyten im N. quadriceps femoris P0-defizienter Mäuse. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gefärbt. Messbalken= 20  $\mu$ m

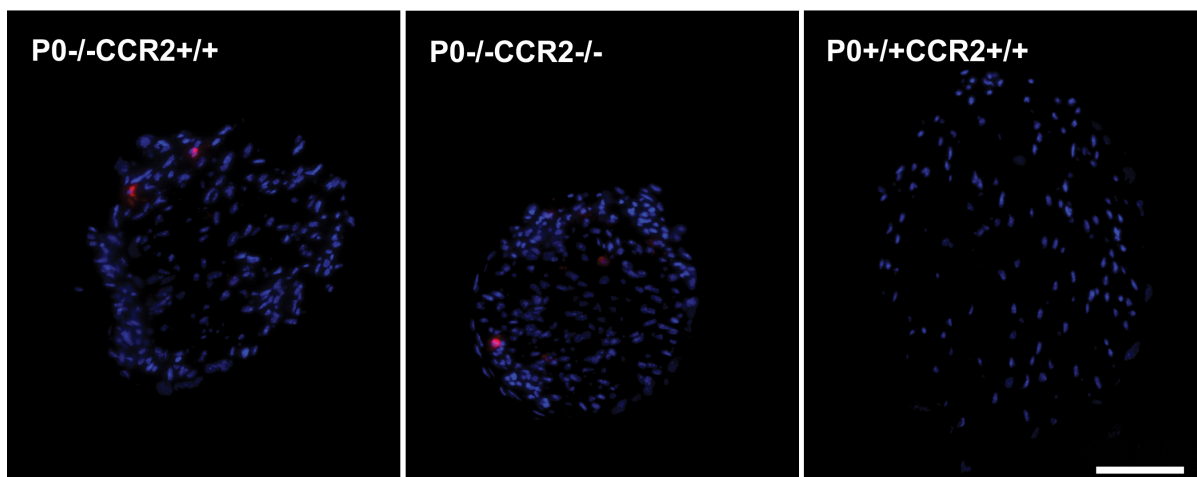
Die Detektion neutrophiler Granulozyten war ausschließlich im N. quadriceps femoris von  $P0^{+/-}$  Mäusen im Alter von zwölf Monaten möglich (Abb. 3.13). Zum Zeitpunkt von sechs Monaten konnten im N. femoralis aller untersuchten Gruppen keine 7/4(+) Zellen detektiert werden. Die Anzahl neutrophiler Granulozyten im N. quadriceps femoris lag bei  $P0^{+/-}CCR2^{+/+}$  Tieren bei  $0,4 \pm 0,3$  Zellen/Querschnitt, bei CCR2-defizienten  $P0^{+/-}$  Mäusen konnten  $0,7 \pm 0,4$  Zellen/Querschnitt gezählt werden (Abb. 3.14B). Es zeigten sich keine CCR2-abhängigen Unterschiede bezüglich der Anzahl endoneuraler neutrophiler Granulozyten im N. femoralis.



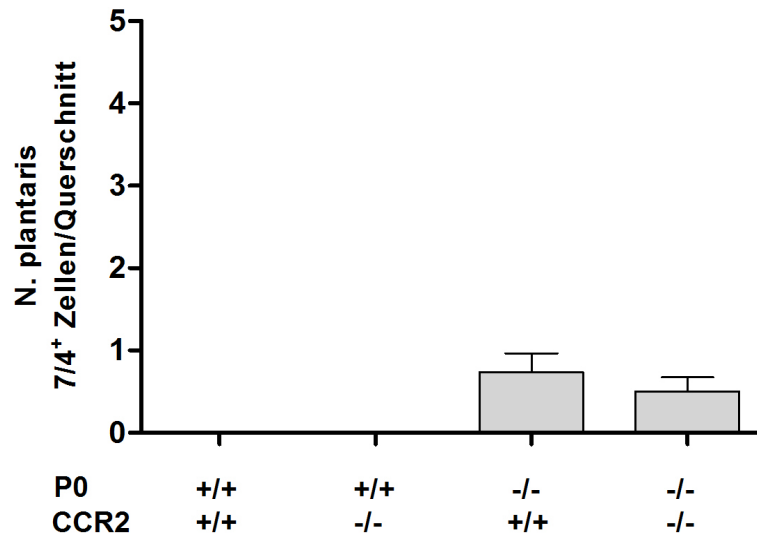


**Abbildung 3.14.** A: Immunhistochemische Färbung: Ausschnitt aus dem N. quadriceps femoris mit deutlich erkennbarem 7/4(+) neutrophilen Granulozyten (rot). Zellkern ist mit DAPI (blau) gefärbt. Messbalken= 10 µm. B: Quantifizierung neutrophiler Granulozyten im N. quadriceps femoris von P0/CCR2 Mäusen im Alter von zwölf Monaten. In den Wildtypkontrollen sind keine 7/4(+) Zellen detektierbar. In P0<sup>+/-</sup> Mäusen zeigen sich keine CCR2-abhängigen Unterschiede bezüglich der Anzahl neutrophiler Granulozyten. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichung. P0<sup>+/+</sup>CCR2<sup>+/+</sup> (n=4), P0<sup>+/+</sup>CCR2<sup>-/-</sup> (n=3), P0<sup>+/-</sup>CCR2<sup>+/+</sup> (n=5), P0<sup>+/-</sup>CCR2<sup>-/-</sup> (n=5).

### 3.2.3.2 Quantifizierung neutrophiler Granulozyten im N. plantaris



**Abbildung 3.15:** Immunhistochemische Färbung 7/4(+) neutrophiler Granulozyten (rot) auf Nervenquerschnitten des N. plantaris von P0/CCR2 Mäusen im Alter von sechs Monaten. Im N. plantaris P0-defizienter Mäuse ist eine geringe Anzahl neutrophiler Granulozyten detektierbar. In den Wildtypkontrollen konnten keine 7/4(+) Zellen detektiert werden. Im N. plantaris von P0<sup>-/-</sup>-Mäusen zeigen sich keine CCR2-abhängigen Unterschiede bezüglich der Anzahl neutrophiler Granulozyten. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gefärbt. Messbalken= 20 µm.



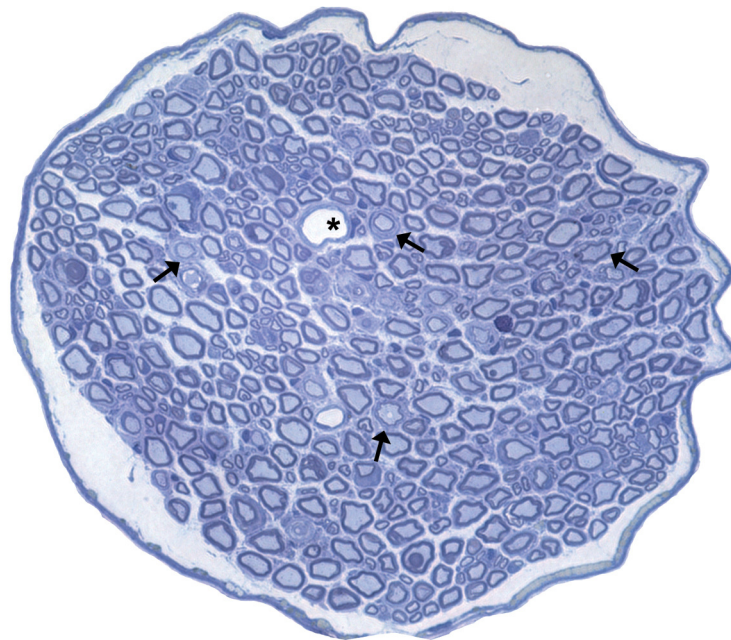
**Abbildung 3.16:** Quantifizierung neutrophiler Granulozyten im *N. plantaris* von P0/CCR2 Mäusen im Alter von sechs Monaten. In P0<sup>-/-</sup> Mäusen zeigen sich keine CCR2-abhängigen Unterschiede bezüglich der Anzahl an 7/4(+) Zellen. Im *N. plantaris* der Wildtypkontrollen sind keine neutrophilen Granulozyten detektierbar. P0<sup>+/+</sup>CCR2<sup>+/+</sup> (n=3), P0<sup>+/+</sup>CCR2<sup>-/-</sup> (n=2), P0<sup>-/-</sup>CCR2<sup>+/+</sup> (n=3), P0<sup>-/-</sup>CCR2<sup>-/-</sup> (n=3).

Neutrophile Granulozyten konnten im *N. plantaris* ausschließlich in P0<sup>-/-</sup> Mäusen quantifiziert werden, in den entsprechenden Wildtypkontrollen konnten keine 7/4(+) Zellen detektiert werden (Abb. 3.15). Im Alter von sechs Monaten konnten im *N. plantaris* von P0<sup>-/-</sup>CCR2<sup>+/+</sup> Mäusen  $0,8 \pm 0,3$  Zellen/Querschnitt gezählt werden. Die CCR2-Defizienz führte in P0<sup>-/-</sup> Mäusen zu vergleichbaren Zellzahlen, hier konnten durchschnittlich  $0,5 \pm 0,2$  Zellen/Querschnitt detektiert werden (Abb. 3.16).

### 3.3 Elektronenmikroskopische Analysen peripherer Nerven

Um die degenerativen Veränderungen in peripheren Nerven P0-defizienter Mäuse ultrastrukturell begutachten zu können, wurden Nervenquerschnitte des N. quadriceps femoris von P0<sup>+/-</sup> Tieren im Alter von zwölf Monaten sowie Nervenquerschnitte des N. plantaris von P0<sup>-/-</sup> Tieren im Alter von sechs Monaten elektronenmikroskopisch analysiert. Es sollte geklärt werden, welchen Einfluss der Chemokinrezeptor CCR2 auf die endoneurale Morphologie hat.

Vor der Anfertigung von Ultradünnschnitten für die Elektronenmikroskopie wurde von jedem Nerv ein Semidünnschnitt angefertigt und mit Methylblau gefärbt (siehe Abb. 3.17). Wurde eine gute Position innerhalb des Nerven gefunden erfolgte die Anfertigung von Ultradünnschnitten wie unter Kapitel 2.9.4.3 und 2.9.4.4 beschrieben. Die mit Bleicitrat kontrastierten Ultradünnschnitte wurden wie unter Kapitel 2.9.4.7 beschrieben ins Elektronenmikroskop eingeschleust und untersucht. Von jedem Nervenquerschnitt wurde eine Übersichtsaufnahme fotografiert und die entsprechenden charakteristischen Merkmale bei P0<sup>+/-</sup> und P0<sup>-/-</sup> Mäusen begutachtet und analysiert.

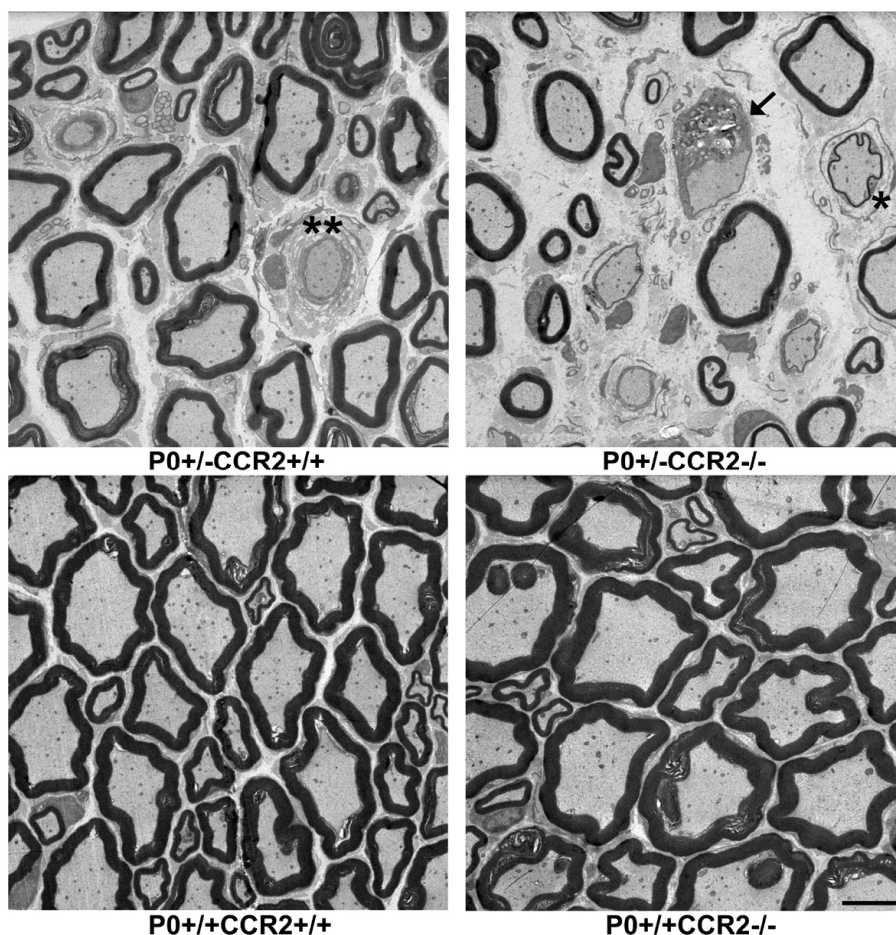


**Abbildung 3.17:** Methylenblau-gefärbter Semidünnschnitt (quer) des N. quadriceps femoris einer P0<sup>+/-</sup>CCR2<sup>-/-</sup> Maus im Alter von 12 Monaten. Auf Semidünnebene lassen sich bereits dünn-myelinisierte Axone (Pfeile) erkennen. \*= Blutgefäß

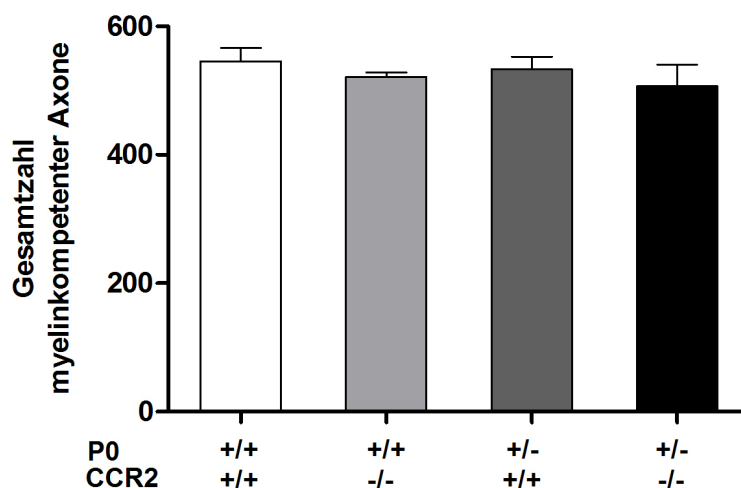
### 3.3.1 Morphologische Analysen des N. quadriceps femoris

Die Pathologie des N. quadriceps femoris von  $P0^{+/-}$  Mäusen zeichnet sich sowohl durch dünne als auch durch komplett demyelinisierte Axone aus. Weiterhin können phagozytierende Makrophagen beobachtet werden, die mit Myelindebris beladen sind.

Da der N. saphenus femoris ausschließlich sensible Nervenfasern enthält und nicht von der demyelinisierenden Pathologie betroffen ist, wurde in diesem Nervenast auf eine morphologische Analyse mittels Elektronenmikroskopie verzichtet. Im N. quadriceps femoris wurde die Gesamtzahl an Myelin-kompetenten Axonen, die Anzahl dünn-myelinisierter und demyelinisierter Axone sowie die Anzahl an Axonen mit Zwiebelschalenbildung, den sog. „onion bulbs“ quantifiziert. Weiterhin wurde die Anzahl an phagozytierenden Makrophagen detektiert.



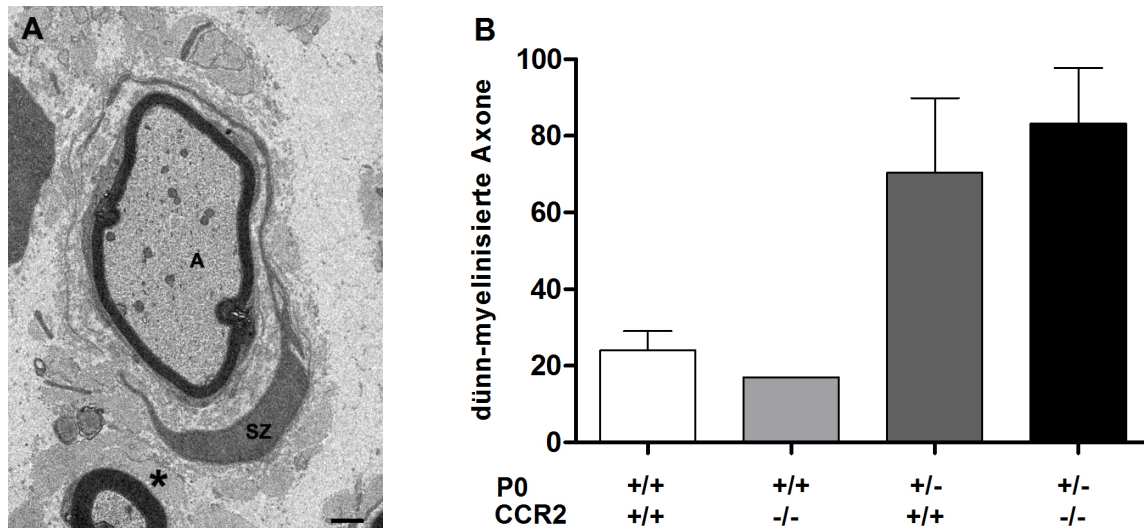
**Abbildung 3.18:** Elektronenmikroskopische Aufnahmen des N. quadriceps femoris (Ausschnitt) von  $P0/CCR2$  Mäusen im Alter von zwölf Monaten.  $P0^{+/-}$  Mäuse zeichnen sich durch dünne (\*Ausschnitt oben rechts) und demyelinisierte Axone u.a. mit Zwiebelschalenbildung (\*\*Ausschnitt oben links) aus, weiterhin können phagozytierende Makrophagen (Pfeil, Abschnitt oben rechts), die mit Myelindebris beladen sind beobachtet werden. Axone von Wildtypmäusen zeigen eine normale Myelinbildung (Ausschnitte unten). Messbalken= 10  $\mu\text{m}$ .



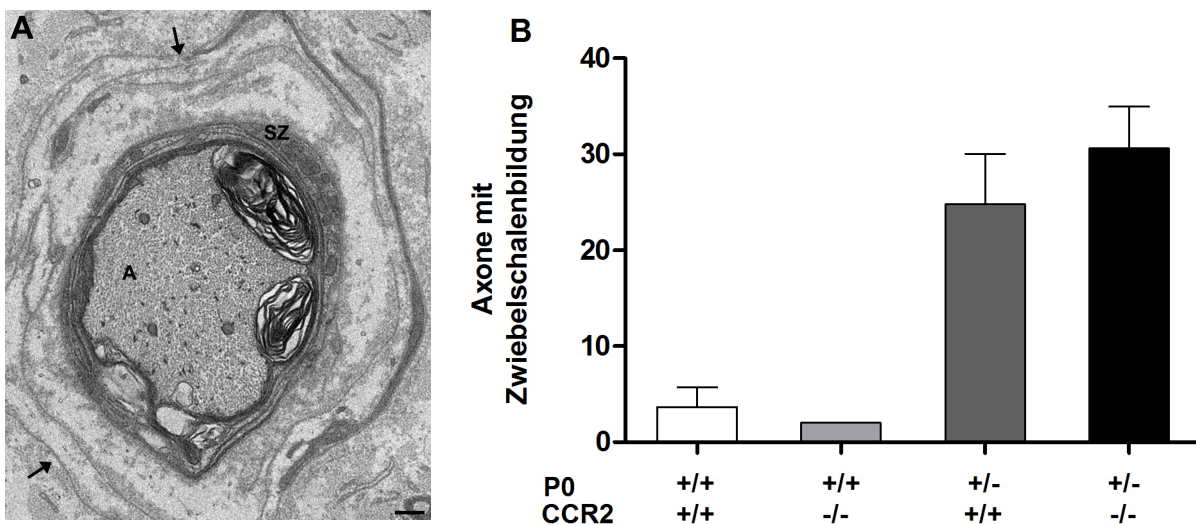
**Abbildung 3.19:** Quantifizierung myelinkompetenter Axone im N. quadriceps femoris von P0/CCR2 Mäusen im Alter von zwölf Monaten. In allen vier untersuchten Gruppen gibt es keine Unterschiede in der Gesamtzahl myelinkompetenter Axone. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichung. P0<sup>+/+</sup>CCR2<sup>+/+</sup> (n=3), P0<sup>+/+</sup>CCR2<sup>-/-</sup> (n=2), P0<sup>+/-</sup>CCR2<sup>+/+</sup> (n=5), P0<sup>+/-</sup>CCR2<sup>-/-</sup> (n=5).

Bei der Quantifizierung myelinkompetenter Axone konnten keine Unterschiede in der Gesamtzahl in allen vier untersuchten Gruppen beobachtet werden (Abb. 3.19). Bei den P0<sup>+/+</sup>CCR2<sup>+/+</sup> Wildtypkontrollen konnten 54,7 ± 21,0 Axone/Querschnitt gezählt werden, bei den P0<sup>+/+</sup>CCR2<sup>-/-</sup> Kontrollen lag die Anzahl myelinkompetenter Axone bei 521,0 ± 7,1 pro Schnitt. P0<sup>+/-</sup>CCR2<sup>+/+</sup> Mäuse zeigten eine Gesamtanzahl von 533,2 ± 19,6 Axonen/Querschnitt, bei P0<sup>+/-</sup>CCR2<sup>-/-</sup> Mäusen konnten im Alter von 12 Monaten 506,6 ± 33,5 myelinkompetente Axone pro Querschnitt gezählt werden.

Im N. quadriceps femoris von P0<sup>+/-</sup> Mäusen zeigen sich im Alter von zwölf Monaten zwar deutlich mehr dünn-myelinisierte Axone als in den Wildtypkontrollen (Abb. 3.20B), doch konnten zwischen P0<sup>+/-</sup>CCR2<sup>+/+</sup> Mäusen und P0<sup>+/-</sup>CCR2<sup>-/-</sup> Mäusen keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Anzahl dünn-myelinisierter Axone festgestellt werden. Bei P0<sup>+/-</sup>CCR2<sup>+/+</sup> Tieren konnten 70,4 ± 19,5 Axone/Querschnitt detektiert werden, bei P0<sup>+/-</sup>CCR2<sup>-/-</sup> lag die Anzahl dünn-myelinisierter Axone/Querschnitt bei 83,2 ± 14,5. Im Alter von zwölf Monaten zeigte sich auch in den Wildtypkontrollen eine geringe Anzahl dünn-myelinisierter Axone. In P0<sup>+/+</sup>CCR2<sup>+/+</sup> Tieren konnten 24,7 ± 6,0 Axone/Querschnitt gezählt werden, in P0<sup>+/+</sup>CCR2<sup>-/-</sup> Tieren lag die Gesamtzahl bei 17,0 Axonen/Querschnitt.



**Abbildung 3.20:** A: dünn-myelinisiertes Axon (A) in Nähe einer Schwann Zelle (SZ), normal myelinisiertes Axon (\*). Messbalken= 2  $\mu$ m. B: Quantifizierung dünn-myelinisierter Axone im N. quadriceps femoris von P0/CCR2 Mäusen im Alter von zwölf Monaten. P0<sup>-/-</sup> Mäuse zeigen im Vergleich zu den Kontrollen eine gesteigerte Anzahl dünn-myelinisierter Axone, jedoch sind keine Unterschiede aufgrund der CCR2-Defizienz zu beobachten. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichung. P0<sup>+/+</sup>CCR2<sup>+/+</sup> (n=3), P0<sup>+/+</sup>CCR2<sup>-/-</sup> (n=2), P0<sup>+/-</sup>CCR2<sup>+/+</sup> (n=5), P0<sup>+/-</sup>CCR2<sup>-/-</sup> (n=5).



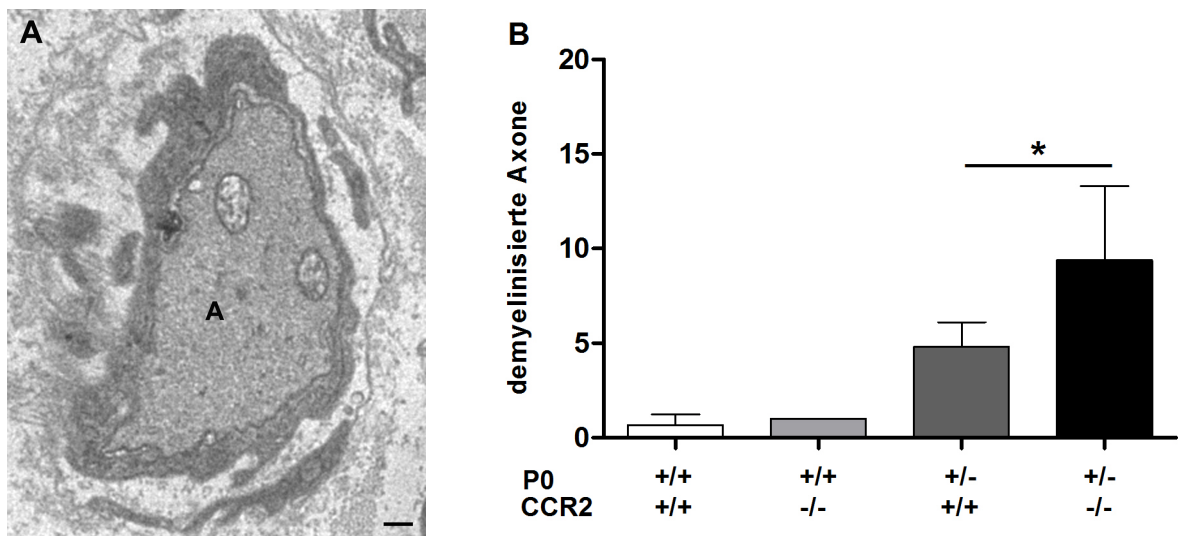
**Abbildung 3.21:** A: Axon (A) mit Zwiebelschalenbildung („onion bulb“) (Pfeile). Messbalken= 2  $\mu$ m. SZ= Schwann-Zelle. B: Quantifizierung von Axonen mit „onion bulbs“ im N. quadriceps femoris von P0/CCR2 Mäusen im Alter von zwölf Monaten. P0<sup>-/-</sup> Mäuse weisen im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollen eine gesteigerte Anzahl von „onion bulbs“ auf. CCR2-defiziente P0<sup>-/-</sup> Mäuse zeigen keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu P0<sup>+/-</sup>CCR2<sup>+/+</sup> Mäusen. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichung. P0<sup>+/+</sup>CCR2<sup>+/+</sup> (n=3), P0<sup>+/+</sup>CCR2<sup>-/-</sup> (n=2), P0<sup>+/-</sup>CCR2<sup>+/+</sup> (n=5), P0<sup>+/-</sup>CCR2<sup>-/-</sup> (n=5).

Bei der Quantifizierung von Axonen mit Zwiebelschalenbildung („onion bulbs“) im N. quadriceps femoris konnte in P0<sup>+/-</sup>CCR2<sup>-/-</sup> Mäusen im Alter von zwölf Monaten eine geringe Zunahme im



Vergleich zu  $P0^{+/-}CCR2^{+/+}$  Mäusen beobachtet werden (Abb. 3.21B), jedoch wurde kein signifikantes Niveau zwischen den beiden Gruppen erreicht ( $p=0,1$ ).

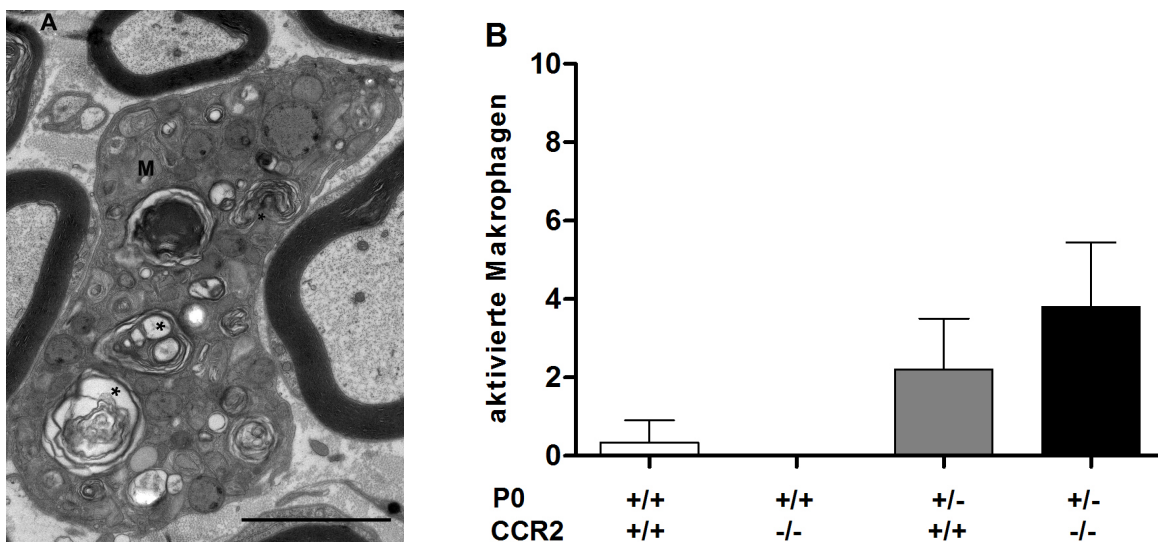
In  $P0^{+/-}CCR2^{+/+}$  Tieren wurden  $24,8 \pm 5,3$  „onion bulbs“/Querschnitt gezählt, bei  $P0^{+/-}CCR2^{-/-}$  Tieren lag die Gesamtzahl bei  $30,6 \pm 4,4$  „onion bulbs“/Querschnitt. In den beiden Wildtyp-Kontrollgruppen wurde eine geringe Anzahl an „onion bulbs“ detektiert ( $P0^{+/+}CCR2^{+/+}$   $3,7 \pm 2,1$ ;  $P0^{+/+}CCR2^{-/-}$   $2,0 \pm 0,0$ ).



**Abbildung 3.22:** A: komplett demyelinisiertes Axon (A). Messbalken= 2 µm. B: Quantifizierung komplett demyelinisierter Axone im N. quadriceps femoris von  $P0/CCR2$  Mäusen im Alter von zwölf Monaten. Bei  $P0^{+/-}CCR2^{-/-}$  Mäusen ist eine signifikante Zunahme demyelinisierter Axone im Vergleich zu  $P0^{+/-}CCR2^{+/+}$  Mäusen zu beobachten. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichung. Signifikanz nach ANOVA sowie Bonferroni *post-hoc*-Test \*  $p < 0,05$ .  $P0^{+/+}CCR2^{+/+}$  (n=3),  $P0^{+/+}CCR2^{-/-}$  (n=2),  $P0^{+/-}CCR2^{+/+}$  (n=5),  $P0^{+/-}CCR2^{-/-}$  (n=5).

Ein weiteres Merkmal der Nervenpathologie von  $P0^{+/-}$  Mäusen sind demyelinisierte Axone (Abb. 3.22A). Die Quantifizierung von demyelinisierten Axonen im N. quadriceps femoris zeigte, dass bei  $CCR2$ -defizienten  $P0^{+/-}$  Mäusen die Anzahl demyelinisierter Axone im Vergleich zu  $CCR2$ -kompetenten  $P0^{+/-}$  Mäusen signifikant erhöht ist (\* $p < 0,05$ ). Im Alter von zwölf Monaten lag die Gesamtzahl demyelinisierter Axone bei  $P0^{+/-}CCR2^{+/+}$  Tieren bei  $4,8 \pm 1,3$  pro Querschnitt, während bei  $P0^{+/-}CCR2^{-/-}$  die Anzahl demyelinisierter Axone auf  $9,4 \pm 3,9$  pro Querschnitt anstieg. Bei  $P0^{+/+}CCR2^{+/+}$  Mäusen konnten  $0,7 \pm 0,6$  Axone/Querschnitt gezählt werden, bei  $P0^{+/+}CCR2^{-/-}$  Mäusen lag die Gesamtzahl demyelinisierter Axone bei 1,0 pro Querschnitt (Abb. 3.22B).

Aktivierte Makrophagen, die mit Myelindebris beladen sind wurden im N. quadriceps femoris von P0/CCR2 Mäusen im Alter von zwölf Monaten quantifiziert (Abb. 3.23B). Im Vergleich zu P0<sup>+/-</sup> CCR2<sup>+/-</sup> Mäusen zeigte sich bei P0<sup>+/-</sup>CCR2<sup>-/-</sup> Mäusen eine geringe Zunahme von aktivierten Makrophagen, jedoch konnte kein signifikanter Gruppenunterschied detektiert werden (p= 0,1). Die Gesamtzahl phagozytischer Makrophagen lag bei P0<sup>+/-</sup>CCR2<sup>+/-</sup> Tieren bei 2,2 ± 1,3 Zellen/Querschnitt, bei P0<sup>+/-</sup>CCR2<sup>-/-</sup> Tieren konnten 3,8 ± 1,6 Zellen/Querschnitt gezählt werden. In Nervenquerschnitten von P0<sup>+/-</sup>CCR2<sup>+/-</sup> Kontrolltieren wurde eine geringe Anzahl von 0,3 ± 0,6 Makrophagen gezählt, während im N. quadriceps femoris von P0<sup>+/-</sup>CCR2<sup>-/-</sup> Tieren keine aktivierten Makrophagen vorhanden waren.

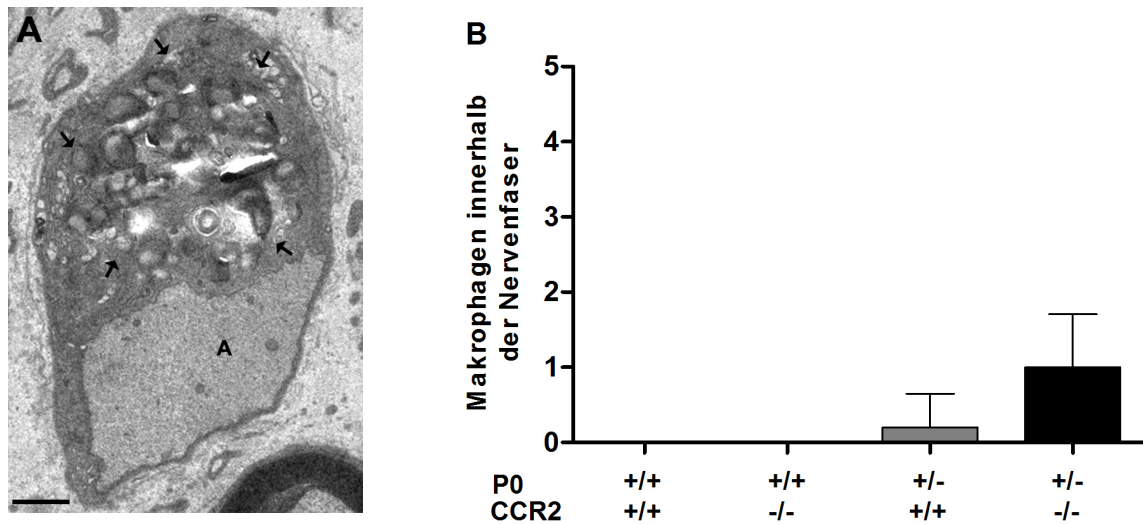


**Abbildung 3.23:** A: phagozytischer Makrophage (M), der mit Myelin-Abbauprodukten (\*) und Lipidvakuolen beladen ist. Messbalken= 4 µm. B: Quantifizierung phagozytischer Makrophagen im N. quadriceps femoris von P0/CCR2 Mäusen im Alter von zwölf Monaten. Bei P0<sup>+/-</sup>CCR2<sup>-/-</sup> Mäusen ist eine geringe Zunahme aktivierter Makrophagen im Vergleich zu P0<sup>+/-</sup>CCR2<sup>+/-</sup> Mäusen zu beobachten. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichung. P0<sup>+/-</sup>CCR2<sup>+/-</sup> (n=3), P0<sup>+/-</sup>CCR2<sup>-/-</sup> (n=2), P0<sup>+/-</sup>CCR2<sup>+/-</sup> (n=5), P0<sup>+/-</sup>CCR2<sup>-/-</sup> (n=5).

Des Weiteren wurden phagozytische Makrophagen quantifiziert, die sich innerhalb der Schwann-Zell-eigenen Basallamina, in unmittelbarer Umgebung eines Axons befanden (Abb. 3.24A). In P0<sup>+/-</sup> CCR2<sup>-/-</sup> Mäusen konnte im Vergleich zu P0<sup>+/-</sup>CCR2<sup>+/-</sup> Mäusen eine geringe Zunahme dieser Makrophagen beobachtet werden. Die Gesamtzahl der Makrophagen innerhalb einer Nervenfasern lag bei P0<sup>+/-</sup>CCR2<sup>-/-</sup> Mutanten bei 1 ± 0,7 Zellen/Querschnitt und bei P0<sup>+/-</sup>CCR2<sup>+/-</sup> Mutanten bei



$0,2 \pm 0,4$  Zellen/Querschnitt ( $p= 0,06$ ). In Nervenquerschnitten der entsprechenden Wildtyp-Kontrolltiere wurden keine Makrophagen innerhalb der Nervenfasern quantifiziert (Abb. 3.24B).

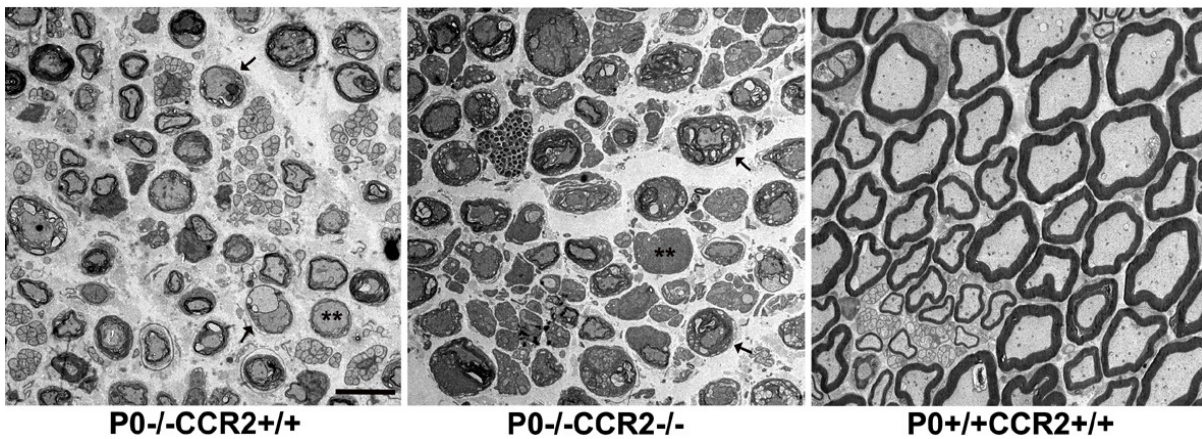


**Abbildung 3.24:** A: phagozytierende Makrophage (Pfeile), die sich innerhalb der Schwann-Zell-eigenen Basallamina in unmittelbarer Umgebung eines Axons (A) befindet. Messbalken= 5 µm. B: Quantifizierung phagozytierender Makrophagen die sich innerhalb einzelner Nervenfasern im N. quadriceps femoris von P0/CCR2 Mäusen im Alter von zwölf Monaten befinden. Bei P0<sup>-/-</sup>CCR2<sup>-/-</sup> Mäusen ist geringe Zunahme phagozytierender Makrophagen im Vergleich zu P0<sup>+/-</sup>CCR2<sup>+/+</sup> Mäusen zu beobachten, jedoch ohne signifikanten Unterschied. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichung. P0<sup>+/+</sup>CCR2<sup>+/+</sup> (n=3), P0<sup>+/+</sup>CCR2<sup>-/-</sup> (n=2), P0<sup>+/-</sup>CCR2<sup>+/+</sup> (n=5), P0<sup>+/-</sup>CCR2<sup>-/-</sup> (n=5).

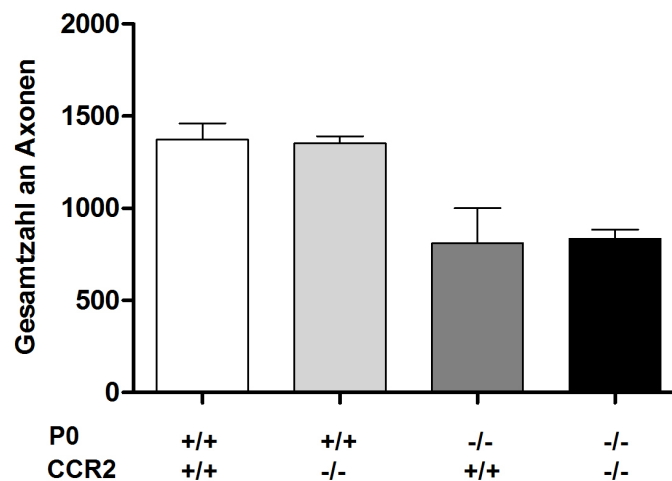
### 3.3.2 Morphologische Analysen des N. plantaris

Die dysmyelinisierende Nervenpathologie von P0<sup>-/-</sup> Mäusen zeichnet sich durch eine gestörte Myelinkompaktierung und axonalen Verlust aus, der vom ersten Lebensmonat an besteht. Während der ersten drei Lebensmonate degenerieren ca. 40% aller Axone, weiterhin kommt es zu keiner normalen Ausbildung von Myelinscheiden (Samsam et al., 2003).

Welchen Einfluss CCR2 auf die axonale Degeneration ausübt, sollte durch die Quantifizierung von Axonen im N. plantaris von P0<sup>-/-</sup> Mäusen im Alter von sechs Monaten beurteilt werden.



**Abbildung 3.25:** Elektronenmikroskopische Aufnahmen des N. plantaris (Ausschnitt) von P0/CCR2 Mäusen im Alter von sechs Monaten. P0<sup>-/-</sup> Mäuse zeichnen sich durch einen erheblichen axonalen Verlust aus, weiterhin kann man dekompaktierte Myelinscheiden (Pfeile) und demyelinisierte Axone beobachten (\*\*). Messbalken= 5 µm.



**Abbildung 3.26:** quantitative Auswertung der Axonanzahl im N. plantaris von P0/CCR2 Mäusen im Alter von sechs Monaten. P0<sup>-/-</sup> zeigen einen erheblichen Verlust an Axonen im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollmäusen, jedoch kann kein CCR2-abhängiger Unterschied festgestellt werden. P0<sup>+/+</sup>CCR2<sup>+/+</sup> n=3; P0<sup>+/+</sup>CCR2<sup>-/-</sup> n=3; P0<sup>-/-</sup>CCR2<sup>+/+</sup> n= 4; P0<sup>-/-</sup>CCR2<sup>-/-</sup> n= 4.

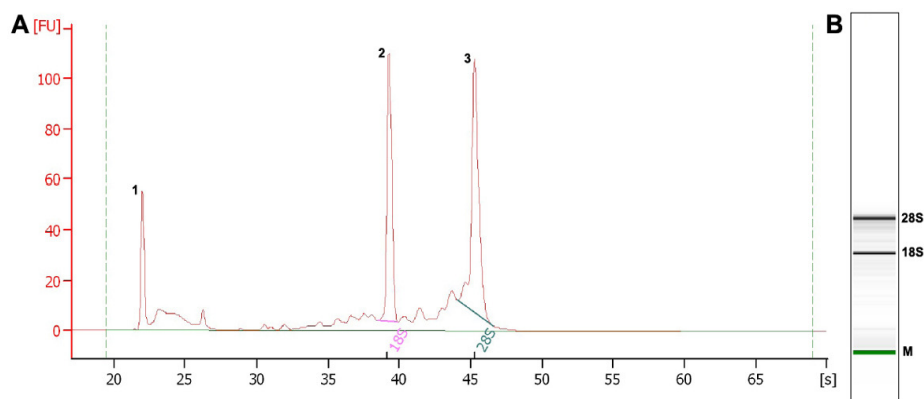
Im N. plantaris von P0<sup>-/-</sup> Mäusen konnte im Alter von sechs Monaten ein erheblicher axonaler Verlust von ca. 40% im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollmäusen beobachtet werden (Abb. 3.26). Bei P0<sup>-/-</sup>CCR2<sup>+/+</sup> Mäusen konnten 808,5 ± 192,9 Axone/Querschnitt gezählt werden, bei P0<sup>-/-</sup>CCR2<sup>-/-</sup> Mäusen betrug die Gesamtzahl an Axonen 813,0 ± 84,0 pro Querschnitt. Bei P0<sup>+/+</sup>CCR2<sup>+/+</sup> Tieren konnten im N. plantaris 1373,0 ± 87,2 Axone/Querschnitt gezählt werden, bei P0<sup>+/+</sup>CCR2<sup>-/-</sup> Tieren betrug die Axonanzahl/Querschnitt 1353,0 ± 38,2. Bezüglich der Axonanzahl im N. plantaris konnten keine CCR2-abhängigen Unterschiede detektiert werden.

### 3.4 quantitative *Realtime*-PCR (qRT-PCR) Analysen

Die Rekrutierung und Aktivierung von Immunzellen wird u.a. durch die Regulation pro- und anti-inflammatorischer Cytokine und Chemokine kontrolliert. CCR2-defiziente  $P0^{+/-}$  Mäuse zeigen im Alter von zwölf Monaten eine stärker ausgeprägte Demyelinisierung und mehr aktivierte Makrophagen im N. quadriceps femoris im Vergleich zu CCR2-kompetenten  $P0^{+/-}$  Mäusen. Cytokine, die möglicherweise eine CCR2-Defizienz kompensieren und in der inflammatorischen Immunantwort bei  $P0^{+/-}$  Mäusen involviert sind, wurden auf ihr mRNA Expressionsprofil hin untersucht (siehe Kapitel 2.9.5.).

#### 3.4.1 Bestimmung der RNA-Integrität

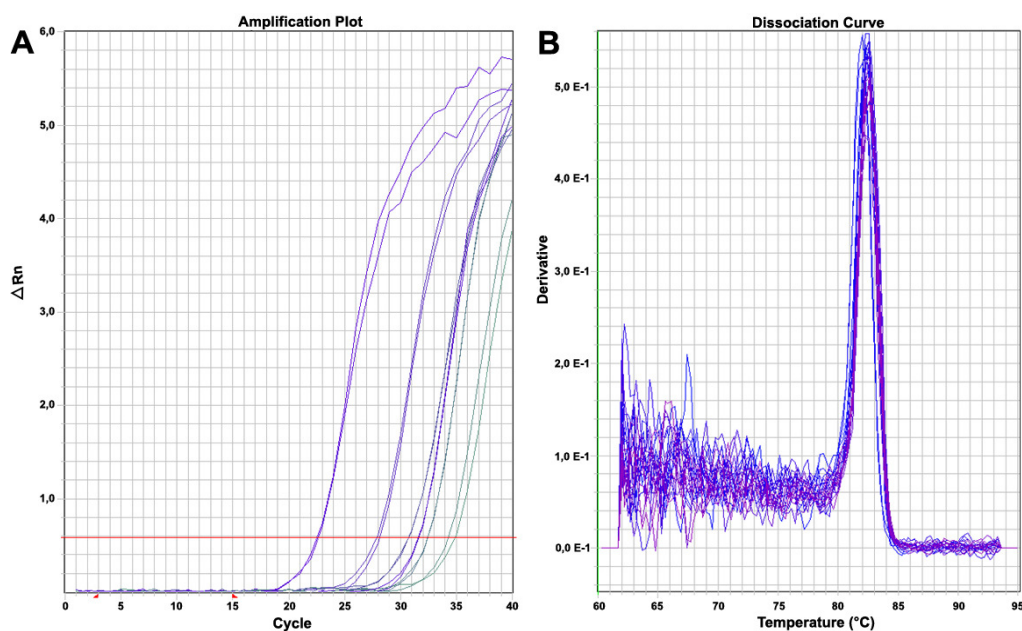
Mithilfe der Agilent Bioanalyzer-Technik war es möglich, die Qualität und Integrität der extrahierten RNA (siehe Kapitel 2.9.5.2) zu bestimmen. Die Laufweiten-Elutionszeiten der einzelnen Proben wurden mit vordefinierten RNA-Größen in Korrelation gebracht und als digitales Elektropherogramm dargestellt (Abb. 3.27). Anhand der separierten RNA-Fragmente wird mit der Agilent-Bioanalyzer Expert Software die Qualität der RNA errechnet, die als RIN-Nummer (RNA-Integritätsmaß) auf einer Skala von 1 bis 10 angegeben wird. Je höher die RIN-Nummer, desto größer ist die Integrität der RNA. Für die qRT-Analysen wurden ausschließlich Proben mit einer  $RIN \geq 6$  eingesetzt.



**Abbildung 3.27:** A: exemplarische Abbildung eines Elektropherogramms einer  $P0^{+/+}CCR2^{-/-}$  Probe mit einer RIN von 9,0. Die Spitzenwerte zeigen den Marker (1), die 18S-rRNA (2) und die 28S-rRNA (3). B: Virtuelles Gel des Elektropherogramms. Die 18S- und 28S rRNA Banden deuten auf eine intakte gesamt-RNA hin. M= Marker.

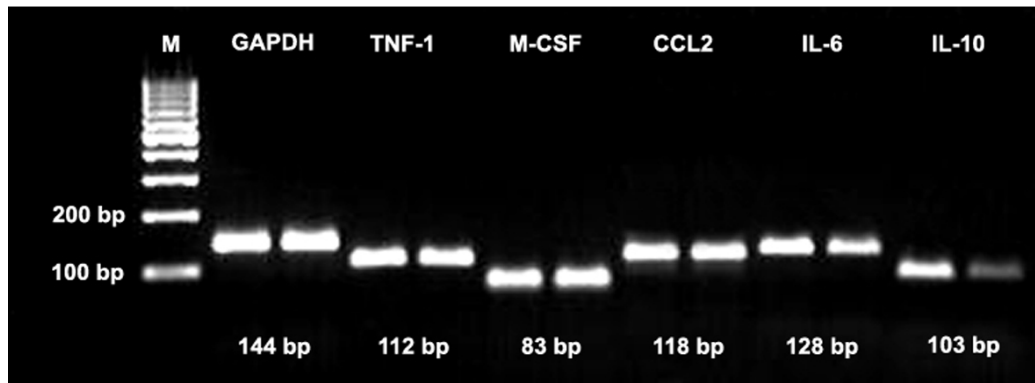
### 3.4.2 Validierung der qRT-PCR

Zur Überprüfung der korrekten Amplifikation der Fragmente wurde nach abgeschlossener qRT-PCR eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt (siehe Kapitel 2.9.5.7). Die Erhöhung der Temperatur in den Reaktionsvertiefungen des Thermocyclers auf 95°C bewirkt ein Aufschmelzen der amplifizierten doppelsträngigen DNA-Moleküle in einzelsträngige DNA, sobald die spezifische Schmelztemperatur des Amplikons erreicht ist. Dabei nimmt die detektierte Fluoreszenz mit zunehmender Konzentration einzelsträngiger DNA ab (Abb. 3.28B).



**Abbildung 3.28:** A: exemplarische Abbildung einer qRT-PCR Amplifikationskurve der Kandidatengene einer  $P0^{+/-}$   $CCR2^{+/+}$  Probe. B: beispielhafte Schmelzkurven der GAPDH-Messung aus cDNA der  $P0^{+/+}CCR2^{+/+}$  Wildtyp-Kontrolle Die Schmelztemperatur liegt hier bei ca. 82°C.

Bei allen amplifizierten Proben zeigte sich die zu erwartende Schmelztemperatur, was auf eine spezifische Primeranlagerung schließen lässt. Als letzte Kontrolle wurden die qRT-PCR Produkte stichprobenartig auf ein 2%iges Agarosegel aufgetragen, um die korrekte Größe der amplifizierten cDNA zu überprüfen (Abb. 3.29).



**Abbildung 3.29:** exemplarische Abbildung zur Fragmentgrößen-Kontrolle der amplifizierten cDNA auf einem 2%igen Agarosegel. M=Marker.

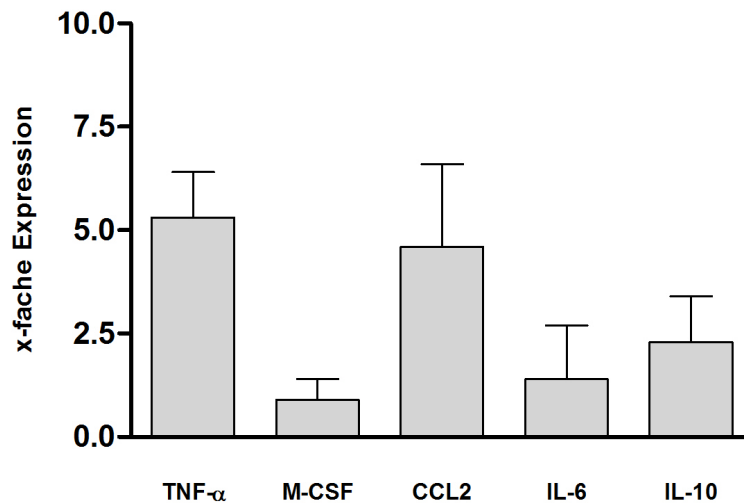
Bei den untersuchten Proben zeigte sich auf dem Agarosegel ausschließlich eine Bande mit der zu erwartenden Fragmentlänge. Somit konnte von einer korrekten Amplifikation der zu untersuchenden cDNA-Sequenzen ausgegangen werden.

### 3.4.3 Expressionsanalysen mittels qRT-PCR

Mithilfe der qRT-PCR ist es möglich, quantitative Aussagen über die vorhandene Menge eines spezifischen cDNA-Transkripts innerhalb einer Probe zu machen. Zur Quantifizierung wurde jede zu untersuchende cDNA-Probe mit den für die Kandidatengene sequenzspezifischen Primern und dem DNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green versetzt. Jede Probe wurde in Duplikaten analysiert. Um Konzentrationsschwankungen zwischen den einzelnen Proben auszugleichen, wurde jeder Ansatz in Relation mit dem konsekutiv exprimierten Referenzgen (GAPDH) standardisiert. Die Auswertung der ermittelten  $C_T$ -Werte der einzelnen qRT-PCR-Analysen wurden mithilfe der Software „Relative Expression Software Tool (REST)“ (siehe Kapitel 2.9.5.6) ausgewertet. Dabei wurden die gemessenen  $C_T$ -Werte jeder Wildtypprobe ( $P0^{+/+}CCR2^{+/+}$ ) von dem ermittelten  $C_T$ -Wert des Referenzgens GAPDH subtrahiert. Der daraus ermittelte  $\Delta C_T$ -Wert jedes fraglichen Gens der Wildtypgruppe wurde mit den analogen  $\Delta C_T$ -Werten der zu untersuchenden Gruppe ( $P0^{+/-}CCR2^{+/+}$  bzw.  $P0^{+/-}CCR2^{-/-}$ ) verglichen und das mathematische Verhältnis errechnet. Die daraus ermittelten  $\Delta\Delta C_T$ -Werte wurden statistisch ausgewertet und als x-fache Expression im Vergleich zur Expression des fraglichen Gens in der Wildtypkontrolle dargestellt.

### 3.4.3.1 Expressionsanalysen im N. quadriceps femoris von $P0^{+/-}CCR2^{+/-}$ Mäusen

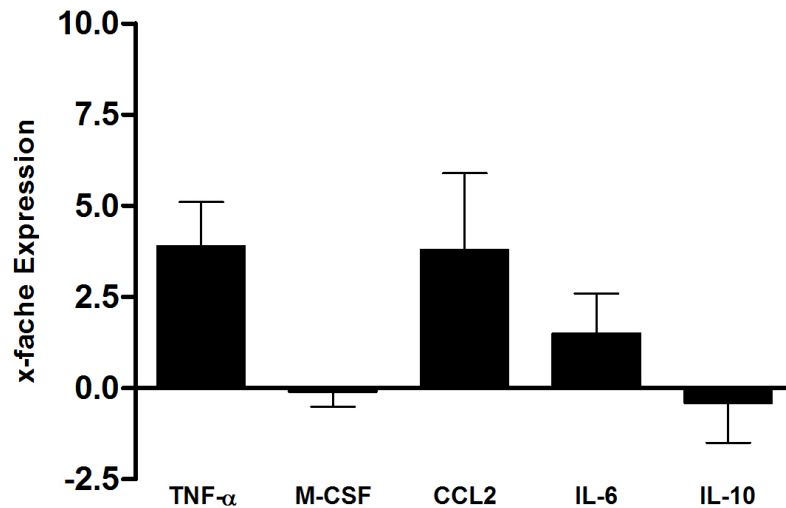
Im N. quadriceps femoris von zwölf Monate alten  $P0^{+/-}CCR2^{+/-}$  Mäusen kam es zu einer Hochregulation aller untersuchten Cytokine. In Relation zur Wildtypkontrolle konnte für  $TNF-\alpha$  ( $+5,3 \pm 1,1$ -fach) und CCL2 ( $+4,6 \pm 2,0$ -fach) die höchste Expression detektiert werden, gefolgt von einer  $2,3 \pm 1,1$ -fachen Zunahme an IL-10. Das pro-inflammatorische Cytokin M-CSF war um den Faktor  $+0,9 \pm 0,5$ -fach höher exprimiert, IL-6 wurde  $1,4 \pm 1,3$ -fach höher exprimiert. In Bezug auf die Wildtypkontrolle war die mRNA Expression der untersuchten Cytokine jedoch nicht signifikant reguliert.



**Abbildung 3.31:** Relative Expression der Kandidatengene in 12 Monate alten  $P0^{+/-}CCR2^{+/-}$  Tieren in Relation zu altersgleichen  $P0^{+/-}CCR2^{+/-}$  Tieren. Dargestellt ist die x-fache Expression  $\pm$  Standardabweichung. Pro Gen  $n=6$ , Kontrolle  $n=4$ .

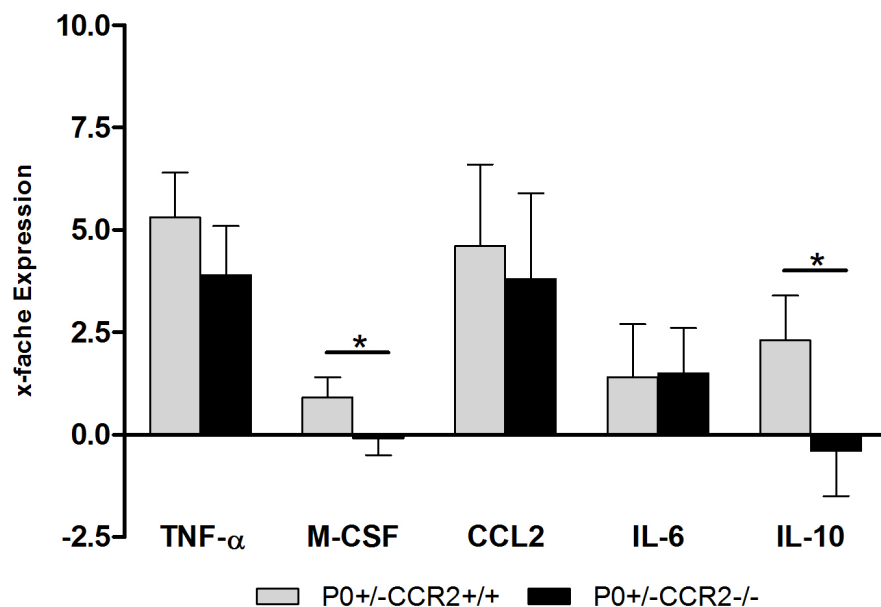
### 3.4.3.2 Expressionsanalysen im N. quadriceps femoris von $P0^{+/-}CCR2^{-/-}$ Mäusen

Die qRT-Analysen im N. quadriceps femoris von  $P0^{+/-}CCR2^{-/-}$  Mäusen zeigten auch hier eine gesteigerte, jedoch nicht signifikant regulierte mRNA Expression von  $TNF-\alpha$  ( $+3,9 \pm 1,2$ -fach), CCL2 ( $+3,8 \pm 2,1$ -fach) und IL-6 ( $+1,5 \pm 1,1$ -fach) im Vergleich zur Wildtypkontrolle. Für die Expression von IL-10 ( $-0,4 \pm 1,1$ -fach) und M-CSF ( $-0,1 \pm 0,4$ -fach) zeigt sich hingegen eine Deregulation in Bezug auf die Wildtypkontrolle, die ebenso nicht signifikant reguliert ist (Abb. 3.32).



**Abbildung 3.32:** Relative Expression der Kandidatengene in 12 Monate-alten  $P0^{+/-}CCR2^{-/-}$  Tieren in Relation zu altersgleichen  $P0^{+/+}CCR2^{+/+}$  Tieren. Dargestellt ist die x-fache Expression  $\pm$  Standardabweichung. Pro Gen  $n=6$ , Kontrolle  $n=4$ .

### 3.4.3.3 Vergleichende Expressionsanalysen im N. quadriceps femoris von $P0^{+/-}$ Mäusen



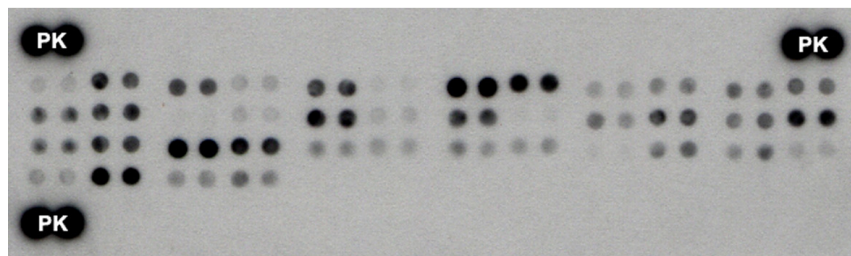
**Abbildung 3.33:** Vergleich der relativen Expression der Kandidatengene zwischen  $P0^{+/-}CCR2^{+/+}$  und  $P0^{+/-}CCR2^{-/-}$  Mäusen. Dargestellt ist die x-fache Expression  $\pm$  Standardabweichung. Signifikanz nach t-Test zwischen den beiden Gruppen \*  $p < 0,05$ .

Der direkte Vergleich zwischen  $P0^{+/-}$  Mäusen zeigt für die Expression von  $TNF-\alpha$ , CCL2 und IL-6 keine signifikanten CCR2-abhängigen Unterschiede im N. quadriceps femoris (Abb. 3.33). Für die Expression von M-CSF konnte in  $P0^{+/-}CCR2^{+/+}$  Mäusen eine signifikante Erhöhung ( $+0,9 \pm 0,5$ -fach) im Vergleich zu  $P0^{+/-}CCR2^{-/-}$  Mäusen ( $-0,1 \pm 0,4$ -fach) detektiert werden ( $p < 0,05$ ). Eine signifikante Regulation zwischen den beiden Gruppen zeigte sich weiterhin in der Expression von IL-10 ( $p < 0,05$ ). Während in  $P0^{+/-}CCR2^{+/+}$  Mäusen die IL-10 Expression um den Faktor  $+2,3 \pm 1,1$ -fach hochreguliert wurde, konnte in CCR2-defizienten  $P0^{+/-}$ Mäusen eine Deregulation des Cytokins um den Faktor  $0,4 \pm 1,1$ -fach beobachtet werden.



### 3.5 Proteome Profiler™ Array (Maus-Cytokin Array)

Inwiefern die Proteinexpression von Cytokinen und Chemokinen durch die CCR2-Defizienz in peripheren Nerven von  $P0^{+/-}$  Mäusen reguliert wird, sollte mithilfe des *Proteome Profiler*™ Cytokin-Arrays (R&D Systems) geklärt werden. Gewebelysate des N. quadriceps femoris von zwölf Monate alten  $P0^{+/+}CCR2^{+/+}$ ,  $P0^{+/+}CCR2^{-/-}$ ,  $P0^{+/-}CCR2^{+/+}$  und  $P0^{+/-}CCR2^{-/-}$  Mäusen (jeweils  $n=2$ ) wurden hierzu mit einem Gemisch aus biotinylierten Detektionsantikörpern versetzt, auf einer Nitrocellulose-Membran inkubiert und die Antikörperkomplexe mittels Streptavidin-Meeretichperoxidase (HRP) konjugiert (siehe Kapitel 2.9.6). Durch Zugabe von ECL-Substratlösung erfolgte die Detektion der 40 ausgewählten Cytokine auf einem Autoradiografie-Film.



**Abbildung 3.34:** Beispiel eines *Proteome Profiler*™ Cytokin Arrays (Autoradiografie-Film: Expositionszeit 10 min) einer  $P0^{+/-}CCR2^{-/-}$  Lysatprobe des N. quadriceps femoris. Die einzelnen Spots stehen jeweils für ein bestimmtes Cytokin bzw. Chemokin (vgl. Tab. 2.11, Kapitel 2.9.6.2). PK= Positivkontrolle.

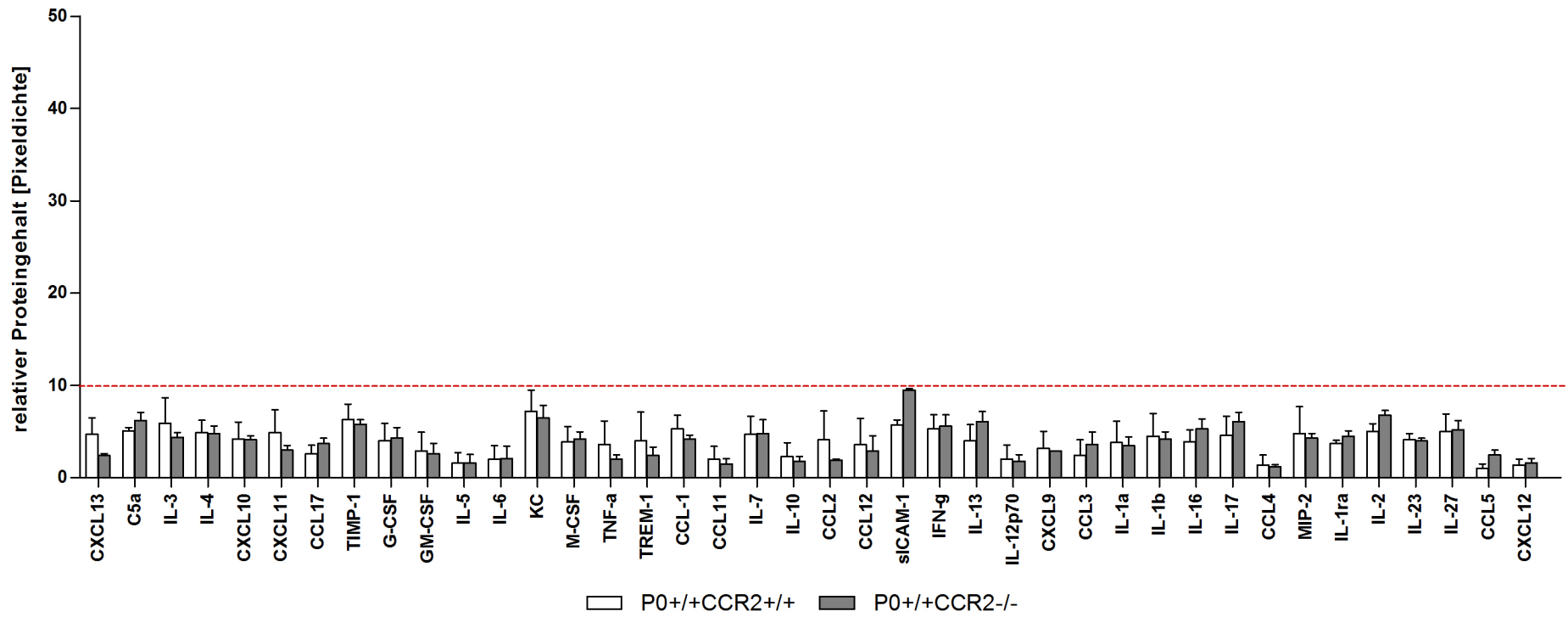
Durch die densitometrische Messung der einzelnen Spots konnte die Pixeldichte bestimmt werden, die ein Maß für die relative Veränderung des Cytokingehalts einer Probe darstellt. Von jeder Probe wurde nach der densitometrischen Messung der Blank-Wert (Hintergrund) abgezogen, die Werte aus den einzelnen Messungen gemittelt und als relativer Proteingehalt mit Standardfehler dargestellt.

### 3.5.1 Cytokingehalt in P0<sup>+/+</sup>CCR2<sup>+/+</sup> und P0<sup>+/+</sup>CCR2<sup>-/-</sup> Mäusen

Die Messung des relativen Cytokingehalts zeigte im N. quadriceps femoris der beiden Kontrollgruppen keine signifikanten Unterschiede (Abb. 3.35). Für den Proteingehalt der einzelnen Cytokine konnte ein basales Niveau detektiert werden, das einen Messwert von 10 Pixeleinheiten nicht überschritt. Die einzelnen Messwerte sind in Tabelle 3.2 dargestellt.

Target	P0 <sup>+/+</sup> CCR2 <sup>+/+</sup> (MW ± SD)	P0 <sup>+/+</sup> CCR2 <sup>-/-</sup> (MW ± SD)	Target	P0 <sup>+/+</sup> CCR2 <sup>+/+</sup> (MW ± SD)	P0 <sup>+/+</sup> CCR2 <sup>-/-</sup> (MW ± SD)
CXCL13	4,7 ± 2,5	2,4 ± 0,3	CCL2	4,1 ± 4,4	1,9 ± 0,2
C5a	5,1 ± 0,5	6,2 ± 1,2	CCL12	3,6 ± 4,0	2,9 ± 2,3
IL-3	5,9 ± 3,9	4,4 ± 0,7	sICAM-1	5,7 ± 0,8	9,5 ± 0,2
IL-4	4,9 ± 1,9	4,8 ± 1,1	IFN-γ	5,3 ± 2,2	5,6 ± 1,7
CXCL10	4,2 ± 2,6	4,1 ± 0,6	IL-13	4,0 ± 2,5	6,1 ± 1,5
CXCL11	4,9 ± 3,5	3,0 ± 0,7	IL-12p70	2,0 ± 2,2	1,8 ± 1,0
CCL17	2,6 ± 1,3	3,7 ± 0,8	CXCL9	3,2 ± 2,6	2,9 ± 0,0
TIMP-1	6,3 ± 2,4	5,8 ± 0,7	CCL3	2,4 ± 2,4	3,6 ± 1,9
G-CSF	4,0 ± 2,7	4,3 ± 1,6	IL-1α	3,8 ± 3,3	3,5 ± 1,3
GM-CSF	2,9 ± 2,9	2,6 ± 1,6	IL-1β	4,5 ± 3,5	4,2 ± 1,1
IL-5	1,6 ± 1,6	1,6 ± 1,3	IL-16	3,9 ± 1,8	5,3 ± 1,5
IL-6	2,0 ± 2,1	2,1 ± 1,9	IL-17	4,6 ± 2,9	6,1 ± 1,4
KC	7,2 ± 3,2	6,5 ± 1,9	CCL4	1,4 ± 1,5	1,2 ± 0,3
M-CSF	3,9 ± 2,3	4,2 ± 1,1	MIP-2	4,8 ± 4,1	4,3 ± 0,7
TNF-α	3,6 ± 3,6	2,0 ± 0,7	IL-1ra	3,7 ± 0,5	4,5 ± 0,8
TREM-1	4,0 ± 4,4	2,4 ± 1,3	IL-2	5,0 ± 1,2	6,8 ± 0,7
CCL1	5,3 ± 2,1	4,2 ± 0,6	IL-23	4,1 ± 1,0	4,0 ± 0,4
CCL11	2,0 ± 2,0	1,5 ± 0,8	IL-27	5,0 ± 2,7	5,2 ± 1,4
IL-7	4,7 ± 2,8	4,8 ± 2,1	CCL5	1,0 ± 0,7	2,5 ± 0,7
IL-10	2,3 ± 2,1	1,8 ± 0,7	CXCL12	1,4 ± 0,9	1,6 ± 0,7

Tabelle 3.2: relative Veränderung des Cytokingehalts im N. quadriceps femoris von zwölf Monate alten P0<sup>+/+</sup>CCR2<sup>+/+</sup> und P0<sup>+/+</sup>CCR2<sup>-/-</sup> Mäusen. MW= Mittelwert, SD= Standardabweichung



**Abbildung 3.35:** Densitometrische Auswertung der Cytokin Arrays (je n=2) getestet mit Gewebelysat des N. quadriceps femoris von P0<sup>+/+</sup>CCR2<sup>+/+</sup> und P0<sup>+/+</sup>CCR2<sup>-/-</sup> Mäusen im Alter von zwölf Monaten. Die rote Linie markiert den Schwellenwert mit einer Pixeldichte vom Wert 10. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardfehler.

### 3.5.2 Cytokingehalt in P0<sup>+/-</sup>CCR2<sup>+/+</sup> und P0<sup>+/-</sup>CCR2<sup>-/-</sup> Mäusen

Die Messung des relativen Proteingehalts verschiedener Cytokine zeigte im N. quadriceps femoris von zwölf Monate alten P0<sup>+/-</sup> Tieren im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollen eine Zunahme vieler Cytokine (Abb. 3.36). Zur besseren Differenzierung von Cytokinen, deren relative Zunahme im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollen stärker reguliert ist, wurde ein Schwellenwert von 10 Pixeleinheiten gesetzt. Cytokine, deren Proteingehalt diesen Schwellenwert übersteigt sind in Abbildung 3.37 dargestellt. Die einzelnen Messwerte sind in Tabelle 3.3 dargestellt.

Target	P0 <sup>+/-</sup> CCR2 <sup>+/+</sup> (MW ± SD)	P0 <sup>+/-</sup> CCR2 <sup>-/-</sup> (MW ± SD)	Target	P0 <sup>+/-</sup> CCR2 <sup>+/+</sup> (MW ± SD)	P0 <sup>+/-</sup> CCR2 <sup>-/-</sup> (MW ± SD)
CXCL13	7,5 ± 3,5	3,6 ± 4,9	CCL2	9,8 ± 7,2	7,3 ± 2,3
C5a	17,1 ± 3,3	12,2 ± 4,3	CCL12	5,9 ± 4,0	5,8 ± 2,5
IL-3	11,5 ± 4,1	7,1 ± 2,5	sICAM-1	28,0 ± 12,4	22,8 ± 3,3
IL-4	14,6 ± 7,9	8,9 ± 0,1	IFN-γ	18,3 ± 10,7	15,4 ± 1,2
CXCL10	9,3 ± 2,8	6,7 ± 2,8	IL-13	13,9 ± 9,2	10,6 ± 1,5
CXCL11	11,7 ± 6,9	9,9 ± 0,4	IL-12p70	2,3 ± 1,5	2,2 ± 0,1
CCL17	6,4 ± 2,2	4,5 ± 3,5	CXCL9	9,0 ± 5,6	6,2 ± 2,6
TIMP-1	17,9 ± 9,9	18,3 ± 0,2	CCL3	6,9 ± 4,6	5,3 ± 1,9
G-CSF	12,8 ± 5,0	9,3 ± 3,3	IL-1α	5,6 ± 2,0	5,5 ± 2,9
GM-CSF	11,9 ± 11,4	3,1 ± 0,1	IL-1β	6,7 ± 3,0	6,8 ± 1,5
IL-5	2,8 ± 1,1	2,0 ± 0,5	IL-16	5,3 ± 1,7	7,9 ± 4,1
IL-6	3,6 ± 1,3	2,8 ± 0,5	IL-17	11,9 ± 10,9	11,0 ± 0,9
KC	20,3 ± 11,7	18,4 ± 7,6	CCL4	1,8 ± 1,7	1,4 ± 1,4
M-CSF	13,9 ± 7,3	12,4 ± 3,8	MIP-2	9,1 ± 8,8	8,2 ± 2,2
TNF-α	5,6 ± 4,5	5,4 ± 0,2	IL-1ra	9,3 ± 4,2	8,0 ± 0,4
TREM-1	6,7 ± 6,1	6,1 ± 0,5	IL-2	8,1 ± 2,5	8,8 ± 1,5
CCL1	11,9 ± 1,6	12,0 ± 0,6	IL-23	7,5 ± 4,2	7,4 ± 0,7
CCL11	3,5 ± 1,7	2,9 ± 0,6	IL-27	13,5 ± 10,4	11,3 ± 3,3
IL-7	16,1 ± 9,8	13,3 ± 4,8	CCL5	5,4 ± 3,2	5,4 ± 0,7
IL-10	4,1 ± 2,1	3,7 ± 0,4	CXCL12	3,7 ± 2,7	3,2 ± 0,2

Tabelle 3.3: relative Veränderung des Cytokingehalts im N. quadriceps femoris von zwölf Monate alten P0<sup>+/-</sup>CCR2<sup>+/+</sup> und P0<sup>+/-</sup>CCR2<sup>-/-</sup> Mäusen. MW= Mittelwert, SD= Standardabweichung

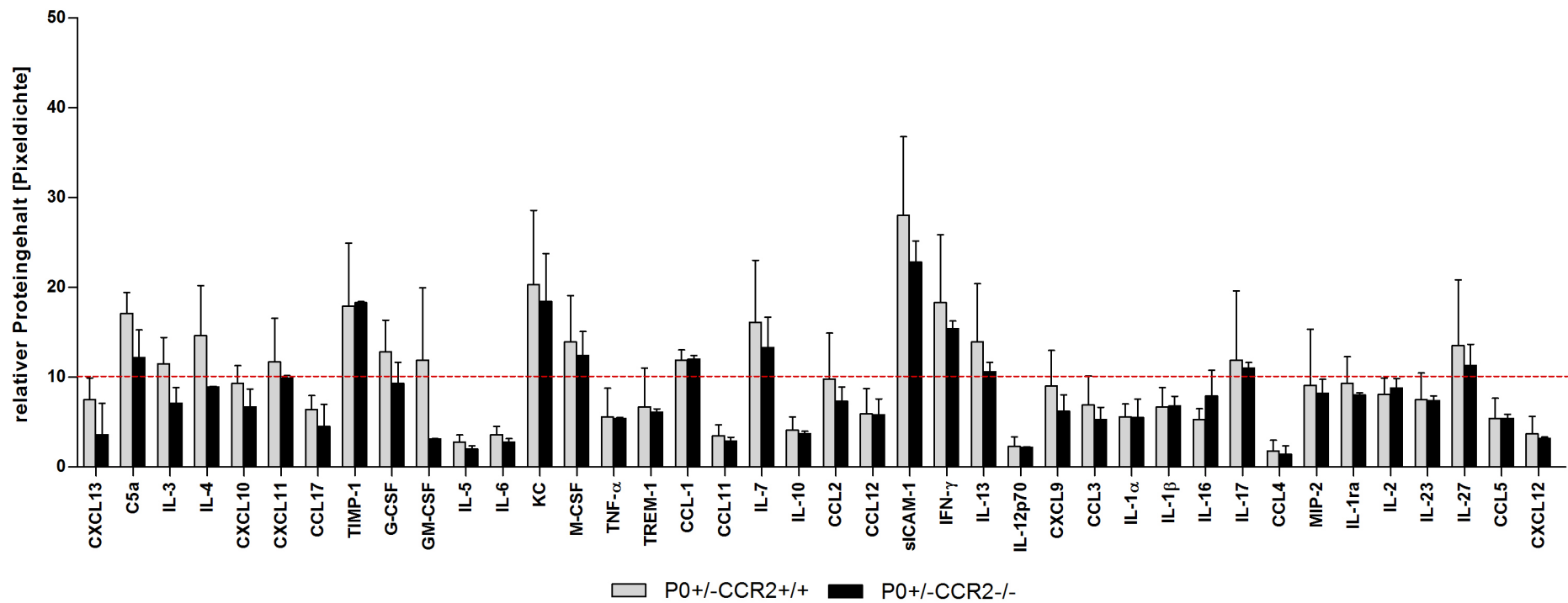
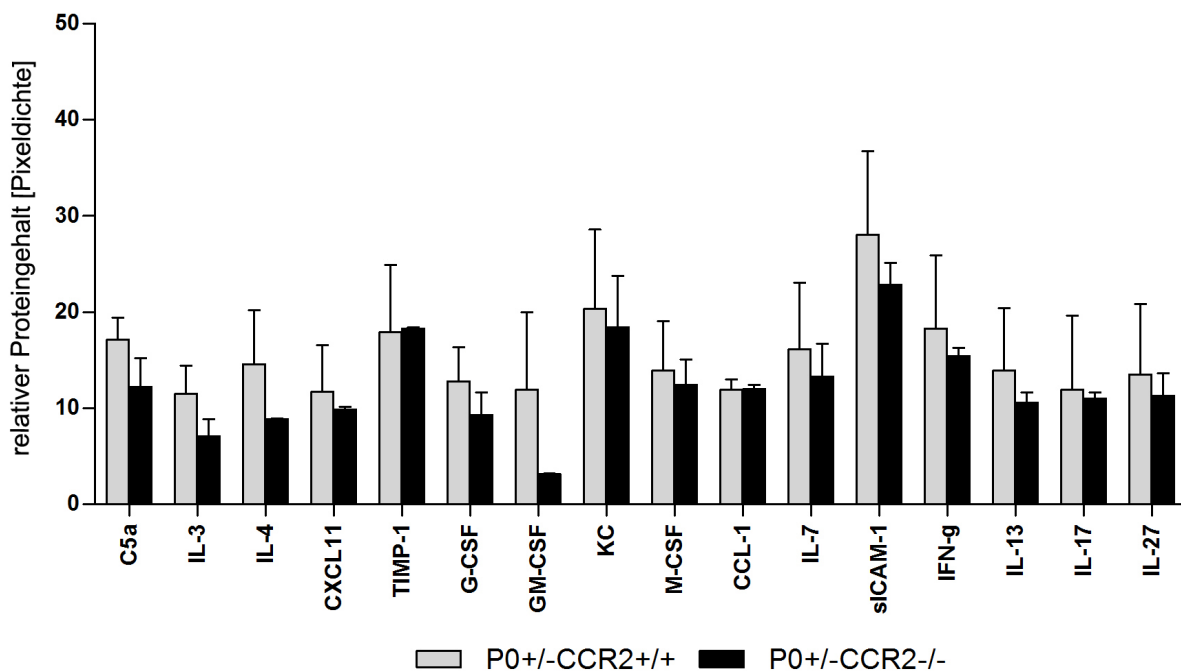


Abbildung 3.36: Densitometrische Auswertung der Cytokin-Arrays (je n=2) getestet mit Gewebelysat des N. quadriceps femoris von P0<sup>+/-</sup>CCR2<sup>+/-</sup> und P0<sup>+/-</sup>CCR2<sup>-/-</sup> Mäusen im Alter von zwölf Monaten. Die rote Linie markiert den Schwellenwert mit einer Pixeldichte vom Wert 10. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardfehler.

Für  $P0^{+/-}CCR2^{+/+}$  und  $P0^{+/-}CCR2^{-/-}$  Mäuse zeigte sich im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollen ein erhöhter Proteingehalt für den Komplementfaktor C5a, die pro-inflammatorischen Cytokine IL-3, IL-7, IL-13, IL-17, Interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), M-CSF, GM-CSF und die Chemokine CCL1, CXCL11, KC sowie die anti-inflammatorischen Cytokine IL-4, IL-13, IL-27 und G-CSF. Weiterhin konnte für den Matrixmetalloproteinasen-Inhibitor TIMP-1 und für die lösliche Form des Zelladhäsionsproteins ICAM-1 (sICAM-1) in  $P0^{+/-}$  Mäusen ein gesteigerter Proteingehalt im Vergleich zu den Wildtypgruppen detektiert werden (Abb. 3.37). Der relative Proteingehalt der einzelnen Faktoren zeigte zwischen  $P0^{+/-}CCR2^{+/+}$  und  $P0^{+/-}CCR2^{-/-}$  Mäusen jedoch keine signifikanten Unterschiede.



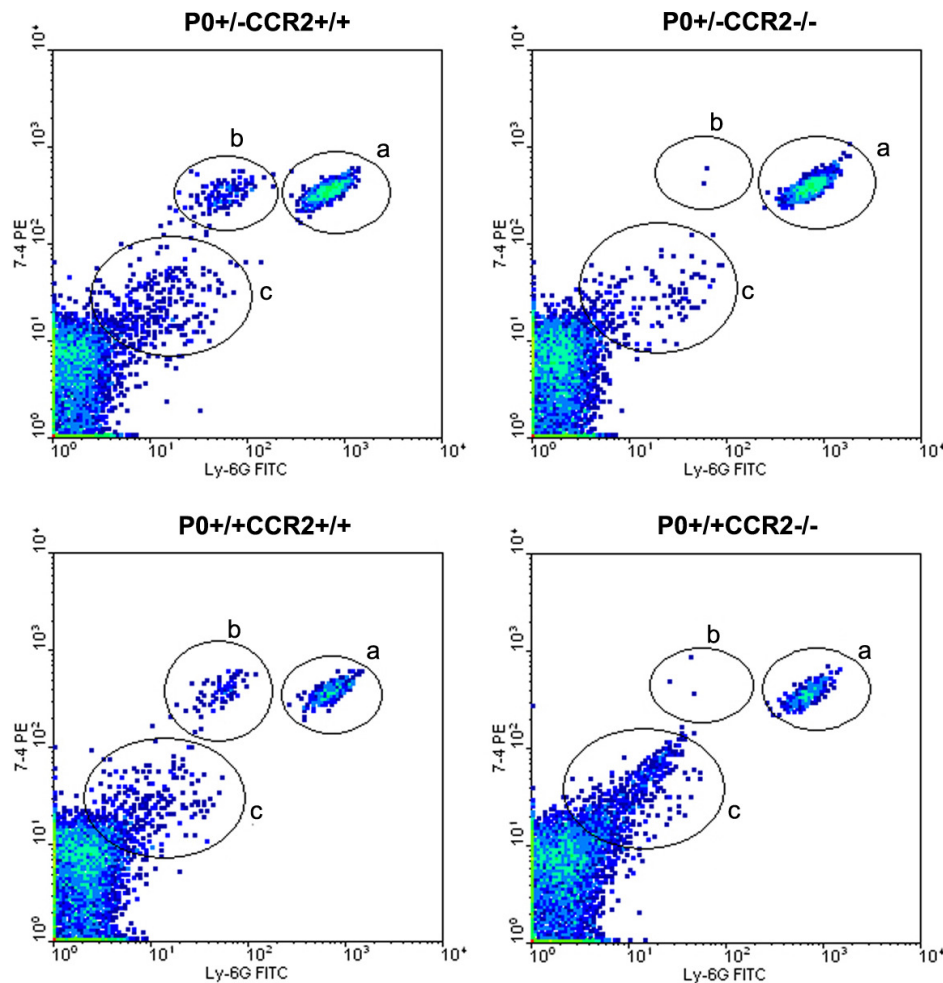
**Abbildung 3.37:** Auswahl der densitometrischen Analyse von Cytokinen, deren relativer Proteingehalt den Wert mit einer Pixeldichte von 10 überschreitet (basierend auf Abb. 3.36). Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardfehler.

### 3.6 Durchflusszytometrie (*Fluorescence-activated cell sorting* (FACS))

Es gibt Hinweise, dass es in CCR2-defizienten Mäusen zu einer verminderten Immigration von Monozyten in entzündliches Gewebe und somit zu einer verminderten Suszeptibilität für entzündliche Erkrankungen kommt, die durch eine Makrophagen-vermittelte Immunantwort ausgelöst werden können (Kuziel et al., 1997; Izikson et al., 2000). Die Analyse peripherer Blutproben mittels Durchflusszytometrie (FACS) sollte Aufschluss über die Zusammensetzung verschiedener Zellpopulationen in  $P0^{+/-}CCR2^{+/+}$  und  $P0^{+/-}CCR2^{-/-}$  Mäusen sowie den entsprechenden Wildtyp-Kontrollen geben. Hierzu wurde Mäusen peripheres Blut wie unter Punkt 2.9.7.1 beschrieben entnommen und die Leukozyten anschließend mit Antikörpern gegen die Oberflächenmoleküle F4/80 (Makrophagen), 7/4 (Neutrophile und Monozyten) und Ly-6G/Ly-6C (polymorphkernige Leukozyten) markiert. (siehe Kapitel 2.9.7.2). Die Detektion und Differenzierung der einzelnen Zellpopulationen erfolgte anhand der an die Antikörper gekoppelten Fluorochrome FITC, PE und APC. Die emittierten Floreszenzen wurden anschließend in einem Konturenprofil dargestellt und der prozentuale Anteil der jeweiligen Zellpopulation quantifiziert.

#### 3.6.1 Differenzierung und Quantifizierung hämatogener Leukozyten-Populationen

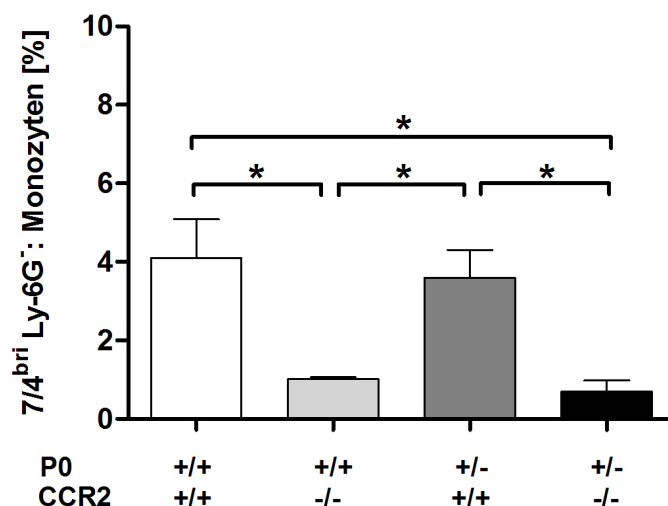
Die Auswertung der FACS-Analysen zeigte, dass die Färbung von murinen Leukozyten mit unterschiedlich gekoppelten Antikörpern gegen die Oberflächenantigene F4/80, 7/4 und Ly-6G eine Differenzierung in unterschiedliche Populationen möglich macht (Abb. 3.38). Es konnten folgende Zellpopulationen differenziert werden:  $7/4^{bri} Ly-6G^{-}$  (Neutrophile Granulozyten (Abb. 3.38-Fläche „a“)),  $7/4^{bri} Ly6G^{+}$  (Monozyten (Abb. 3.38-Fläche „b“)) und  $7/4^{dim} Ly6G^{-}$  (Mischpopulation aus Monozyten, T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen (Abb. 3.38-Fläche „c“)).



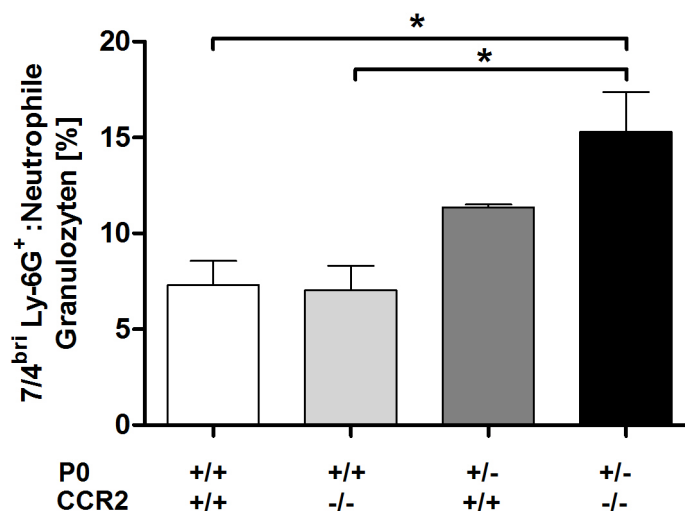
**Abbildung 3.38:** Darstellung eines FACS-Plots von Leukozyten, die gegen die Oberflächenmoleküle 7/4 und Ly-6G gefärbt wurden. Es ergeben sich drei Zellpopulationen: (a) Neutrophile Granulozyten ( $7/4^{\text{bri}} \text{ Ly6G}^+$ ), (b) Monozyten ( $7/4^{\text{bri}} \text{ Ly-6G}^-$ ), (c) Mischpopulation aus Monozyten, T-Zellen, NK-Zellen ( $7/4^{\text{dim}} \text{ Ly6G}^-$ ). Pro Blutprobe wurden 10.000 Zellen gezählt. In CCR2-defizienten Mäusen ist eine deutliche Monozytopenie (b) zu beobachten.

Bei CCR2-defizienten Mäusen konnte eine signifikante Reduktion ( $p < 0,05$ ) an  $7/4^{\text{bri}} \text{ Ly-6G}^-$  Monozyten im Vergleich zu CCR2-kompetenten Mäusen (Abb. 3.39) beobachtet werden. In  $\text{P0}^{+/-} \text{CCR2}^{+/+}$  Mäusen betrug der Anteil an Monozyten im peripheren Blut  $4,1 \pm 1,0 \%$ , bei  $\text{P0}^{+/-} \text{CCR2}^{+/-}$  Mäusen konnte ein Monozyten-Gehalt von  $3,6 \pm 0,7 \%$  gemessen werden. In  $\text{P0}^{+/+} \text{CCR2}^{+/+}$  Mäusen lag der Anteil an  $7/4^{\text{bri}} \text{ Ly-6G}^-$  Monozyten bei  $1,0 \pm 0,0\%$ , bei  $\text{P0}^{+/+} \text{CCR2}^{-/-}$  Mäusen konnte ein Monozyten-Gehalt von  $0,7 \pm 0,3\%$  quantifiziert werden.





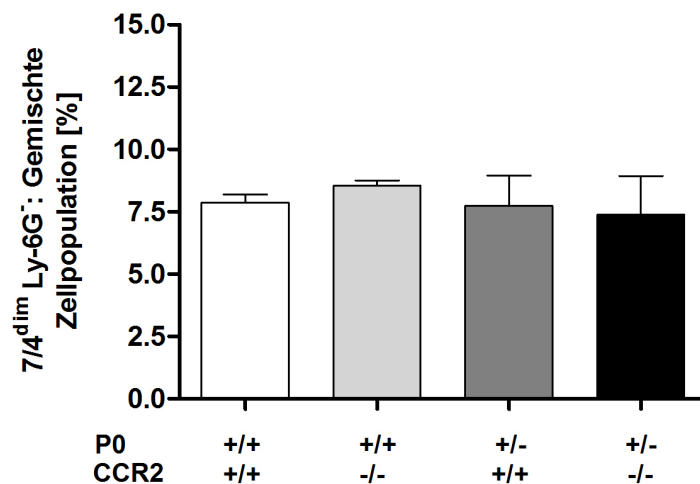
**Abbildung 3.39:** Quantifizierung von Monozyten (7/4<sup>bri</sup> Ly6G<sup>-</sup>) im peripheren Blut von P0/CCR2 Mäusen. CCR2-defiziente P0<sup>+/-</sup> und P0<sup>+/+</sup> Mäuse zeigen eine deutliche Monozytopenie im Vergleich zu den CCR2-kompetenten Kontrollen. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichung. Signifikanz nach ANOVA sowie Bonferroni *post-hoc*-Test. \* p < 0,05. pro Gruppe n = 2.



**Abbildung 3.40:** Quantifizierung neutrophiler Granulozyten (7/4<sup>bri</sup> Ly6G<sup>+</sup>) im peripheren Blut von P0/CCR2 Mäusen. P0<sup>+/-</sup>CCR2<sup>+/+</sup> als auch P0<sup>+/-</sup>CCR2<sup>-/-</sup> Mäuse zeigen eine deutliche Erhöhung neutrophiler Granulozyten im Vergleich zu beiden Wildtyp-Kontrollen. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichung. Signifikanz nach ANOVA sowie Bonferroni *post-hoc*-Test. \* p < 0,05. pro Gruppe n = 2.

Die Quantifizierung neutrophiler Granulozyten zeigte zwischen P0<sup>+/+</sup>CCR2<sup>+/+</sup> (7,3 ± 1,3%) und P0<sup>+/+</sup>CCR2<sup>-/-</sup> (7,0 ± 1,3%) Tieren keine Unterschiede (Abb. 3.40). Im Vergleich zu den beiden Wildtypkontrollen konnte in P0<sup>+/-</sup>CCR2<sup>+/+</sup> Tieren eine Zunahme an neutrophilen Granulozyten

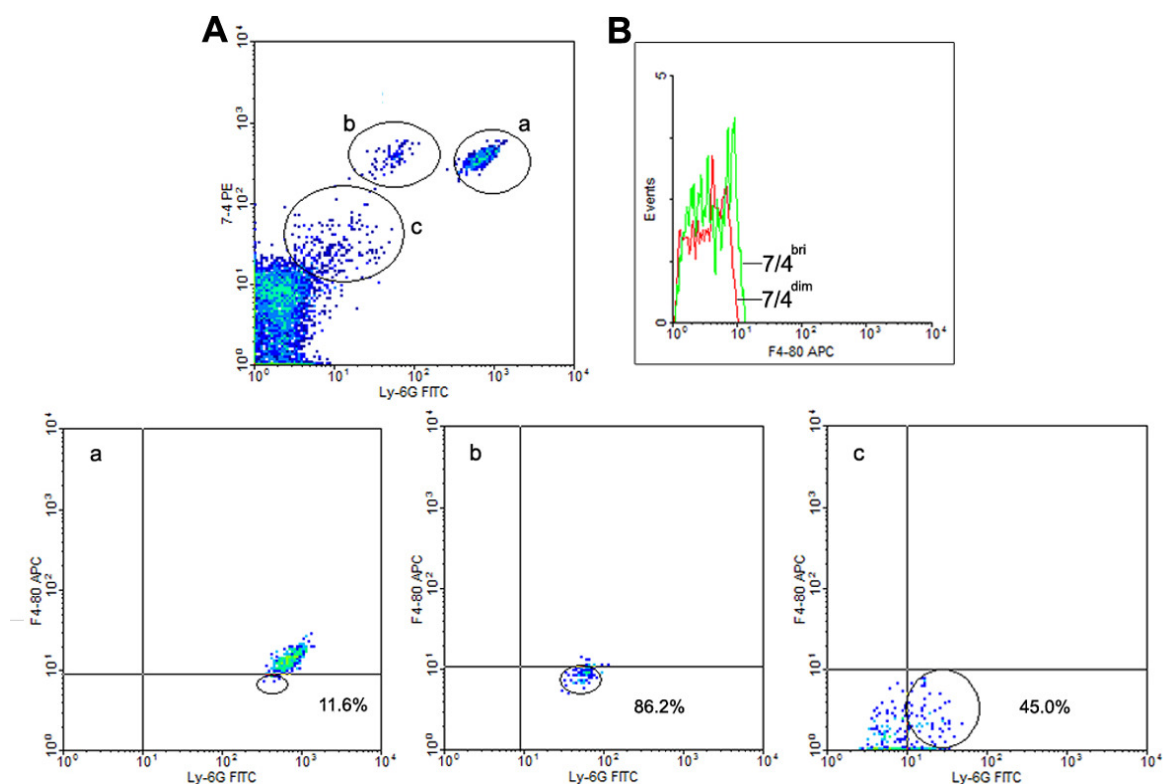
beobachtet werden; in  $P0^{+/-}CCR2^{-/-}$  Mäusen war die Anzahl neutrophiler Granulozyten im Vergleich zu den Wildtypmäusen zudem signifikant erhöht ( $p < 0,05$ ). Im peripheren Blut von  $P0^{+/-}CCR2^{+/+}$  Mäusen lag der Anteil an  $7/4^{bri} Ly-6G^{-}$  Zellen bei  $11,4 \pm 0,2$  %. In  $P0^{+/-}CCR2^{-/-}$  wurde der größte Anteil neutrophiler Granulozyten mit  $15,3 \pm 2,1$ % gemessen. Zwischen  $P0^{+/-}CCR2^{+/+}$  und  $P0^{+/-}CCR2^{-/-}$  Mäusen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.



**Abbildung 3.41:** Quantifizierung einer gemischten Zellpopulation aus Monozyten, T-Zellen, B-Zellen und NK-Zellen ( $7/4^{dim} Ly6G^{-}$ ) im peripheren Blut von  $P0/CCR2$  Mäusen.  $P0^{+/-}CCR2^{-/-}$  Mäuse zeigen als einzige Gruppe eine signifikante Zunahme an  $7/4^{dim} Ly6G^{-}$  Zellen im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung, pro Gruppe  $n=2$ .

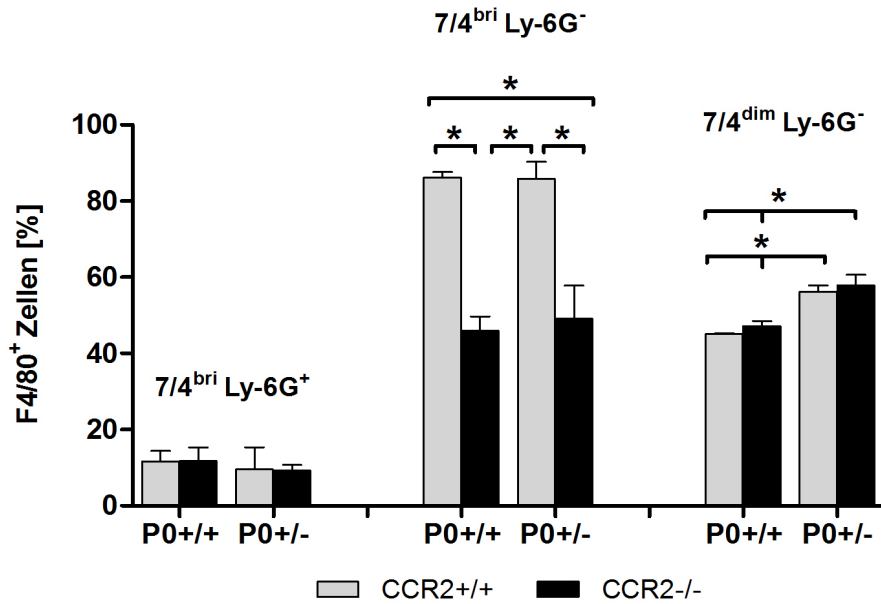
Der Anteil der gemischten Zellpopulation aus Monozyten, T-Zellen, B-Zellen und NK-Zellen ( $7/4^{dim} Ly6G^{-}$ ) zeigte keinen Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen (Abb. 3.41).  $7/4^{dim} Ly6G^{-}$  Zellen konnten zu  $7,9 \pm 0,3$  % im peripheren Blut von  $P0^{+/+}CCR2^{+/+}$  Mäusen nachgewiesen werden, bei  $P0^{+/+}CCR2^{-/-}$  Mäusen lag der Anteil bei  $8,6 \pm 0,2$  %. In  $P0^{+/-}CCR2^{+/+}$  Mäusen betrug der Anteil der gemischten Zellpopulation  $7,7 \pm 1,2$  %, in  $P0^{+/-}CCR2^{-/-}$  Mäusen konnten  $7,4 \pm 1,5$  % der Zellen detektiert werden.

Zur näheren Charakterisierung der einzelnen Zellpopulation wurde weiterhin die Expression des Oberflächenantigens F4/80 untersucht (Abb. 3.42).



**Abbildung 3.42:** A: Exemplarische Abbildung der einzelnen Leukozyten-Populationen in einer WT-Kontrolle. a-c: F4/80-Expression der einzelnen Zellpopulationen: (a)  $7/4^{bri}$  Ly6G<sup>+</sup>, (b)  $7/4^{bri}$  Ly-6G<sup>-</sup>, (c)  $7/4^{dim}$  Ly6G<sup>-</sup>. Werte geben den prozentualen Gehalt F4/80(+) Leukozyten innerhalb einer Population an. B: F4/80-Expression von  $7/4^{bri}$  Ly-6G<sup>-</sup> Monozyten und der  $7/4^{dim}$  Ly6G<sup>-</sup> gemischten Zellpopulation in Form eines Histogramms dargestellt.

Es konnte gezeigt werden, dass die  $7/4^{bri}$  Ly6G<sup>+</sup> Population in allen untersuchten Gruppen gleiche Mengen an F4/80(+) Zellen enthält (Abb. 3.43). In  $P0^{+/+}CCR2^{+/+}$  Mäusen lag der Anteil bei  $11,6 \pm 2,8$  %, in  $P0^{+/+}CCR2^{-/-}$  Mäusen betrug der Anteil F4/80(+) Zellen innerhalb der  $7/4^{bri}$  Ly6G<sup>+</sup> Population  $11,7 \pm 3,6$  %.  $P0^{+/-}CCR2^{+/+}$  Tiere zeigten einen Anteil an F4/80(+) Zellen von  $9,5 \pm 5,9$ %, bei  $P0^{+/-}CCR2^{-/-}$  Tieren konnte ein Anteil von  $9,2 \pm 1,5$  % F4/80(+) Zellen innerhalb der Zellpopulation gemessen werden.



**Abbildung 3.43:** prozentualer Anteil der F4/80-Expression innerhalb der einzelnen Zellpopulationen. 7/4<sup>bri</sup> Ly-6G<sup>-</sup> Zellen zeigen eine signifikante Reduktion F4/80(+) Monozyten in CCR2-defizienten Mäusen im Vergleich zu CCR2-kompetenten Mäusen. Der Anteil F4/80(+) Monozyten ist in der 7/4<sup>dim</sup> Ly6G<sup>-</sup> Population in P0<sup>+/-</sup> Mäusen im Vergleich zu den Wildtypkontrollen signifikant erhöht. Signifikanz nach ANOVA sowie Bonferroni *post-hoc*-Test. \* p < 0,05. pro Gruppe n = 2.

Die 7/4<sup>bri</sup> Ly-6G<sup>-</sup> Population zeigte für die F4/80-Expression einen signifikanten Unterschied (p < 0,05) zwischen CCR2-kompetenten und CCR2-defizienten Mäusen (Abb. 3.43), was mit einer Reduktion der Monozyten-Gesamtmenge im peripheren Blut einhergeht (vgl. Abb.3.39). Die Anzahl F4/80(+) Monozyten in der 7/4<sup>bri</sup> Ly-6G<sup>-</sup> Population von P0<sup>+/+</sup>CCR2<sup>+/+</sup> Mäusen lag bei 86,2 ± 1,4 % und war bei P0<sup>+/+</sup>CCR2<sup>-/-</sup> Mäusen um 46,8% reduziert. Hier lag der Anteil F4/80(+) Monozyten bei 45,9 ± 3,8 %. P0<sup>+/+</sup>CCR2<sup>-/-</sup> Tiere zeigten im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle eine Reduktion an F4/80(+) Monozyten um 43 %. Der Anteil F4/80(+) Monozyten innerhalb der 7/4<sup>bri</sup> Ly-6G<sup>-</sup> Population betrug bei P0<sup>+/-</sup>CCR2<sup>-/-</sup> Mäusen 49,1 ± 8,7 %, bei P0<sup>+/-</sup>CCR2<sup>+/+</sup> Mäusen 85,8 ± 4,5 %. P0<sup>+/-</sup>CCR2<sup>-/-</sup> Mäuse zeigten im Vergleich zu P0<sup>+/-</sup>CCR2<sup>+/+</sup> Mäusen eine signifikante Reduktion von 42,8 % an F4/80(+) Monozyten innerhalb der 7/4<sup>bri</sup> Ly-6G<sup>-</sup> Population.

Innerhalb der 7/4<sup>dim</sup> Ly6G<sup>-</sup> Population konnte eine signifikante Zunahme (p < 0,05) an F4/80(+) Zellen in P0<sup>+/-</sup> Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollen beobachtet werden. Bei P0<sup>+/-</sup> CCR2<sup>+/+</sup> Mäusen lag die Anzahl an F4/80(+) Zellen bei 56,1 ± 1,8 %, bei P0<sup>+/-</sup>CCR2<sup>-/-</sup> Mäusen betrug der Anteil 57,9 ± 2, 7%. In den P0<sup>+/+</sup>CCR2<sup>+/+</sup> Wildtyp-Mäusen bestand die 7/4<sup>dim</sup> Ly6G<sup>-</sup> Population zu 45,0 ± 0,3 % aus F4/80(+) Zellen, in P0<sup>+/+</sup>CCR2<sup>-/-</sup> Mäusen lag der Anteil bei 47,2 ± 1,3 %.

## 4 Diskussion

Hereditäre Neuropathien gehören mit einer Prävalenz von 1:2500 zu den am häufigsten vererbbaaren neurologischen Erkrankungen (Skre, 1974; Kleopa et al., 2002). Als Folge einer Mutationen in Genen, die für den Aufbau und den Erhalt der Myelinscheide wichtig sind, kommt es zur Demyelinisierung von Axonen sowie zu axonalem Verlust, der primär für die stark behindernden motorischen und sensiblen neurologischen Defizite verantwortlich ist (Suter et al., 2003; Edgar et al., 2004).

Studien in Tiermodellen für verschiedene Formen erblicher Neuropathien konnten zeigen, dass Immunzellen erheblich an der Pathogenese der experimentellen Neuropathie beteiligt sind (Martini et al., 2004).

Heterozygot-defiziente P0-Mäuse ( $P0^{+/-}$ ) weisen einen demyelinisierenden Phänotyp auf, der histopathologisch der humanen CMT1B-Erkrankung entspricht. Hier sind endoneurale Makrophagen aktiv an der Phagozytose von Myelinbestandteilen beteiligt (Carenini et al., 2001). Diese endoneuralen Makrophagen werden hauptsächlich intrinsisch durch die Proliferation residenter Makrophagen generiert (Maurer et al., 2003). Im Gegensatz dazu kommt es bei homozygot-defizienten P0-Mäusen ( $P0^{-/-}$ ), die einen schweren dysmyelinisierenden Phänotyp aufweisen, der histopathologisch der humanen Form des Dejerine-Sottas Syndroms entspricht, zu einem massiven Einstrom von Makrophagen aus dem Blutstrom (Berghoff et al., 2005).

Es wird angenommen, dass Schwann-Zellen aufgrund der genetisch bedingten Mutation in einem Myelin-assoziierten Gen wie P0 vermehrt Chemokine und Cytokine sezernieren, die zur Aktivierung und Rekrutierung von Makrophagen führen (Martini et al., 2008). Es konnte gezeigt werden, dass das Chemokin CCL2 sowohl *in vitro* als auch *in vivo* unter verschiedensten pathologischen Bedingungen durch Schwann-Zellen sezerniert wird und zur Aktivierung von Makrophagen führt (Toews et al., 1998; Tofaris et al., 2002; Kleinschnitz et al., 2004; Perrin et al., 2005). Weiterhin konnte CCL2 mit der Aktivierung von Makrophagen und der demyelinisierenden Neuropathie in  $P0^{+/-}$  Mäusen in Verbindung gebracht werden (Fischer et al., 2008). Der Rezeptor für CCL2 ist der CC Chemokin-Rezeptor CCR2 und wird von Monozyten, Makrophagen und aktivierten T-Zellen exprimiert (Luther et al., 2001; Viola et al., 2008). Welche Rolle CCR2 im

peripheren Nervensystem spielt ist weitestgehend ungeklärt. Traumatische oder toxische Neuropathie-Modelle deuten auf eine Beteiligung von CCR2 bei der Aktivierung und Rekrutierung von Makrophagen zum Entzündungsort hin (Siebert et al., 2000; Muller et al., 2008).

Durch die Kreuzung von CCR2-defizienten mit P0-defizienten Mäusen war es erstmals möglich, den Einfluss des Chemokinrezeptors CCR2 auf die Pathogenese des P0-defizienten Mausmodells einer hereditären Neuropathie zu untersuchen.

Neben der quantitativen Analyse von Makrophagen, T-Zellen und neutrophilen Granulozyten sowie der morphologischen Analyse der peripheren Nerven wurde die Expression verschiedener Cytokine und Chemokine, die möglicherweise durch den Einfluss von CCR2 reguliert werden, molekularbiologisch untersucht und weiterhin verschiedene Leukozyten-Populationen im Blut der Mausmutanten differenziert und quantifiziert. Zudem wurde der Einfluss von CCR2 auf die motorische Leistungsfähigkeit der Mäuse untersucht.

#### **4.1 Einfluss von CCR2 auf die motorische Leistungsfähigkeit P0-defizienter Mäuse**

Bei der Ermittlung der motorischen Leistungsfähigkeit auf dem Rotarod zeigten sich keine CCR2-abhängigen Unterschiede in P0<sup>+/-</sup> Mäusen. CCR2-kompetente sowie CCR2-defiziente P0<sup>+/-</sup> Tiere zeigten über einen Versuchszeitraum von sieben Tagen hinweg eine vergleichbare Steigerung der motorischen Leistung und unterschieden sich dabei nicht signifikant von altersgleichen Wildtyp-Kontrolltieren. Die eher milde Ausprägung der Neuropathie in P0<sup>+/-</sup> Mäusen führt demnach zu keiner schwerwiegenden Beeinträchtigung der motorischen Leistungsfähigkeit auf dem Rotarod. Da P0<sup>+/-</sup> Mäuse hinsichtlich der Nervenpathologie jedoch erhebliche Unterschiede zu Wildtypmäusen zeigen, ist es fraglich, ob der Rotarod-Test in diesem Fall sensitiv genug ist, um Unterschiede bezüglich der motorischen Funktion zu detektieren.

Im Vergleich zu P0<sup>+/-</sup> Mäusen sind P0<sup>-/-</sup> Mäuse in ihrer motorischen Leistungsfähigkeit stark eingeschränkt. Durch die schwer verlaufende Neuropathie können sich CCR2-defiziente sowie CCR2-kompetente P0<sup>-/-</sup> Mäuse nicht länger als durchschnittlich 90 sec auf der rotierenden Walze halten. Trotz des erheblichen Schweregrads der Neuropathie zeigte sich in P0<sup>-/-</sup>CCR2<sup>+/+</sup> und P0<sup>-/-</sup>

CCR2<sup>-/-</sup> Mäusen über einen Zeitraum von sieben Tagen hinweg eine stetige Zunahme der motorischen Leistung, allerdings konnten auch hier keine CCR2-abhängigen Effekte detektiert werden. Diese Beobachtungen korrelieren mit den Ergebnissen zur Untersuchung der Nervenpathologie (siehe Kapitel 4.2), da auch hier die CCR2-Defizienz zu keinen Unterschieden in P0<sup>-/-</sup> Mäusen führte. Demnach sind bei der Durchführung des Rotarod-Test mit P0<sup>-/-</sup>CCR2<sup>+/+</sup> und P0<sup>-/-</sup>CCR2<sup>-/-</sup> Mäusen keine Unterschiede zu erwarten. Die motorische Leistungsfähigkeit von P0<sup>-/-</sup> Mäusen war jedoch im Vergleich zu altersgleichen Wildtyp-Kontrolltieren zu jedem untersuchten Zeitpunkt signifikant verschlechtert.

Ein Zusammenhang zwischen der motorischen Leistungsfähigkeit und CCR2 wurde bisher in der Literatur nicht beschrieben. Ähnlich den Rotarod-Testungen in P0-defizienten Mäusen konnten Untersuchungen in einem neuropathischen Schmerzmodell zeigen, dass CCR2-defiziente Mäuse keine Beeinträchtigung bzw. Verbesserung der motorischen Koordination im Vergleich zu CCR2-kompetenten Mäusen zeigen (Abbadie et al., 2003). Diese Daten weisen darauf hin, dass CCR2 im Modell der experimentellen Neuropathien keinen Einfluss auf die motorischen Leistungsfähigkeiten ausübt.

## **4.2 Einfluss von CCR2 auf die Aktivierung und Rekrutierung von Makrophagen und die Ausprägung der Nervenpathologie in P0-defizienten Mausmodellen**

In Tiermodellen für hereditäre Neuropathien konnte gezeigt werden, dass Makrophagen und CD8+ T-Lymphozyten einen erheblichen Einfluss auf den Krankheitsverlauf der primär genetisch bedingten Erkrankungen haben (Wang Ip et al., 2006). Sowohl in P0<sup>+/-</sup> Mäusen als auch in Cx32-defizienten Mäusen, dem Tiermodell für die humane CMT1X Erkrankung sind Makrophagen bereits ab dem dritten Lebensmonat in erhöhter Anzahl in den peripheren Nerven der Tiere vorzufinden (Carenini et al., 2001; Kobsar et al., 2002). Dagegen ist eine erhöhte Anzahl endoneuraler T-Lymphozyten erst ab dem sechsten Lebensmonat detektierbar (Schmid et al., 2000; Carenini et al., 2001; Kobsar et al., 2002). Die demyelinisierende Neuropathie in P0<sup>+/-</sup> Mäusen

sowie die Dysmyelinisierung in  $P0^{-/-}$  Mäusen betrifft ausschließlich motorische Nervenfasern (Martini, 1997; Samsam et al., 2002).

Untersuchungen in  $P0^{+/-}$  Mäusen konnten das Chemokin CCL2 als einen wichtigen Mediator zwischen der demyelinisierenden Neuropathie und der Aktivierung von Makrophagen identifizieren (Fischer et al., 2008). In der vorliegenden Arbeit sollte geklärt werden, welchen Einfluss der für das Chemokin CCL2 spezifische Rezeptor CCR2 auf die Aktivierung endoneuraler Makrophagen in peripheren Nerven  $P0$ -defizienter Mäuse hat.

Da die Ausprägung der Neuropathie von der Anzahl motorischer Axone im jeweiligen Nerv abhängt, ist der motorische Ast des N. femoralis (N. quadriceps femoris) mit einer Vielzahl an motorischen Axonen stärker betroffen, als der sensible Ast des N. femoralis (N. saphenus femoris). Obwohl sich in  $P0^{+/-}CCR2^{+/+}$  und  $P0^{+/-}CCR2^{-/-}$  Mäusen eine altersabhängige Zunahme endoneuraler Makrophagen im N. quadriceps femoris beobachten lässt, konnten zu keinem Zeitpunkt CCR2-abhängige Unterschiede in der Anzahl sowie in der Morphologie endoneuraler Makrophagen detektiert werden. Im N. saphenus femoris konnte in  $P0^{+/-}CCR2^{+/+}$  und  $P0^{+/-}CCR2^{-/-}$  Mäusen nur eine geringe Anzahl endoneuraler Makrophagen quantifiziert werden, die sich über einen Zeitraum von zwölf Monaten hinweg nicht veränderte. Die Anzahl endoneuraler Makrophagen im N. saphenus femoris von  $P0^{+/-}$  Mäusen entsprach der Zellzahl in den Wildtypkontrollen. Ähnliche Beobachtungen im N. saphenus femoris wurden bereits in  $P0^{+/-}$  Mäusen beschrieben (Carenini et al., 2001; Fischer et al., 2008).

Die Beobachtungen im N. quadriceps femoris lassen darauf schließen, dass CCR2 keinen Effekt auf die Aktivierung endoneuraler Makrophagen in  $P0^{+/-}$  Mäusen hat. Mäuse, in denen CCR2 inaktiviert ist zeigen ein Defizit in der Rekrutierung von Monozyten und Makrophagen zum Ort einer Entzündung oder Verletzung (Boring et al., 1997; Kuziel et al., 1997). Im Gegensatz zu inflammatorischen Krankheitsmodellen, in denen es zu einem starken Einstrom von Immunzellen aus dem Blutstrom kommt, wird die endoneurale Makrophagen-Antwort im  $P0^{+/-}$  Mausmodell hauptsächlich intrinsisch durch die Proliferation residenter Makrophagen reguliert (Maurer et al., 2003). Demnach würde sich ein Effekt von CCR2 auf die hämatogene Rekrutierung von Makrophagen im  $P0^{+/-}$  Mausmodell weniger deutlich bemerkbar machen.



Im Gegensatz dazu wird die endoneurale Makrophagen-Antwort in  $P0^{-/-}$  Mäusen nicht intrinsisch sondern durch einen massiven Einstrom hämatogener Makrophagen generiert (Berghoff et al., 2005). Folglich sind  $P0^{-/-}$  Mäuse ein geeignetes Modell um den Einfluss von CCR2 auf die endoneurale Infiltration von Makrophagen hämatogenen Ursprungs zu studieren. Durch die homozygote  $P0$ -Defizienz zeigen die Mäuse einen schweren pathologischen Phänotyp, der durch dysmyelinisierte Axone und axonalen Verlust in distalen Nervenendigungen charakterisiert ist (Martini et al., 1995). Im Alter von sechs Monaten konnte in CCR2-defizienten  $P0^{-/-}$  Mäusen ein signifikanter Rückgang an endoneuralen Makrophagen im N. plantaris im Vergleich zu CCR2-kompetenten  $P0^{-/-}$  Mäusen beobachtet werden. Demnach kann angenommen werden, dass CCR2 wichtig für die endoneurale Akkumulation von hämatogenen Makrophagen ist. Ähnliche Beobachtungen konnten in einem toxischen Neuropathie-Modell gemacht werden. Hier zeigten CCR2-defiziente Mäuse eine deutliche Reduktion endoneuraler Makrophagen in distalen Nervenendigungen, wo hämatogene Makrophagen in das Endoneurium einwandern (Muller et al., 2008).

In Modellen für entzündliche Erkrankungen des Nervensystems kann durch die verminderte Rekrutierung von Monozyten und Makrophagen zum Entzündungsherd der Krankheitsverlauf in CCR2-defizienten Mäusen positiv beeinflusst werden. Es konnte gezeigt werden, dass durch eine CCR2-Defizienz die Ausbildung der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE), dem Tiermodell der Multiplen Sklerose durch den verminderten Einstrom von T-Zellen und Monozyten und damit die Bildung von Läsionen im Gehirn und Rückenmark beeinträchtigt ist (Fife et al., 2000; Izikson et al., 2000). Die Induktion und der Schweregrad der EAE kann allerdings vom genetischen Hintergrund CCR2-defizienter Mäuse abhängig sein (Gaupp et al., 2003). In der Studie von Gaupp et al. konnte zudem gezeigt werden, dass neutrophile Granulozyten durch die CCR2-Defizienz vermehrt aktiviert werden und möglicherweise die Funktion der im Blut zurückgehaltenen Monozyten und T-Lymphozyten kompensatorisch übernehmen können.

CCR2-defiziente Mäuse zeigen im ischämischen Schlaganfall-Modell durch eine verminderte Infiltration von Monozyten und neutrophilen Granulozyten kleinere Infarkt volumina (Dimitrijevic et al., 2007). Im peripheren Nervensystem kann bei einer experimentellen Nervenverletzung aufgrund der CCR2-Defizienz und des eingeschränkten Einstroms von Makrophagen zum Ort der

Verletzung eine verminderte Phagozytose-Aktivität von Myelin-Bestandteilen beobachtet werden (Siebert et al., 2000). Zudem kann die CCR2-Defizienz im toxischen Neuropathie-Modell zur Reduktion endoneuraler Makrophagen in distalen, jedoch nicht proximalen Nervenabschnitten führen, was eine Beteiligung von CCR2 bei der Rekrutierung von Makrophagen an distalen Nervenendigungen vermuten lässt (Muller et al., 2008). Die Inaktivierung von CCR2 führt allerdings nicht nur zur Ausprägung neuroprotektiver Eigenschaften. In CCR2-defizienten Mäusen kann weder das Fortschreiten der striatalen Neurodegeneration im Mausmodell für die Parkinson-Erkrankung verhindert werden noch ist eine Verbesserung des Krankheitsverlaufes in Mausmodellen für die Alzheimer-Erkrankung möglich (El Khoury et al., 2007; Kalkonde et al., 2007).

Obwohl in CCR2-defizienten  $P0^{+/-}$  Mäusen keine signifikante Veränderung in der Anzahl endoneuraler Makrophagen zu beobachten war, zeigten elektronenmikroskopische Untersuchungen des N. quadriceps femoris, dass die CCR2-Defizienz in  $P0^{+/-}$  Mäusen zu einer geringen Zunahme morphologisch aktivierter Makrophagen führt, die mit Myelindebris beladen sind. Phagozytierende Makrophagen konnten sporadisch auch innerhalb der Schwann-Zell-eigenen Basallamina, innerhalb einzelner Nervenfasern beobachtet werden. Die Anzahl dieser Makrophagen war in CCR2-defizienten  $P0^{+/-}$  Mäusen im Vergleich zu CCR2-kompetenten Mäusen ebenfalls erhöht, erreichte jedoch nur ein niedrig signifikantes Niveau. Die Zunahme morphologisch aktivierter Makrophagen in CCR2-defizienten Mäusen lässt auf eine erhöhte Phagozytose von Myelin-Bestandteilen schließen, die zu einer Zunahme der pathologischen Veränderung führen kann. Die Quantifizierung demyelinisierter Axone im N. quadriceps femoris zeigte, dass die Anzahl an demyelinisierten Axonen in  $P0^{+/-}CCR2^{-/-}$  im Vergleich zu  $P0^{+/-}CCR2^{+/+}$  Mäusen signifikant erhöht war. Die Quantifizierung von Axonen mit Zwiebelschalenbildung, die durch eine übermäßige Proliferation von Schwann-Zellen zustande kommen und im histopathologischen Erscheinungsbild von  $P0^{+/-}$  Mäusen beobachtet werden können, zeigte in CCR2-defizienten Mäusen eine geringe, jedoch nicht signifikante Zunahme. Bezüglich der Anzahl dünn-myelinisierter Axone konnten keine Unterschiede zwischen  $P0^{+/-}CCR2^{-/-}$  und  $P0^{+/-}CCR2^{+/+}$  Mäusen beobachtet werden. Diese Daten lassen insgesamt darauf schließen, dass CCR2 einen protektiven Effekt durch die Reduktion und Kontrolle der Makrophagen-Aktivierung und damit auf die Demyelinisierung in  $P0^{+/-}$  Mäusen vermittelt.

Ähnliche Beobachtungen konnten in  $P0^{+/-}$  Mäusen gemacht werden, in denen der CCR2-Ligand CCL2 inaktiviert war. Die homozygote CCL2-Inaktivierung führt zwar zu einer Reduktion endoneuraler Makrophagen im N. quadriceps femoris, allerdings kann ähnlich wie in CCR2-defizienten  $P0^{+/-}$  Mäusen im Alter von zwölf Monaten eine Zunahme an phagozytierenden Makrophagen sowie eine Zunahme der demyelinisierenden Nervenpathologie in ventralen Spinalwurzeln beobachtet werden (Fischer et al., 2008). Weiterhin konnte in  $P0^{+/-}CCL2^{-/-}$  Mäusen eine erhöhte Genexpression der pro-inflammatorischen Cytokine M-CSF und  $TNF-\alpha$  detektiert werden. Im Gegensatz dazu ist die Anzahl endoneuraler Makrophagen in heterozygot CCL2-defizienten  $P0^{+/-}$  Mäusen erheblich reduziert und führt zu einer deutlichen Verbesserung der demyelinisierenden Nervenpathologie (Fischer et al., 2008). Die Mechanismen der CCL2-Regulation und die unterschiedlichen Auswirkungen auf die Nervenpathologie sind bisher noch nicht geklärt. Da der Schweregrad der Demyelinisierung in CCL2-defizienten  $P0^{+/-}$  Mäusen stärker ausgeprägt ist als in CCR2-defizienten  $P0^{+/-}$  Mäusen lassen diese Beobachtungen vermuten, dass CCL2 über einen alternativen, CCR2-unabhängigen Mechanismus wirksam wird. Weitere Chemokinrezeptoren konnten bisher für CCL2 in  $P0^{+/-}$  Mäusen nicht identifiziert werden.

Im Gegensatz zu demyelinisierenden  $P0^{+/-}$  Mäusen führt die genetisch bedingte Neuropathie in  $P0^{-/-}$  Mäusen innerhalb der ersten drei Lebensmonate bereits zu einem massiven Verlust an Axonen (Samsam et al., 2003), der sowohl in CCR2-kompetenten als auch in CCR2-defizienten  $P0^{-/-}$  Mäusen im Vergleich zu den Wildtypkontrollen beobachtet werden konnte. Obwohl die CCR2-Defizienz in  $P0^{-/-}$  Mäusen zu einer signifikanten Reduktion endoneuraler Makrophagen führt, konnten keine Unterschiede bezüglich der Anzahl an Axonen in  $P0^{-/-}CCR2^{+/+}$  und  $P0^{-/-}CCR2^{-/-}$  Mäusen beobachtet werden. Folglich hat eine Reduktion endoneuraler Makrophagen keinen Einfluss auf die Ausprägung der Nervenpathologie in  $P0^{-/-}$  Mäusen, was eine untergeordnete Rolle von Makrophagen in der Pathogenese dieser experimentellen Neuropathie vermuten lässt. Da in Kreuzungsexperimenten mit RAG-1-defizienten Mäusen gezeigt werden konnte, dass ein Verlust an reifen T- und B-Zellen zu einem verstärkten Einstrom von Makrophagen führt und den axonalen Schaden zudem verschlimmert, ist eine Beteiligung endoneuraler T-Lymphozyten bei der Sekretion neurotoxischer Faktoren vermutlich auszuschließen (Berghoff et al., 2005). Es ist somit weiterhin fraglich, welche Faktoren zur Progression des Nervenschadens führen. Bis zum jetzigen Zeitpunkt

gibt es keine Daten über den Einfluss von CCL2 oder M-CSF in  $P0^{-/-}$  Mäusen und auch keine Hinweise auf die Beteiligung anderer inflammatorischer Cytokine und Chemokine, die in der Pathogenese von  $P0^{-/-}$  Mäusen eine Rolle spielen könnten.

### 4.3 Einfluss von CCR2 auf die Expression inflammatorischer Cytokine und Chemokine

Chemokine haben einen entscheidenden Einfluss auf die Aktivität und Funktion von Immunzellen und können dadurch zahlreiche zelluläre Prozesse beeinflussen (Mackay, 2001). Studien in heterozygot-defizienten  $P0$ -Mäusen konnten das Chemokin CCL2 als einen wichtigen pathogenetischen Faktor in peripheren Nerven dieser Tiere identifizieren (Fischer et al., 2008). Der CCL2-Rezeptor CCR2 ist ein promiskuitiver Rezeptor, der neben der Interaktion mit CCL2 auch durch andere Chemokine aktiviert bzw. inaktiviert werden kann (Rot et al., 2004; Allen et al., 2007). Es ist denkbar, dass durch die CCR2-Defizienz die Expression anderer Cytokine moduliert wird, die im Gegenzug die Aktivierung von Makrophagen beeinflussen können. Um diese Möglichkeit zu klären, wurde die mRNA Expression der pro-inflammatorischen Cytokine  $TNF-\alpha$ , M-CSF, CCL2 und Interleukin 6 (IL-6) sowie des anti-inflammatorischen Interleukins 10 (IL-10) in Nervenlysaten des N. quadriceps femoris von zwölf-Monate alten  $P0^{+/-}CCR2^{+/+}$  und  $P0^{+/-}CCR2^{-/-}$  Mäusen mittels quantitativer *Realtime*-PCR untersucht. Die Expression von  $TNF-\alpha$ , CCL2 und IL-6 war im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle sowohl in  $P0^{+/-}CCR2^{+/+}$  als auch in  $P0^{+/-}CCR2^{-/-}$  Mäusen reguliert, zeigte aber keine signifikanten CCR2-abhängigen Unterschiede.

Die Expression von  $TNF-\alpha$  war in  $P0^{+/-}CCR2^{-/-}$  Mäusen im Vergleich zur Wildtypgruppe 3,9-fach erhöht, in  $P0^{+/-}CCR2^{+/+}$  Mäusen konnte eine 5,3-fache Zunahme der  $TNF-\alpha$  Expression ermittelt werden.  $TNF-\alpha$  wird in verletzten Nerven vor allem durch Schwann-Zellen exprimiert (Shamash et al., 2002) und kann selektiv die weitere Rekrutierung und Aktivierung von Makrophagen begünstigen (Liefner et al., 2000). Ebenso wie in CCR2-defizienten  $P0^{+/-}$  Mäusen zeigen CCL2-defiziente  $P0^{+/-}$  Mäuse eine Zunahme der  $TNF-\alpha$  mRNA Expression (Fischer et al., 2008).

Neben  $TNF-\alpha$  wird das pro-inflammatorische Chemokin CCL2 von Schwann-Zellen exprimiert und ist maßgeblich an der Aktivierung von Makrophagen beteiligt (Toews et al., 1998; Tofaris et

al., 2002; Kleinschnitz et al., 2004). In  $P0^{+/-}$  Mäusen konnte gezeigt werden, dass CCL2 bereits in erhöhtem Maße von Schwann-Zellen exprimiert wird, bevor die demyelinisierenden Eigenschaften der Neuropathie in Erscheinung treten (Fischer et al., 2008). In CCR2-defizienten  $P0^{+/-}$  Mäusen zeigt die CCL2-Expression eine 3,8-fache Regulation in Bezug zur Wildtyp-Kontrolle und ist damit vergleichsweise stark reguliert wie die CCL2-Expression in CCR2-kompetenten  $P0^{+/-}$  Mäusen, die eine 4,6-fache Expression in Relation zur Wildtypkontrolle zeigen. Die CCR2-Defizienz hat demzufolge keine Auswirkungen auf die Expression des CCR2-Liganden CCL2 und lässt einen alternativen Wirkungsmechanismus von CCL2 vermuten. Interaktionen von CCL2 mit eher atypischen „Scavenger“-Chemokinrezeptoren wie D6 und DARC wurden bereits beschrieben, es ist jedoch nicht geklärt wie sich deren Interaktion auf die Aktivierung und Rekrutierung von Makrophagen verhält (Fra et al., 2003; Nibbs et al., 2003; Comerford et al., 2007).

Das von Schwann-Zellen bei einer peripheren Nervenverletzung exprimierte Cytokin Interleukin 6 (IL-6) kann in Kooperation mit Cytokinen wie  $TNF-\alpha$  zur Induktion weiterer pro-inflammatorischer Cytokine führen und den demyelinisierenden Prozess weiter beeinflussen (Grothe et al., 2000; Lee et al., 2009). IL-6 kann bei einer peripheren Nervenverletzung auch von Makrophagen generiert werden und kann zudem durch den Einfluss von  $TNF-\alpha$  oder Interleukin-1 $\beta$  weiter reguliert werden (Bolin et al., 1995; Bourde et al., 1996; Hirota et al., 1996). Die Expression von IL-6 zeigte bei  $P0^{+/-}CCR2^{+/+}$  Mäusen eine 1,4-fache in Bezug zur Wildtypkontrolle. Bei  $P0^{+/-}CCR2^{-/-}$  Tieren konnte eine 1,5-fache Zunahme der IL-6 Expression im N. quadriceps femoris ermittelt werden. Da  $TNF-\alpha$  als ein Regulator für die IL-6 Expression fungieren kann, ist es denkbar, dass die erhöhte Konzentration an  $TNF-\alpha$  in CCR2-kompetenten sowie CCR2-defizienten  $P0^{+/-}$  Mäusen eine Induktion der IL-6 mRNA Expression bewirkt.

Das pro-inflammatorische Cytokin M-CSF reguliert die Entwicklung und Funktion vieler monozytischer Zellen und ist bei der Proliferation und Aktivierung von Mikroglia im ZNS und Makrophagen im peripheren Nerv beteiligt (Kalla et al., 2001; Chitu et al., 2006). M-CSF konnte in  $P0^{+/-}$  Mäusen als ein wichtiger Faktor für die Aktivierung pathogenetisch relevanter Makrophagen identifiziert werden, da die Inaktivierung des M-CSF Gens zu einer verzögerten Demyelinisierung in peripheren Nerven und ventralen Spinalwurzeln führte (Carenini et al., 2001). Durch den Transfer von Knochenmark aus transgenen gfp (*green fluorescence protein*)-Mäusen in M-CSF-defiziente  $P0^{+/-}$  Mäuse konnte gezeigt werden, dass M-CSF hauptsächlich die Proliferation

residenter Makrophagen vermittelt und weniger an einem Einstrom von Makrophagen aus dem Blutstrom in den Nerven beteiligt ist (Muller et al., 2007). Von welchem Zelltyp die M-CSF-Produktion letztendlich ausgeht, konnte bisher nicht eindeutig geklärt werden. Als mögliche Quelle für die Sekretion von M-CSF kommen Schwann-Zellen in Frage, wie in-vitro Studien mit der Schwannoma Zelllinie RN22 zeigen konnten (Martini et al., 2008). Ebenso möglich ist die M-CSF Sekretion von endoneuralen Fibroblasten, die in  $P0^{+/-}$  Mäusen oft in nahem Kontakt zu endoneuralen Makrophagen vorgefunden werden können (Maurer et al., 2003). Ähnlich der Situation im Knochengewebe, wo M-CSF sezernierende Fibroblasten-ähnliche Zellen (Osteoblasten) benachbarte Osteoklasten aktivieren können (Teitelbaum, 2000) wäre durch die parakrine Sekretion von M-CSF somit eine direkte Aktivierung von Makrophagen möglich. Die M-CSF mRNA-Expression zeigte in N. quadriceps femoris von  $P0^{+/-}CCR2^{+/+}$  Mäusen eine 0,9-fache Zunahme gegenüber der Wildtypkontrolle. Überraschenderweise konnte in  $P0^{+/-}CCR2^{-/-}$  Mäusen eine Deregulation (-0,1-fach) der M-CSF mRNA im Vergleich zu  $P0^{+/-}CCR2^{+/+}$  Mäusen beobachtet werden. In Anbetracht der verschlimmerten Nervenpathologie und der Zunahme an aktivierten Makrophagen in CCR2-defizienten  $P0^{+/-}$  Mäusen würde man hier eher einen Anstieg der M-CSF Expression erwarten. Dies lässt vermuten, dass durch die CCR2-Defizienz die Expression weiterer inflammatorischer Cytokine oder Rezeptoren beeinflusst wird, die sich dann negativ auf die Expression von M-CSF auswirken kann. Ein möglicher Faktor ist der Hormonrezeptor PPAR- $\gamma$  (Peroxisom Proliferator Aktivierter Rezeptor- $\gamma$ ), der u.a. die transkriptionelle Regulation von M-CSF und GM-CSF beeinflussen kann, wie es in murinen Modellen für Arteriosklerose oder alveolärer Proteinose gezeigt werden konnte (Ditiatkovski et al., 2006; Bonfield et al., 2008). In der vorliegenden Arbeit wurde das Expressionsprofil von PPAR- $\gamma$  nicht untersucht. CCL2-defiziente  $P0^{+/-}$  Mäuse zeigen im Gegensatz zu CCR2-defizienten  $P0^{+/-}$  Mäusen eine Zunahme der M-CSF mRNA Expression (Fischer et al., 2008). Da M-CSF ein wichtiger Faktor für die Aktivierung von Makrophagen in  $P0^{+/-}$  Mäusen ist, würde dies erklären, warum die CCL2-Defizienz in  $P0^{+/-}$  Mäusen zu einer stärkeren Zunahme der demyelinisierenden Nervenpathologie führt als sie in CCR2-defizienten  $P0^{+/-}$  Mäusen zu beobachten ist.

Weiterhin spielt die Expression des anti-inflammatorischen Cytokins Interleukin-10 in peripheren Nerven eine wichtige Rolle. Traumatische Neuropathie-Modelle zeigen unmittelbar nach einer Nervenverletzung eine vermehrte Expression von IL-10, die auch noch zu späteren Zeitpunkten in

erhöhtem Maße in distalen Nervensegmenten vorgefunden werden kann (Taskinen et al., 2000; Sawada et al., 2007). Obwohl Schwann-Zellen und Fibroblasten IL-10 in unverletzten Nerven exprimieren können, sind hauptsächlich Makrophagen für die IL-10 Sekretion im verletzten Nerven verantwortlich und unterliegen durch die autokrine Sekretion einer negativen Regulation (George et al., 2004). Im N. quadriceps femoris zwölf Monate alter  $P0^{+/-}CCR2^{+/+}$  Mäusen ist die mRNA Expression von IL-10 im Vergleich zu  $P0^{+/-}CCR2^{-/-}$  Mäusen signifikant erhöht und zeigt eine 2,3-fache Zunahme in Relation zur Wildtypkontrolle. Dagegen ist die IL-10 Expression in  $P0^{+/-}CCR2^{-/-}$  Mäusen um den Faktor 0,4 herunter reguliert. Es ist bekannt, dass Makrophagen als Reaktion auf verschiedene Stimuli durch Cytokine polarisieren und unterschiedliche funktionelle Eigenschaften akquirieren können (Mantovani et al., 2004). Eine Stimulation von Makrophagen durch IL-10 induziert die Polarisation sog. „M2c“-Makrophagen, die mit der Suppression von Immunantworten sowie der Reorganisation verschiedener Gewebetypen in Verbindung gebracht werden (Mantovani et al., 2004). Demnach ist es möglich, dass die erhöhte IL-10 Expression in  $P0^{+/-}CCR2^{+/+}$  Mäusen eine zusätzliche Makrophagen-Aktivierung supprimiert und dadurch eine vermehrte Demyelinisierung verhindert wird, wie sie in  $P0^{+/-}CCR2^{-/-}$  Mäusen zu beobachten ist.

Die durch eine CCR2-Defizienz hervorgerufene, mögliche Regulation von pro- und anti-inflammatorischen Cytokinen und Chemokinen wurde weiterhin auf Proteinebene untersucht. Mithilfe eines *Proteome Profiler*<sup>™</sup> Cytokin Assays wurde der relative Proteingehalt von 40 ausgewählten Faktoren in Nervenlysaten des N. quadriceps femoris von zwölf Monate alten  $P0^{+/-}$  und  $P0^{+/+}$  Mäusen analysiert. Die Verwendung des Cytokin Assays bietet eine gute Möglichkeit um einen Überblick über die Regulation vieler Cytokine zu erhalten. Allerdings können die oft geringen Mengen eines Cytokins innerhalb einer Probe aufgrund der geringen Sensitivität des Assays nur begrenzt detektiert werden. Die Untersuchungen mit Lysaten aus Nervengewebe können im Vergleich zu in-vitro Studien zudem einen relativ hohen Hintergrund erzeugen, der durch die Gesamtheit aller extrahierten Proteine eines Nerven zustande kommen kann.

Im N. quadriceps femoris von  $P0^{+/-}$  Mäusen konnte eine Regulation vieler Cytokine und Chemokine im Vergleich zu den Wildtypkontrollen beobachtet werden. In  $P0^{+/-}CCR2^{+/+}$  sowie  $P0^{+/-}CCR2^{-/-}$  Mäusen konnte eine Zunahme des Komplementfaktors C5a, der pro-inflammatorischen Cytokine IL-3, IL-7, IL-13, IL-17, Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), M-CSF, GM-CSF und Chemokine

CCL1, CXCL11, KC beobachtet werden. Weiterhin zeigte sich eine Zunahme des relativen Proteingehalts der anti-inflammatorischen Cytokine IL-4, IL-13, IL-27 und G-CSF im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollen. Zwischen CCR2-defizienten und CCR2-kompetenten  $P0^{+/-}$  Mäusen konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede detektiert werden.

In  $P0^{+/-}$  Mäusen zeigt sich neben einem hohen Proteingehalt für die pro-inflammatorischen Cytokine IFN- $\gamma$  und KC eine auffällige Zunahme des Matrixmetalloproteasen-Inhibitors TIMP-1 und der löslichen Form des Zelladhäsionsproteins ICAM-1 (sICAM-1). TIMP-Proteine (*tissue inhibitor of metalloproteinases*) können die Aktivität von Matrix-Metalloproteinasen regulieren und sind somit entscheidend an der Aufrechterhaltung der extrazellulären Matrix im gesunden als auch pathologisch veränderten Gewebe verantwortlich (Visse et al., 2003). Eine verstärkte Expression der Matrix-Metalloproteinase MMP-9 kann zu Beginn einer peripheren Nervenverletzung nachgewiesen werden, folglich zu einem Zeitpunkt, an dem es zum Zusammenbruch der Blut-Nerven-Schranke und zur verstärkten Rekrutierung von Makrophagen kommt (Siebert et al., 2001). Die gesteigerten Proteinwerte für TIMP-1 in  $P0^{+/-}$  Mäusen, die durch die CCR2-Defizienz nicht beeinträchtigt sind, sprechen für eine negative Regulation der MMP-9-Aktivität und unterbinden somit womöglich eine Reorganisation der extrazellulären Matrix, die aufgrund einer Mutation im P0-Gen bereits strukturellen Änderungen unterliegen könnte.

Die lösliche Form des Adhäsionsproteins ICAM-1 (*soluble Intracellular Adhesion Molecule-1*) wird u.a. von hämatopoetischen Zellen sezerniert und kann in erhöhter Konzentration bei kardiovaskulären und autoimmunen Erkrankungen im Serum von Patienten vorgefunden werden (Lawson et al., 2009). sICAM-1, das von der Zelloberfläche von Endothelzellen und Fibroblasten sezerniert wird, kann durch pro-inflammatorische Cytokine wie TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  induziert werden (Fonsatti et al., 1997; Leung, 1999). Das zirkulierende Adhäsionsprotein sICAM bindet kompetitiv an die ICAM-Liganden LFA-1 und an Mac-1 (CD11b/CD18) und kann dadurch die Adhäsion von Leukozyten an das Gefäßepithel und folglich die Rekrutierung zum inflammatorischen Gewebe verhindern, wie in einem ischämischen Schlaganfall-Modell gezeigt werden konnte (Rieckmann et al., 1996; Kusterer et al., 1998). Die relative Konzentration von sICAM war in  $P0^{+/-}$ -CCR2 $^{+/+}$  Mäusen (28-fach) und in  $P0^{+/-}$ -CCR2 $^{-/-}$  Mäusen (22,8-fach) im Vergleich zu den Wildtypkontrollen deutlich gesteigert. Unabhängig von CCR2 ist es demnach denkbar, dass TNF- $\alpha$  vermittelte Signale



zur vermehrten Induktion von sICAM führen und damit den Übertritt von Leukozyten über die Blut-Nerven-Schranke durch die unterbundene Interaktion mit Endothelzellen verhindern.

Trotz fehlender signifikanter Unterschiede zwischen  $P0^{+/-}CCR2^{+/+}$  und  $P0^{+/-}CCR2^{-/-}$  Mäusen zeigen einige Faktoren geringe Veränderungen bezüglich der relativen Proteinmenge. So zeigte sich für den Proteingehalt des Komplementfaktors C5a und der pro-inflammatorischen Cytokine IL-3 und GM-CSF eine geringe Zunahme in  $P0^{+/-}CCR2^{+/+}$  Mäusen gegenüber  $P0^{+/-}CCR2^{-/-}$  Mäusen. Der pro-inflammatorische Komplementfaktor C5a kann eine chemoattraktive Wirkung auf Makrophagen und neutrophile Granulozyten ausüben (Monk et al., 2007) und kann zudem die Stimulation von weiteren Cytokinen, Chemokinen und Adhäsionsmolekülen durch hämatopoetische Zellen herbeiführen (van Beek et al., 2003). Beobachtungen bei peripheren Nervenverletzungen oder einer zerebralen Ischämie deuten darauf hin, dass der Komplementfaktor C5a zu einer Verschlimmerung des Gewebeschadens beiträgt (Barnum et al., 2002; Griffin et al., 2007). Weiterhin zeigten in vitro Studien, dass C5a die Expression von IL-6 induzieren kann (Sayah et al., 1999), das sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene im N. quadriceps femoris von  $P0^{+/-}CCR2^{+/+}$  und  $P0^{+/-}CCR2^{-/-}$  Mäusen vorgefunden wurde und zur Aktivierung von Makrophagen beiträgt.

Das hauptsächlich von T-Zellen sezernierte IL-3 kann die Expression der pro-inflammatorischen Cytokine TNF- $\alpha$  und IL-6 verstärken (Frendl, 1992) und ebenso wie GM-CSF zur Aktivierung von Makrophagen führen. GM-CSF, das nach einer peripheren Nervenläsion von Fibroblasten sezerniert wird, führt zur Induktion phagozytotischer Prozesse bedingt durch die Aktivierung und Proliferation von Makrophagen (Franzen et al., 2004). Überraschenderweise ist der Proteingehalt an GM-CSF in  $P0^{+/-}CCR2^{+/+}$  Mäusen im Vergleich zu  $P0^{+/-}CCR2^{-/-}$  Tieren erhöht, was ähnlich der erhöhten M-CSF mRNA Expression, die mittels quantitativen qRT-PCR Analysen in  $P0^{+/-}CCR2^{+/+}$  Mäusen beobachtet werden konnte, für eine stärkere Aktivierung von Makrophagen als in  $P0^{+/-}CCR2^{-/-}$  Mäusen spricht. Entgegen den Beobachtungen der M-CSF mRNA Expression mittels qRT-PCR Analysen zeigen  $P0^{+/-}CCR2^{+/+}$  und  $P0^{+/-}CCR2^{-/-}$  Mäuse einen vergleichbaren Proteingehalt des Makrophagen-aktivierenden Cytokins. Die verminderte Transkriptionsrate der M-CSF mRNA in  $P0^{+/-}CCR2^{-/-}$  Tieren dient möglicherweise der transkriptionellen Regulation anderer pro-inflammatorischer Cytokine, die dann letztendlich zu einer verstärkten Makrophagen-Aktivierung und vermehrten Demyelinisierung führen, wie es elektronenmikroskopische Untersuchungen belegen konnten.

Eine durch CCR2 vermittelte protektive Wirkung, die im N. quadriceps femoris von  $P0^{+/-}$  Mäusen vermehrten Schaden verhindert, kann vermutlich auch durch das anti-inflammatorische Cytokin IL-4 vermittelt werden. Der relative Proteingehalt von IL-4 zeigte in  $P0^{+/-}CCR2^{+/+}$  Mäusen eine geringe Zunahme im Vergleich zu  $P0^{+/-}CCR2^{-/-}$  Mäusen. Das von Th2-Lymphozyten sezernierte IL-4 führt in Kombination mit IL-13 zur Polarisation sog. „M2a“- Makrophagen, die ähnlich der durch IL-10 induzierten „M2c“-Makrophagen zu einer Regulation der Immunantwort führen (Mantovani et al., 2004) und demnach in  $P0$ -defizienten Mäusen eine weitere Aktivierung von Immunzellen negativ beeinflussen könnten.

#### **4.4 Einfluss von CCR2 auf die Rekrutierung von T-Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten**

Zusätzlich zum schädlichen Einfluss von Makrophagen sind auch T-Lymphozyten in der Pathogenese erblicher Neuropathien involviert. Die Anzahl endoneuraler CD8(+) T-Zellen nimmt während des Krankheitsverlaufs in  $P0^{+/-}$  Mäusen stetig zu, liegt aber zu jedem Zeitpunkt deutlich unter der Anzahl endoneuraler Makrophagen (Schmid et al., 2000). Die Rolle der T-Lymphozyten in demyelinisierenden Nerven von  $P0^{+/-}$  Mäusen ist allerdings noch nicht hinreichend geklärt. Durch Kreuzungsexperimente mit RAG-1-defizienten Mäusen, wodurch die Bildung von reifen T- und B-Lymphozyten verhindert wird, konnte gezeigt werden, dass neben der Reduktion von T-Zellen ebenso die Anzahl endoneuraler Makrophagen signifikant reduziert war und zu einer Verbesserung der Nervenpathologie führte (Schmid et al., 2000). Denkbar ist zum einen, dass die durch CCL2 aktivierten Makrophagen chemotaktisch T-Zellen anlocken können, die sich dann in Effektorzellen oder in regulatorische CD8(+) T-Zellen differenzieren und wiederum als positive Regulatoren auf die aktivierten, residenten Makrophagen einwirken können (Hartung et al., 1998; Gold et al., 2005). Da der für CCL2 spezifische Rezeptor CCR2 auch auf T-Zellen nachgewiesen werden kann (Bruhl et al., 2004), ist es zudem möglich, dass über CCL2 aktivierte T-Zellen einen direkten zytotoxischen Angriff auf Schwann-Zellen und somit auf die Nervenmorphologie ausüben können.

In  $P0^{-/-}$  Mäusen hingegen spielen T-Zellen vermutlich eine protektive Rolle, da die RAG-1-Defizienz in diesem Mausmodell zu mehr endoneuralen Makrophagen und zu einer Verschlimmerung der Nervenpathologie führte (Berghoff et al., 2005). Es ist somit denkbar, dass die zytotoxische Wirkung von Makrophagen und die Sekretion pro-inflammatorischer Cytokine durch Schwann-Zellen in  $P0^{-/-}$  Mäusen von T-Zellen negativ reguliert werden kann (Wang Ip et al., 2006).

Welchen Einfluss der CCR2-Rezeptor auf die Aktivierung und Rekrutierung von T-Zellen in periphere Nerven von  $P0^{+/-}$  und  $P0^{-/-}$  Mäusen spielt sollte in der vorliegenden Arbeit geklärt werden. In Ermangelung spezifischer CD8(+) T-Zell Marker war es nicht möglich, CD8(+) T-Lymphozyten im N. femoralis  $P0$ -defizienter Mäuse zu detektieren. Hingegen war eine Detektion mit einem spezifischen Antikörper gegen den CD3-T-Zellrezeptor möglich, der ubiquitär von allen T-Zellen exprimiert wird. Da in peripheren Nerven von  $P0^{+/-}$  Mäusen keine CD4(+) T-Zellen vorzufinden sind (Maurer et al., 2005) kann angenommen werden, dass die Anzahl an CD3(+) T-Zellen in den vorliegenden Untersuchungen der Anzahl an CD8(+) T-Zellen entspricht.

Die Analyse endoneuraler T-Zellen im N. femoralis zeigte, dass CD3(+) T-Zellen in CCR2-kompetenten sowie CCR2-defizienten  $P0^{+/-}$  Mäusen im Alter von sechs und zwölf Monaten detektiert werden können. Ähnlich der Anzahl endoneuraler Makrophagen zeigte sich in beiden Mausmutanten eine altersbedingte Zunahme endoneuraler T-Zellen, die jedoch deutlich unter der Anzahl endoneuraler Makrophagen lag. Da zwischen  $P0^{+/-}CCR2^{+/+}$  und  $P0^{+/-}CCR2^{-/-}$  Mäusen keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl endoneuraler T-Lymphozyten bestehen, ist anzunehmen dass CCR2 keinen Einfluss auf die Akkumulation von T-Zellen in  $P0^{+/-}$  Mäusen hat.

In  $P0^{-/-}$  Mäusen führte die Abwesenheit von CCR2 ebenso wie in  $P0^{+/-}$  Mäusen zu keiner Veränderung der endoneuralen T-Lymphozyten Anzahl. Im Alter von sechs Monaten zeigten  $P0^{-/-}CCR2^{+/+}$  und  $P0^{-/-}CCR2^{-/-}$  Mäuse eine geringe Anzahl an CD3(+) T-Zellen, die sich nicht signifikant unterschied und demnach auch hier davon ausgegangen werden kann, dass CCR2 keinen Einfluss auf die Rekrutierung von T-Lymphozyten hat.

Bis zum heutigen Zeitpunkt ist über die Rolle von neutrophilen Granulozyten in peripheren Nerven von  $P0$ -defizienten Mäusen nichts bekannt. Während neuroinflammatorischer Prozesse sind neutrophile Granulozyten eine der ersten Zellpopulationen, die inflammatorische Signale detektieren, einem Chemokin-Gradienten folgen und transendothelial in das Endoneurium

migrieren (Nathan, 2006). Aktivierte neutrophile Granulozyten können in der unmittelbaren Nachbarschaft von Axonen vorgefunden werden, wie Beobachtungen bei zahlreichen neurodegenerativen Erkrankungen wie der Multiplen Sklerose, der Parkinson- oder Alzheimer-Erkrankung sowie bei neurotraumatischen Erkrankungen wie der Ischämie oder neuropathischen Schmerzen zeigen konnten (Shaw et al., 2008). Weiterhin konnte bei CCR2-defizienten Mäusen durch die Induktion der EAE eine erhöhte Anzahl neutrophiler Granulozyten in den inflammatorischen ZNS-Läsionen detektiert werden (Gaupp et al., 2003). Es wird gemutmaßt, dass es auf Grund der CCR2-Defizienz zu einer erhöhten Expression von Liganden für die Aktivierung neutrophiler Granulozyten kommt, die dann eine Akkumulation dieser Zellen ins entzündete Gewebe induziert um die bestehende CCR2-Defizienz zu kompensieren. Da CCR2 nicht von neutrophilen Granulozyten exprimiert wird, müssen andere Mechanismen für den Einstrom ins inflammatorische Gewebe verantwortlich sein. Insbesondere konnte in einer Studie von Gaupp et al. eine erhöhte Expression von IL-8 und dessen Rezeptor IL-8R sowie des Rezeptors CCR1 detektiert werden. In CCR2-defizienten Mäusen begünstigen demnach diese Faktoren die Aktivierung neutrophiler Granulozyten, die im Modell der EAE teilweise die Funktion der im Blutstrom zurückgehaltenen Monozyten übernehmen können (Gaupp et al., 2003). Da im peripheren Blut von P0<sup>+/-</sup> Mäusen eine erhöhte Anzahl von neutrophilen Granulozyten detektiert werden konnte (siehe Kapitel 4.5), sollte überprüft werden, ob die CCR2-Defizienz in P0<sup>+/-</sup> Mäusen einen ähnlichen Effekt auf die Aktivierung und Akkumulation von neutrophilen Granulozyten in periphere Nerven dieser Mäuse hat. Zu einem Zeitpunkt von sechs Monaten konnten in CCR2-defizienten und CCR2-kompetenten P0<sup>+/-</sup> Mäusen keine neutrophilen Granulozyten im N. femoralis detektiert werden. Mit Fortschreiten der Erkrankung konnte im Alter von zwölf Monaten in beiden Mausmutanten eine geringe Anzahl an endoneuralen neutrophilen Granulozyten quantifiziert werden, die sich nicht signifikant unterschied. Folglich führt die CCR2-Defizienz in heterozygot-defizienten P0-Mäusen zu keiner vermehrten Aktivierung von neutrophilen Granulozyten, die kompensatorisch die Rolle von Makrophagen im peripheren Nerven übernehmen müssten.

Im Gegensatz zu P0<sup>+/-</sup> Mäusen zeigen CCR2-defiziente P0<sup>-/-</sup> Mäuse zwar eine signifikante Reduktion endoneuraler Makrophagen, doch kann hier ebenso keine Zunahme an endoneuralen neutrophilen Granulozyten beobachtet werden. In P0<sup>-/-</sup> Mäusen war die Detektion neutrophiler Granulozyten

bereits zu einem Zeitpunkt von sechs Monaten möglich, jedoch zeigten sich auch hier keine CCR2-abhängigen Unterschiede bezüglich der Anzahl neutrophiler Granulozyten im N. plantaris. Ob die geringe Anzahl an neutrophilen Granulozyten im N. plantaris homozygot-defizienter P0-Mäuse für ein Fortschreiten des axonalen Schadens verantwortlich gemacht werden kann oder zudem noch weitere, bisher nicht identifizierte Immunzellen an der Pathogenese erblicher Neuropathien beteiligt sind, bleibt zu klären.

#### 4.5 Differenzierung von Leukozyten-Populationen im Blut P0-defizienter Mäuse

Es gibt Hinweise, dass CCR2-defiziente Mäuse eine verminderte Rekrutierung von Monozyten und Makrophagen in entzündliches Gewebe aufweisen und dadurch eine beeinträchtigte Suszeptibilität für viele inflammatorische und infektiöse Erkrankungen zeigen (Boring et al., 1997; Kuziel et al., 1997). Zudem konnten Studien in CCR2-defizienten Mäusen zeigen, dass die Abwesenheit von CCR2 zu einer Reduktion von inflammatorischen Monozyten im Blut führt (Serbina et al., 2006; Tsou et al., 2007). Diese Monozyten werden als CCR2<sup>+</sup>Ly-6C<sup>high</sup> Zellen bezeichnet, die in entzündliches Gewebe einwandern um dort eine Immunantwort zu initiieren (Geissmann et al., 2003). Residente Monozyten, die hauptsächlich in nicht-entzündlichem Gewebe vorkommen, konnten als CCR2<sup>-</sup>Ly-6C<sup>low</sup> Zellen identifiziert werden (Geissmann et al., 2003). Diese Zellpopulationen konnten ebenfalls im EAE-Modell beobachtet werden, wo CCR2<sup>+</sup>Ly-6C<sup>high</sup> Monozyten wirkungsvoll in die entzündlichen Bereiche des Gehirns rekrutiert werden, während CCR2<sup>-</sup>Ly-6C<sup>low</sup> Monozyten an diesen Prozessen nicht beteiligt sind (Mildner et al., 2009). Die Charakterisierung der einzelnen Zellpopulationen basiert auf der für jeden Zelltyp charakteristischen Expression von Oberflächenmolekülen, die eine Differenzierung mithilfe spezifischer Antikörper möglich machen (Gordon et al., 2005).

In der vorliegenden Arbeit konnten im Blut von CCR2-defizienten und CCR2-kompetenten P0<sup>+/-</sup> Mäusen mittels FACS-Analyse verschiedene Leukozyten-Populationen identifiziert werden. Die Färbung der murinen Leukozyten mit spezifischen Antikörpern gegen Oberflächenantigene der Zellen führte zur Differenzierung von drei Zellpopulationen, die bereits von Tsou et al., 2007 in

CCR2-defizienten Mäusen beschrieben wurden (Tsou et al., 2007). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass es im Blut von CCR2-defizienten  $P0^{+/-}$  Mäusen als auch in CCR2-defizienten Wildtypkontrollen zu einer deutlichen Abnahme der  $7/4^{bri}Ly-6G^-$  Monozyten-Population kommt. Diese  $7/4^{bri}Ly-6G^-$  Population ist phänotypisch mit der  $CCR2^+Ly-6C^{high}$  Population identisch (Tsou et al., 2007). Die  $7/4^{bri}Ly-6G^-$  Monozyten-Population war zudem in CCR2-kompetenten  $P0^{+/-}$  und Wildtypmäusen zu ca. 85% positiv für den Oberflächenmarker F4/80, der spezifisch auf Monozyten und Makrophagen exprimiert wird. Die F4/80-Expression von  $7/4^{bri}Ly-6G^-$  Monozyten in CCR2-defizienten  $P0^{+/-}$  und Wildtypmäusen war dagegen um ca. 45% reduziert und korrelierte mit der Anzahl an  $7/4^{bri}Ly-6G^-$  Zellen im Blut der Mäuse. Da in den demyelinisierten Nerven von  $P0^{+/-}$  Mäusen in Abhängigkeit von CCR2 keine Unterschiede in der Anzahl an endoneuralen Makrophagen detektiert werden konnten, unterstützen die mittels FACS-Analysen erhaltenen Daten die Hypothese, dass die Rekrutierung von Immunzellen und die Generierung der intrinsischen Makrophagen-Antwort in diesem Modell unabhängig von CCR2 ist. Hingegen könnte der signifikante Rückgang an endoneuralen Makrophagen in den dysmyelinisierten Nerven von  $P0^{-/-}CCR2^{-/-}$  Mäusen demnach weniger aufgrund eines CCR2-abhängigen Rekrutierungsdefizits zustande kommen, sondern womöglich auf eine verminderte, basale Monozyten-Population im peripheren Blut der Mäuse zurückzuführen sein. Es ist allerdings noch unklar, ob die Rekrutierung von Monozyten direkt über CCR2 vermittelt wird oder ob CCR2 ebenso für die Mobilisation von Monozyten aus dem Knochenmark in den Blutkreislauf verantwortlich ist. In einigen Studien konnte bereits beobachtet werden, dass CCR2 teilweise bei der Emigration von  $Ly-6C^{high}$  Monozyten aus dem Knochenmark beteiligt ist (Serbina et al., 2006; Mildner et al., 2007).

Eine weitere Zellpopulation die im peripheren Blut von  $P0$ -defizienten Mäusen differenziert werden konnte sind  $7/4^{bri}Ly-6G^+$  Zellen, die als neutrophile Granulozyten charakterisiert sind. Sowohl in  $P0^{+/-}CCR2^{+/+}$  als auch in  $P0^{+/-}CCR2^{-/-}$  Mäusen zeigte sich eine Zunahme an neutrophilen Granulozyten im Vergleich zu den entsprechenden Wildtypkontrollen. Die  $7/4^{bri}Ly-6G^+$  Zellpopulation war in CCR2-defizienten  $P0^{+/-}$  Mäusen am größten und unterschied sich signifikant von den beiden Wildtypkontrollen, zeigte jedoch keine signifikanten Unterschiede zu CCR2-kompetenten  $P0^{+/-}$  Mäusen. In allen untersuchten Gruppen konnte zudem gezeigt werden, dass ca. 12% der gesamten  $7/4^{bri}Ly-6G^+$  Zellen das F4/80 Oberflächenantigen tragen. Dies bedeutet, dass in

dieser Zellpopulation neben neutrophilen Granulozyten auch einige F4/80(+) Monozyten vorzufinden sind.

Chemoattraktive Cytokine spielen bei der Aktivierung von neutrophilen Granulozyten eine große Rolle. Neben dem pro-inflammatorischen Cytokin IL-8, das agonistisch an den Neutrophilen-Rezeptor CXCR2 bindet und die Zellen dadurch aktiviert (Terashima et al., 1998), kann der Komplementfaktor C5a eine Neutrophilen-Leukozytose induzieren (Jagels et al., 1995). Bei der Bestimmung des Proteingehalts verschiedener Cytokine im N. femoralis CCR2-defizienter und CCR2-kompetenter P0<sup>+/-</sup> Mäuse konnte eine Zunahme des Komplementfaktors C5a beobachtet werden. Die vermutlich auf die Mutation im P0-Gen zurückzuführende Sekretion von C5a könnte demnach die Mobilisation von neutrophilen Granulozyten aus dem Knochenmark in den Blutstrom mobilisieren. Da neutrophile Granulozyten den CCR2-Rezeptor nicht exprimieren kommt für diesen Zelltyp eine mögliche Retention im Knochenmark nicht in Frage. Da sowohl in P0<sup>+/-</sup> als auch in P0<sup>-/-</sup> Mäusen eine CCR2-Defizienz keinen Einfluss auf die Anzahl endoneuraler neutrophiler Granulozyten hat, sorgen vermutlich sekundäre Mechanismen für die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten in die peripheren Nerven dieser Tiere. Inwieweit die geringe Anzahl endoneuraler neutrophiler Granulozyten einen Einfluss auf die Nervenpathologie P0-defizienter Mäuse hat, ist noch unklar.

Die dritte Population, die im peripheren Blut P0-defizienter Mäuse differenziert werden konnte sind 7/4<sup>dim</sup>Ly-6G<sup>-</sup> Zellen, die aus einer gemischten Population aus Monozyten, T-Zellen, B-Zellen und NK-Zellen besteht (Tsou et al., 2007). Der prozentuale Anteil dieser Zellpopulation war in allen untersuchten Gruppen gleich groß, was im Gegensatz zu den Beobachtungen von Tsou et al. steht. Hier konnte in CCR2-defizienten Mäusen für die 7/4<sup>dim</sup>Ly-6G<sup>-</sup> Population eine signifikante Reduktion im Vergleich zu CCR2-kompetenten Mäusen beobachtet werden (Tsou et al., 2007). Diese Unterschiede könnten möglicherweise auf der Verwendung verschiedener Mausmodelle beruhen, ebenso sind technische Differenzen nicht auszuschließen. In P0<sup>+/-</sup>CCR2<sup>+/+</sup> als auch in P0<sup>+/-</sup>CCR2<sup>-/-</sup> Mäusen sind ca. 58% der 7/4<sup>dim</sup>Ly-6G<sup>-</sup> Zellen F4/80-positiv und zeigen damit eine signifikante Zunahme im Vergleich zu den entsprechenden Wildtypkontrollen, bei denen der Anteil F4/80-positiver 7/4<sup>dim</sup>Ly-6G<sup>-</sup> Zellen bei ca. 47% lag. Denkbar wäre, dass es aufgrund der P0-Defizienz zu einer CCR2-unabhängigen Zunahme von F4/80-positiven Monozyten im Blutstrom kommt, die folglich für die Immunantwort in P0<sup>+/-</sup> Mäusen zur Verfügung gestellt werden.





## 5 Schlussfolgerung

Makrophagen und T-Lymphozyten sind funktionell an der Pathogenese experimenteller erblicher Neuropathien beteiligt, wie Studien in P0-defizienten Mausmutanten belegen konnten. Dabei spielt das von Schwann-Zellen sezernierte Chemokin CCL2 eine wichtige Rolle bei der Aktivierung und Rekrutierung von Makrophagen in periphere Nerven dieser Tiere. CCL2 bindet vornehmlich an den CC Chemokinrezeptor CCR2, der von Makrophagen und aktivierten T-Lymphozyten exprimiert wird.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass CCR2 in heterozygot-defizienten P0-Mäusen keinen Einfluss auf die intrinsische Generierung von endoneuraler Makrophagen hat, deren Aktivierung jedoch durch die Induktion einer anti-inflammatorischen Immunantwort vermindern und dadurch eine Verschlechterung der demyelinisierenden Nervenpathologie durch Makrophagen begrenzen kann. Die Modulation der Makrophagen wird dabei vermutlich durch anti-inflammatorische Cytokine wie Interleukin-10 und Interleukin-4 vermittelt, deren mRNA Expression bzw. Proteingehalt im N. quadriceps femoris CCR2-kompetenter P0<sup>+/-</sup> Mäuse erhöht war. Diese Cytokine steuern einer Aktivierung von Makrophagen durch pro-inflammatorische Faktoren wie TNF- $\alpha$ , M-CSF, GM-CSF, CCL2, Interleukin-3 und Interleukin-6 entgegen. Zudem ist eine Beteiligung des Komplementfaktors C5a in der Pathogenese P0-assoziiierter Neuropathien denkbar, der möglicherweise eine Zunahme an neutrophilen Granulozyten im peripheren Blut P0-defizienter Mäuse induziert. Die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten und T-Lymphozyten in demyelinisierte Nerven von P0<sup>+/-</sup> Mäusen sowie in dysmyelinisierte Nerven von P0<sup>-/-</sup> Mäusen ist durch die CCR2-Defizienz nicht beeinträchtigt; es ist zudem noch unklar welche Rolle den neutrophilen Granulozyten im Krankheitsverlauf experimenteller erblicher Neuropathien zukommt. Die durch eine CCR2-Defizienz bedingte Reduktion an inflammatorischen Monozyten im peripheren Blut von P0<sup>+/-</sup> Mäusen hat keinen Einfluss auf die intrinsisch generierte Makrophagen-Antwort im N. femoralis dieser Tiere. Dagegen ist CCR2 in der endoneuralen Akkumulation hämatogener Makrophagen im N. plantaris von P0<sup>-/-</sup> Mäusen von großer Bedeutung, jedoch ohne Einfluss auf den axonalen Schaden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen eine funktionelle Rolle für CCR2 und seine Liganden in der Pathogenese experimenteller erblicher Neuropathien, die durch einen Defekt im P0-Gen zustande kommen. Weitere Studien müssen die sehr komplexen Interaktionen zwischen Chemokinen und ihren Rezeptoren klären und die möglichen molekularen Signalwege identifizieren, die in der Pathogenese erblicher Neuropathien von Bedeutung sein könnten. Die gezielte Inhibition Chemokin-vermittelter Immunantworten kann dabei ein neuer Ansatz für die Entwicklung von Behandlungsstrategien hereditärer Neuropathien sein und eine Perspektive für diese bisher unheilbaren Erkrankungen bieten.

## 6 Veröffentlichungen

### Kongressbeiträge

81. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Neurologie (DGN) 2008, Hamburg

**Martina Oberländer, Stefan Fischer, Rudolf Martini, Martin Berghoff, Marcus Müller**

Vortrag: „Bedeutung des Chemokinrezeptors CCR2 in Tiermodellen hereditärer Neuropathien“.

(Aktuelle Neurologie, 2008 Sept; S01: 27-28)

Meeting of the Peripheral Nerve Society 2009, Würzburg

**Martina Oberländer, Stefan Fischer, Marcus Müller, Martin Berghoff**

Poster: „Different functional roles of CCR2 in myelin protein zero (P0) deficient mice“.

(JPNS, 2009 Sept; 14(2): 113)

25th Congress of the European Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis (ECTRIMS) 2009, Düsseldorf

**Martina Oberländer, Martin Berghoff**

Poster: „Investigation of the effect of glatiramer acetate on peripheral nerve degeneration in *Trembler-J* mice“.

(Multiple Sclerosis, 2009 Sept; 15(2): 178)



## 7 Literaturverzeichnis

- Abbadie C., Lindia J.A., Cumiskey A.M., Peterson L.B., Mudgett J.S., Bayne E.K., DeMartino J.A., MacIntyre D.E., Forrest M.J., 2003. Impaired neuropathic pain responses in mice lacking the chemokine receptor CCR2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 7947-7952.
- Abbadie C., Bhangoo S., De Koninck Y., Malcangio M., Melik-Parsadaniantz S., White F.A., 2009. Chemokines and pain mechanisms. *Brain Res Rev* 60, 125-134.
- Allen S.J., Crown S.E., Handel T.M., 2007. Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism. *Annu Rev Immunol* 25, 787-820.
- Bacon K., Baggiolini M., Broxmeyer H., Horuk R., Lindley I., Mantovani A., Maysushima K., Murphy P., Nomiyama H., Oppenheim J., Rot A., Schall T., Tsang M., Thorpe R., Van Damme J., Wadhwa M., Yoshie O., Zlotnik A., Zoon K., 2002. Chemokine/chemokine receptor nomenclature. *J Interferon Cytokine Res* 22, 1067-1068.
- Balice-Gordon R.J., Bone L.J., Scherer S.S., 1998. Functional gap junctions in the schwann cell myelin sheath. *J Cell Biol* 142, 1095-1104.
- Barnum S.R., Ames R.S., Maycox P.R., Hadingham S.J., Meakin J., Harrison D., Parsons A.A., 2002. Expression of the complement C3a and C5a receptors after permanent focal ischemia: An alternative interpretation. *Glia* 38, 169-173.
- Berger P., Niemann A., Suter U., 2006. Schwann cells and the pathogenesis of inherited motor and sensory neuropathies (Charcot-Marie-Tooth disease). *Glia* 54, 243-257.
- Berghoff M., Samsam M., Muller M., Kobsar I., Toyka K.V., Kiefer R., Maurer M., Martini R., 2005. Neuroprotective effect of the immune system in a mouse model of severe dysmyelinating hereditary neuropathy: enhanced axonal degeneration following disruption of the RAG-1 gene. *Mol Cell Neurosci* 28, 118-127.
- Bergoffen J., Scherer S.S., Wang S., Scott M.O., Bone L.J., Paul D.L., Chen K., Lensch M.W., Chance P.F., Fischbeck K.H., 1993. Connexin mutations in X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *Science* 262, 2039-2042.
- Bolin L.M., Verity A.N., Silver J.E., Shooter E.M., Abrams J.S., 1995. Interleukin-6 production by Schwann cells and induction in sciatic nerve injury. *J Neurochem* 64, 850-858.
- Bonfield T.L., Thomassen M.J., Farver C.F., Abraham S., Koloze M.T., Zhang X., Mosser D.M., Culver D.A., 2008. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma regulates the expression of alveolar macrophage colony-stimulating factor. *J Immunol* 181, 235-242.
- Boring L., Gosling J., Chensue S.W., Kunkel S.L., Faresse R.V., Jr., Broxmeyer H.E., Charo I.F., 1997. Impaired monocyte migration and reduced type 1 (Th1) cytokine responses in C-C chemokine receptor 2 knockout mice. *J Clin Invest* 100, 2552-2561.

- Bourde O., Kiefer R., Toyka K.V., Hartung H.P., 1996. Quantification of interleukin-6 mRNA in wallerian degeneration by competitive reverse transcription polymerase chain reaction. *J Neuroimmunol* 69, 135-140.
- Bruhl H., Cihak J., Schneider M.A., Plachy J., Rupp T., Wenzel I., Shakarami M., Milz S., Ellwart J.W., Stangassinger M., Schlondorff D., Mack M., 2004. Dual role of CCR2 during initiation and progression of collagen-induced arthritis: evidence for regulatory activity of CCR2+ T cells. *J Immunol* 172, 890-898.
- Bustin, S.A., 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 25, 169-193.
- Cambien B., Pomeranz M., Millet M.A., Rossi B., Schmid-Alliana A., 2001. Signal transduction involved in MCP-1-mediated monocytic transendothelial migration. *Blood* 97, 359-366.
- Carenini S., Maurer M., Werner A., Blazycy H., Toyka K.V., Schmid C.D., Raivich G., Martini R., 2001. The role of macrophages in demyelinating peripheral nervous system of mice heterozygously deficient in p0. *J Cell Biol* 152, 301-308.
- Charcot J.M., Marie P., 1886. Sur une forme particulière d'atrophie musculaire progressive, souvent familiale, debutant par les pieds et les jambs et atteignant plus tard les mains. *Rev. Méd.* 6, 97-138.
- Charo I.F., Ransohoff R.M., 2006. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med* 354, 610-621.
- Cheng J.K., Ji R.R., 2008. Intracellular signaling in primary sensory neurons and persistent pain. *Neurochem Res* 33, 1970-1978.
- Chitu V., Stanley E.R., 2006. Colony-stimulating factor-1 in immunity and inflammation. *Curr Opin Immunol* 18, 39-48.
- Comerford I., Litchfield W., Harata-Lee Y., Nibbs R.J., McColl S.R., 2007. Regulation of chemotactic networks by 'atypical' receptors. *Bioessays* 29, 237-247.
- Dimitrijevic O.B., Stamatovic S.M., Keep R.F., Andjelkovic A.V., 2007. Absence of the chemokine receptor CCR2 protects against cerebral ischemia/reperfusion injury in mice. *Stroke* 38, 1345-1353.
- Ditiatkovski M., Toh B.H., Bobik A., 2006. GM-CSF deficiency reduces macrophage PPAR-gamma expression and aggravates atherosclerosis in ApoE-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26, 2337-2344.
- Dyck P.J., Chance P., Lebo R., Carney J.A., 1993. Hereditary motor and sensory neuropathies. In: Dyck P.J., Thomas P.K., Griffin J.W., Low P.A., Paduslo J.F.(eds), *Peripheral Neuropathy*, Philadelphia: Elsevier Saunders, 1094-1136.
- Edgar J.M., Garbern J., 2004. The myelinated axon is dependent on the myelinating cell for support and maintenance: molecules involved. *J Neurosci Res* 76, 593-598.

- El Khoury J., Toft M., Hickman S.E., Means T.K., Terada K., Geula C., Luster A.D., 2007. Ccr2 deficiency impairs microglial accumulation and accelerates progression of Alzheimer-like disease. *Nat Med* 13, 432-438.
- Fife B.T., Huffnagle G.B., Kuziel W.A., Karpus W.J., 2000. CC chemokine receptor 2 is critical for induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* 192, 899-905.
- Filbin M.T., Walsh F.S., Trapp B.D., Pizzey J.A., Tennekoon G.I., 1990. Role of myelin P0 protein as a homophilic adhesion molecule. *Nature* 344, 871-872.
- Fischer S., Kleinschnitz C., Muller M., Kobsar I., Ip C.W., Rollins B., Martini R., 2008. Monocyte chemoattractant protein-1 is a pathogenic component in a model for a hereditary peripheral neuropathy. *Mol Cell Neurosci* 37, 359-366.
- Flugel A., Hager G., Horvat A., Spitzer C., Singer G.M., Graeber M.B., Kreutzberg G.W., Schwaiger F.W., 2001. Neuronal MCP-1 expression in response to remote nerve injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 21, 69-76.
- Fonsatti E., Altomonte M., Coral S., Cattarossi I., Nicotra M.R., Gasparollo A., Natali P.G., Maio M., 1997. Tumour-derived interleukin 1alpha (IL-1alpha) up-regulates the release of soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1) by endothelial cells. *Br J Cancer* 76, 1255-1261.
- Fra A.M., Locati M., Otero K., Sironi M., Signorelli P., Massardi M.L., Gobbi M., Vecchi A., Sozzani S., Mantovani A., 2003. Cutting edge: scavenging of inflammatory CC chemokines by the promiscuous putatively silent chemokine receptor D6. *J Immunol* 170, 2279-2282.
- Franzen R., Bouhy D., Schoenen J., 2004. Nervous system injury: focus on the inflammatory cytokine 'granulocyte-macrophage colony stimulating factor'. *Neurosci Lett* 361, 76-78.
- Frei R., Motzing S., Kinkelin I., Schachner M., Koltzenburg M., Martini R., 1999. Loss of distal axons and sensory Merkel cells and features indicative of muscle denervation in hindlimbs of P0-deficient mice. *J Neurosci* 19, 6058-6067.
- Frendl G., 1992. Interleukin 3: from colony-stimulating factor to pluripotent immunoregulatory cytokine. *Int J Immunopharmacol* 14, 421-430.
- Gaupp S., Pitt D., Kuziel W.A., Cannella B., Raine C.S., 2003. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in CCR2(-/-) mice: susceptibility in multiple strains. *Am J Pathol* 162, 139-150.
- Geissmann F., Jung S., Littman D.R., 2003. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* 19, 71-82.
- George A., Kleinschnitz C., Zelenka M., Brinkhoff J., Stoll G., Sommer C., 2004. Wallerian degeneration after crush or chronic constriction injury of rodent sciatic nerve is associated with a depletion of endoneurial interleukin-10 protein. *Exp Neurol* 188, 187-191.

- 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.
- Gold R., Stoll G., Kieseier B.C., Hartung H.P., Toyka K.V., 2005. Experimental autoimmune neuritis. In: Dyck P.J., Thomas P.K. (eds), *Peripheral Neuropathy*, Philadelphia: Elsevier Saunders, 609-633.
- Gordon S., Taylor P.R., 2005. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 5, 953-964.
- Griffin R.S., Costigan M., Brenner G.J., Ma C.H., Scholz J., Moss A., Allchorne A.J., Stahl G.L., Woolf C.J., 2007. Complement induction in spinal cord microglia results in anaphylatoxin C5a-mediated pain hypersensitivity. *J Neurosci* 27, 8699-8708.
- Grothe C., Heese K., Meisinger C., Wewetzer K., Kunz D., Cattini P., Otten U., 2000. Expression of interleukin-6 and its receptor in the sciatic nerve and cultured Schwann cells: relation to 18-kD fibroblast growth factor-2. *Brain Res* 885, 172-181.
- Harding A.E., Thomas P.K., 1980. The clinical features of hereditary motor and sensory neuropathy types I and II. *Brain* 103, 259-280.
- Harrington J.R., 2000. The role of MCP-1 in atherosclerosis. *Stem Cells* 18, 65-66.
- Hartung H.P., Gold R., Jung S., 1998. Local immune responses in the peripheral nervous system. In: Antel J., Birnbaum J., Hartung H.P. (eds), *Clinical Neuroimmunology*, Oxford: Blackwell Science, 40-54.
- Hartung H.P., Kieseier B.C., Gold R., Stoll G., Toyka K.V., 2005. Introduction to immune reactions in the peripheral nervous system. In: Dyck P.J., Thomas P.K. (eds), *Peripheral Neuropathy*, Philadelphia: Elsevier Saunders, 559-572.
- Hayasaka K., Himoro M., Sato W., Takada G., Uyemura K., Shimizu N., Bird T.D., Conneally P.M., Chance P.F., 1993a. Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 1B is associated with mutations of the myelin P0 gene. *Nat Genet* 5, 31-34.
- Hayasaka K., Himoro M., Wang Y., Takata M., Minoshima S., Shimizu N., Miura M., Uyemura K., Takada G., 1993b. Structure and chromosomal localization of the gene encoding the human myelin protein zero (MPZ). *Genomics* 17, 755-758.
- Hirota H., Kiyama H., Kishimoto T., Taga T., 1996. Accelerated Nerve Regeneration in Mice by upregulated expression of interleukin (IL) 6 and IL-6 receptor after trauma. *J Exp Med* 183, 2627-2634.
- Hopman A.H., Ramaekers F.C., Speel E.J., 1998. Rapid synthesis of biotin-, digoxigenin-, trinitrophenyl-, and fluorochrome-labeled tyramides and their application for In situ hybridization using CARD amplification. *J Histochem Cytochem* 46, 771-777.
- Huang D.R., Wang J., Kivisakk P., Rollins B.J., Ransohoff R.M., 2001. Absence of monocyte chemoattractant protein 1 in mice leads to decreased local macrophage recruitment and



- antigen-specific T helper cell type 1 immune response in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* 193, 713-726.
- Izikson L., Klein R.S., Charo I.F., Weiner H.L., Luster A.D., 2000. Resistance to experimental autoimmune encephalomyelitis in mice lacking the CC chemokine receptor (CCR)2. *J Exp Med* 192, 1075-1080.
- Jagels M.A., Chambers J.D., Arfors K.E., Hugli T.E., 1995. C5a- and tumor necrosis factor-alpha-induced leukocytosis occurs independently of beta 2 integrins and L-selectin: differential effects on neutrophil adhesion molecule expression in vivo. *Blood* 85, 2900-2909.
- Jimenez-Sainz M.C., Fast B., Mayor F., Jr., Aragay A.M., 2003. Signaling pathways for monocyte chemoattractant protein 1-mediated extracellular signal-regulated kinase activation. *Mol Pharmacol* 64, 773-782.
- Kalkonde Y.V., Morgan W.W., Sigala J., Maffi S.K., Condello C., Kuziel W., Ahuja S.S., Ahuja S.K., 2007. Chemokines in the MPTP model of Parkinson's disease: absence of CCL2 and its receptor CCR2 does not protect against striatal neurodegeneration. *Brain Res* 1128, 1-11.
- Kalla R., Liu Z., Xu S., Koppius A., Imai Y., Kloss C.U., Kohsaka S., Gschwendtner A., Moller J.C., Werner A., Raivich G., 2001. Microglia and the early phase of immune surveillance in the axotomized facial motor nucleus: impaired microglial activation and lymphocyte recruitment but no effect on neuronal survival or axonal regeneration in macrophage-colony stimulating factor-deficient mice. *J Comp Neurol* 436, 182-201.
- Katrib A., Tak P.P., Bertouch J.V., Cuello C., McNeil H.P., Smeets T.J., Kraan M.C., Youssef P.P., 2001. Expression of chemokines and matrix metalloproteinases in early rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 40, 988-994.
- Kieseier, B.C., Clements, J.M., Pischel, H.B., Wells, G.M., Miller, K., Gearing, A.J., Hartung, H.P., 1998. Matrix metalloproteinases MMP-9 and MMP-7 are expressed in experimental autoimmune neuritis and the Guillain-Barre syndrome. *Ann Neurol* 43, 427-434.
- Kirschner, D.A., Wrabetz L., Feltri M.L., 2004. The P0 gene. In: Lazzarini R.A. (ed), *Myelin biology and disorders*, New York: Elsevier, 523-545.
- Kleinschnitz C., Brinkhoff J., Zelenka M., Sommer C., Stoll G., 2004. The extent of cytokine induction in peripheral nerve lesions depends on the mode of injury and NMDA receptor signaling. *J Neuroimmunol* 149, 77-83.
- Kleopa K.A., Scherer S.S., 2002. Inherited neuropathies. *Neurol Clin* 20, 679-709.
- Kobsar I., Maurer M., Ott T., Martini R., 2002. Macrophage-related demyelination in peripheral nerves of mice deficient in the gap junction protein connexin 32. *Neurosci Lett* 320, 17-20.
- Kobsar I., Berghoff M., Samsam M., Wessig C., Maurer M., Toyka K.V., Martini R., 2003. Preserved myelin integrity and reduced axonopathy in connexin32-deficient mice lacking the recombination activating gene-1. *Brain* 126, 804-813.

- Kobsar I., Hasenpusch-Theil K., Wessig C., Muller H.W., Martini R., 2005. Evidence for macrophage-mediated myelin disruption in an animal model for Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 1A. *J Neurosci Res* 81, 857-864.
- Kobsar I., Oetke C., Kroner A., Wessig C., Crocker P., Martini R., 2006. Attenuated demyelination in the absence of the macrophage-restricted adhesion molecule sialoadhesin (Siglec-1) in mice heterozygously deficient in P0. *Mol Cell Neurosci* 31, 685-691.
- Kuhlenbaumer G., Young P., Hunermund G., Ringelstein B., Stogbauer F., 2002. Clinical features and molecular genetics of hereditary peripheral neuropathies. *J Neurol* 249, 1629-1650.
- Kusterer K., Bojunga J., Enghofer M., Heidenthal E., Usadel K.H., Kolb H., Martin S., 1998. Soluble ICAM-1 reduces leukocyte adhesion to vascular endothelium in ischemia-reperfusion injury in mice. *Am J Physiol* 275, G377-380.
- Kuziel W.A., Morgan S.J., Dawson T.C., Griffin S., Smithies O., Ley K., Maeda N., 1997. Severe reduction in leukocyte adhesion and monocyte extravasation in mice deficient in CC chemokine receptor 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 12053-12058.
- Lawson C., Wolf S., 2009. ICAM-1 signaling in endothelial cells. *Pharmacol Rep* 61, 22-32.
- LeBlanc S.E., Srinivasan R., Ferri C., Mager G.M., Gillian-Daniel A.L., Wrabetz L., Svaren J., 2005. Regulation of cholesterol/lipid biosynthetic genes by Egr2/Krox20 during peripheral nerve myelination. *J Neurochem* 93, 737-748.
- LeBlanc S.E., Jang S.W., Ward R.M., Wrabetz L., Svaren J., 2006. Direct regulation of myelin protein zero expression by the Egr2 transactivator. *J Biol Chem* 281, 5453-5460.
- Lee H.K., Wang L., Shin Y.K., Lee K.Y., Suh D.J., Park H.T., 2009. Interleukin-6 induces proinflammatory signaling in Schwann cells: a high-throughput analysis. *Biochem Biophys Res Commun* 382, 410-414.
- Lemke G., Lamar E., Patterson J., 1988. Isolation and analysis of the gene encoding peripheral myelin protein zero. *Neuron* 1, 73-83.
- Leung K.H., 1999. Release of soluble ICAM-1 from human lung fibroblasts, aortic smooth muscle cells, dermal microvascular endothelial cells, bronchial epithelial cells, and keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 260, 734-739.
- Liefner M., Siebert H., Sachse T., Michel U., Kollias G., Bruck W., 2000. The role of TNF-alpha during Wallerian degeneration. *J Neuroimmunol* 108, 147-152.
- Lupski J.R., de Oca-Luna R.M., Slaugenhaupt S., Pentao L., Guzzetta V., Trask B.J., Saucedo-Cardenas O., Barker D.F., Killian J.M., Garcia C.A., Chakravarti A., Patel P.I., 1991. DNA duplication associated with Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Cell* 66, 219-232.
- Luther S.A., Cyster J.G., 2001. Chemokines as regulators of T cell differentiation. *Nat Immunol* 2, 102-107.
- Mackay C.R., 2001. Chemokines: immunology's high impact factors. *Nat Immunol* 2, 95-101.

- Mahad D., Callahan M.K., Williams K.A., Ubogu E.E., Kivisakk P., Tucky B., Kidd G., Kingsbury G.A., Chang A., Fox R.J., Mack M., Sniderman M.B., Ravid R., Staugaitis S.M., Stins M.F., Ransohoff R.M., 2006. Modulating CCR2 and CCL2 at the blood-brain barrier: relevance for multiple sclerosis pathogenesis. *Brain* 129, 212-223.
- Maier M., Berger P., Suter U., 2002. Understanding Schwann cell-neurone interactions: the key to Charcot-Marie-Tooth disease? *J Anat* 200, 357-366.
- Mantovani A., Sica A., Sozzani S., Allavena P., Vecchi A., Locati M., 2004. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* 25, 677-686.
- Martini R., Zielasek J., Toyka K.V., Giese K.P., Schachner M., 1995. Protein zero (P0)-deficient mice show myelin degeneration in peripheral nerves characteristic of inherited human neuropathies. *Nat Genet* 11, 281-286.
- Martini R., 1997. Animal models for inherited peripheral neuropathies. *J Anat* 191 ( Pt 3), 321-336.
- Martini R., Toyka K.V., 2004. Immune-mediated components of hereditary demyelinating neuropathies: lessons from animal models and patients. *Lancet Neurol* 3, 457-465.
- Martini R., 2005. Transgenic models of nerve degeneration. In: Dyck P.J., Thomas P.K. (eds), *Peripheral Neuropathy*, Philadelphia: Elsevier Saunders, 535-556.
- Martini R., Fischer S., Lopez-Vales R., David S., 2008. Interactions between Schwann cells and macrophages in injury and inherited demyelinating disease. *Glia* 56, 1566-1577.
- Maurer M., Schmid C.D., Bootz F., Zielasek J., Toyka K.V., Oehen S., Martini R., 2001. Bone marrow transfer from wild-type mice reverts the beneficial effect of genetically mediated immune deficiency in myelin mutants. *Mol Cell Neurosci* 17, 1094-1101.
- Maurer M., Muller M., Kobsar I., Leonhard C., Martini R., Kiefer R., 2003. Origin of pathogenic macrophages and endoneurial fibroblast-like cells in an animal model of inherited neuropathy. *Mol Cell Neurosci* 23, 351-359.
- Maurer M., Toyka K.V., Martini R., 2005. [The role of the immune system in hereditary demyelinating neuropathies]. *Nervenarzt* 76, 690-700.
- Mildner A., Schmidt H., Nitsche M., Merkler D., Hanisch U.K., Mack M., Heikenwalder M., Bruck W., Priller J., Prinz M., 2007. Microglia in the adult brain arise from Ly-6ChiCCR2+ monocytes only under defined host conditions. *Nat Neurosci* 10, 1544-1553.
- Mildner A., Mack M., Schmidt H., Bruck W., Djukic M., Zabel M.D., Hille A., Priller J., Prinz M., 2009. CCR2+Ly-6Chi monocytes are crucial for the effector phase of autoimmunity in the central nervous system. *Brain*.
- Mine S., Okada Y., Tanikawa T., Kawahara C., Tabata T., Tanaka Y., 2006. Increased expression levels of monocyte CCR2 and monocyte chemoattractant protein-1 in patients with diabetes mellitus. *Biochem Biophys Res Commun* 344, 780-785.

- Mombaerts P., Iacomini J., Johnson R.S., Herrup K., Tonegawa S., Papaioannou V.E., 1992. RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell* 68, 869-877.
- Monk P.N., Scola A.M., Madala P., Fairlie D.P., 2007. Function, structure and therapeutic potential of complement C5a receptors. *Br J Pharmacol* 152, 429-448.
- Mueller M., Leonhard C., Wacker K., Ringelstein E.B., Okabe M., Hickey W.F., Kiefer R., 2003. Macrophage response to peripheral nerve injury: the quantitative contribution of resident and hematogenous macrophages. *Lab Invest* 83, 175-185.
- Muller M., Berghoff M., Kobsar I., Kiefer R., Martini R., 2007. Macrophage colony stimulating factor is a crucial factor for the intrinsic macrophage response in mice heterozygously deficient for the myelin protein P0. *Exp Neurol* 203, 55-62.
- Muller M., Wacker K., Getts D., Ringelstein E.B., Kiefer R., 2008. Further evidence for a crucial role of resident endoneurial macrophages in peripheral nerve disorders: lessons from acrylamide-induced neuropathy. *Glia* 56, 1005-1016.
- Mueller O., Lightfoot S., Schroeder A., 2004. RNA Integrity Number (RIN) – Standardization of RNA quality control. Agilent Technologies
- Nathan C., 2006. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol* 6, 173-182.
- Nave K.A., Sereda M.W., Ehrenreich H., 2007. Mechanisms of disease: inherited demyelinating neuropathies--from basic to clinical research. *Nat Clin Pract Neurol* 3, 453-464.
- Nibbs R., Graham G., Rot A., 2003. Chemokines on the move: control by the chemokine "interceptors" Duffy blood group antigen and D6. *Semin Immunol* 15, 287-294.
- Ogilvie P., Thelen S., Moepps B., Gierschik P., da Silva Campos A.C., Baggolini M., Thelen M., 2004. Unusual chemokine receptor antagonism involving a mitogen-activated protein kinase pathway. *J Immunol* 172, 6715-6722.
- Pearson G., Robinson F., Beers Gibson T., Xu B.E., Karandikar M., Berman K., Cobb M.H., 2001. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* 22, 153-183.
- Perrin F.E., Lacroix S., Aviles-Trigueros M., David S., 2005. Involvement of monocyte chemoattractant protein-1, macrophage inflammatory protein-1alpha and interleukin-1beta in Wallerian degeneration. *Brain* 128, 854-866.
- Peters W., Charo I.F., 2001. Involvement of chemokine receptor 2 and its ligand, monocyte chemoattractant protein-1, in the development of atherosclerosis: lessons from knockout mice. *Curr Opin Lipidol* 12, 175-180.
- Pfaffl M.W., Horgan, G.W., Dempfle, L., 2002. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 30, e36.
- Raivich G., Jones L.L., Kloss C.U., Werner A., Neumann H., Kreutzberg G.W., 1998. Immune surveillance in the injured nervous system: T-lymphocytes invade the axotomized mouse

- facial motor nucleus and aggregate around sites of neuronal degeneration. *J Neurosci* 18, 5804-5816.
- Rieckmann P., Scholze G., Weichselbraun I., Ganapati R., Prange H.W., 1996. Soluble adhesion molecules in sera of patients with leprosy: levels of soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1) rapidly decrease during multi-drug therapy. *Clin Exp Immunol* 105, 65-68.
- Robertson A., Huxley C., 2005. Transgenic models of inherited neuropathy. In: Dyck P.J., Thomas P.K. (eds.), *Peripheral Neuropathy*, Philadelphia: Elsevier Saunders, 1561-1583.
- Rollins B.J., 1997. Chemokines. *Blood* 90, 909-928.
- Rot A., von Andrian U.H., 2004. Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokine grammar for immune cells. *Annu Rev Immunol* 22, 891-928.
- Samsam M., Frei R., Marziniak M., Martini R., Sommer C., 2002. Impaired sensory function in heterozygous P0 knockout mice is associated with nodal changes in sensory nerves. *J Neurosci Res* 67, 167-173.
- Samsam M., Mi W., Wessig C., Zielasek J., Toyka K.V., Coleman M.P., Martini R., 2003. The Wlds mutation delays robust loss of motor and sensory axons in a genetic model for myelin-related axonopathy. *J Neurosci* 23, 2833-2839.
- Sawada T., Sano M., Omura T., Omura K., Hasegawa T., Funahashi S., Nagano A., 2007. Spatiotemporal quantification of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 after crush injury in rat sciatic nerve utilizing immunohistochemistry. *Neurosci Lett* 417, 55-60.
- Sayah S., Ischenko A.M., Zhakhov A., Bonnard A.S., Fontaine M., 1999. Expression of cytokines by human astrocytomas following stimulation by C3a and C5a anaphylatoxins: specific increase in interleukin-6 mRNA expression. *J Neurochem* 72, 2426-2436.
- Scherer S.S., Wrabetz L., 2008. Molecular mechanisms of inherited demyelinating neuropathies. *Glia* 56, 1578-1589.
- Schmid C.D., Stienekemeier M., Oehen S., Bootz F., Zielasek J., Gold R., Toyka K.V., Schachner M., Martini R., 2000. Immune deficiency in mouse models for inherited peripheral neuropathies leads to improved myelin maintenance. *J Neurosci* 20, 729-735.
- Schroeder, A., Mueller, O., Stocker, S., Salowsky, R., Leiber, M., Gassmann, M., Lightfoot, S., Menzel, W., Granzow, M., Ragg, T., 2006. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol* 7, 3.
- Serbina N.V., Pamer E.G., 2006. Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. *Nat Immunol* 7, 311-317.
- Shamash S., Reichert F., Rotshenker S., 2002. The cytokine network of Wallerian degeneration: tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1alpha, and interleukin-1beta. *J Neurosci* 22, 3052-3060.

- Shapiro L., Doyle J.P., Hensley P., Colman D.R., Hendrickson W.A., 1996. Crystal structure of the extracellular domain from P0, the major structural protein of peripheral nerve myelin. *Neuron* 17, 435-449.
- Shaw S.K., Owolabi S.A., Bagley J., Morin N., Cheng E., LeBlanc B.W., Kim M., Harty P., Waxman S.G., Saab C.Y., 2008. Activated polymorphonuclear cells promote injury and excitability of dorsal root ganglia neurons. *Exp Neurol* 210, 286-294.
- Shy M.E., Arroyo E., Sladky J., Menichella D., Jiang H., Xu W., Kamholz J., Scherer S.S., 1997. Heterozygous P0 knockout mice develop a peripheral neuropathy that resembles chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy (CIDP). *J Neuropathol Exp Neurol* 56, 811-821.
- Shy M.E., Garbern J.Y., Kamholz J., 2002. Hereditary motor and sensory neuropathies: a biological perspective. *Lancet Neurol* 1, 110-118.
- Shy M.E., Jani A., Krajewski K., Grandis M., Lewis R.A., Li J., Shy R.R., Balsamo J., Lilien J., Garbern J.Y., Kamholz J., 2004. Phenotypic clustering in MPZ mutations. *Brain* 127, 371-384.
- Shy M.E., 2005. Hereditary motor and sensory neuropathies related to MPZ (P0) mutations. In: Dyck P.J., Thomas P.K. (eds.), *Peripheral Neuropathy*, Philadelphia: Elsevier Saunders, 1681-1060.
- Shy M.E., 2006. Peripheral neuropathies caused by mutations in the myelin protein zero. *J Neurol Sci* 242, 55-66.
- Siebert H., Sachse A., Kuziel W.A., Maeda N., Bruck W., 2000. The chemokine receptor CCR2 is involved in macrophage recruitment to the injured peripheral nervous system. *J Neuroimmunol* 110, 177-185.
- Siebert H., Dippel N., Mader M., Weber F., Bruck W., 2001. Matrix metalloproteinase expression and inhibition after sciatic nerve axotomy. *J Neuropathol Exp Neurol* 60, 85-93.
- Skre H., 1974. Genetic and clinical aspects of Charcot-Marie-Tooth's disease. *Clin Genet* 6, 98-118.
- Smith K., McDonald I., Miller D., Lassman H., 2005. The pathophysiology of multiple sclerosis. In: Compston, A. (ed.), *McAlpine's multiple sclerosis*. Oxford: Churchill Livingstone, 601-660.
- Subang M.C., Richardson P.M., 2001. Influence of injury and cytokines on synthesis of monocyte chemoattractant protein-1 mRNA in peripheral nervous tissue. *Eur J Neurosci* 13, 521-528.
- Suter U., Scherer S.S., 2003. Disease mechanisms in inherited neuropathies. *Nat Rev Neurosci* 4, 714-726.
- Taskinen H.S., Olsson T., Bucht A., Khademi M., Svelander L., Roytta M., 2000. Peripheral nerve injury induces endoneurial expression of IFN-gamma, IL-10 and TNF-alpha mRNA. *J Neuroimmunol* 102, 17-25.

- Teitelbaum S.L., 2000. Bone resorption by osteoclasts. *Science* 289, 1504-1508.
- Terashima T., English D., Hogg J.C., van Eeden S.F., 1998. Release of polymorphonuclear leukocytes from the bone marrow by interleukin-8. *Blood* 92, 1062-1069.
- Thomas P.K., King R.H., Small J.R., Robertson A.M., 1996. The pathology of charcot-marie-tooth disease and related disorders. *Neuropathol Appl Neurobiol* 22, 269-284.
- Tichopad, A., Dilger, M., Schwarz, G., Pfaffl, M.W., 2003. Standardized determination of real-time PCR efficiency from a single reaction set-up. *Nucleic Acids Res* 31, e122.
- Timmerman V., Nelis E., Van Hul W., Nieuwenhuijsen B.W., Chen K.L., Wang S., Ben Othman K., Cullen B., Leach R.J., Hanemann C.O., et al., 1992. The peripheral myelin protein gene PMP-22 is contained within the Charcot-Marie-Tooth disease type 1A duplication. *Nat Genet* 1, 171-175.
- Toews A.D., Barrett C., Morell P., 1998. Monocyte chemoattractant protein 1 is responsible for macrophage recruitment following injury to sciatic nerve. *J Neurosci Res* 53, 260-267.
- Tofaris G.K., Patterson P.H., Jessen K.R., Mirsky R., 2002. Denervated Schwann cells attract macrophages by secretion of leukemia inhibitory factor (LIF) and monocyte chemoattractant protein-1 in a process regulated by interleukin-6 and LIF. *J Neurosci* 22, 6696-6703.
- Tooth H.H., 1886. The peornual type of progressive muscular atrophy. London: H.K. Lewis and Co.
- Tsou C.L., Peters W., Si Y., Slaymaker S., Aslanian A.M., Weisberg S.P., Mack M., Charo I.F., 2007. Critical roles for CCR2 and MCP-3 in monocyte mobilization from bone marrow and recruitment to inflammatory sites. *J Clin Invest* 117, 902-909.
- Uyemura K., Asou H., Takeda Y., 1995. Structure and function of peripheral nerve myelin proteins. *Prog Brain Res* 105, 311-318.
- van Beek J., Elward K., Gasque P., 2003. Activation of complement in the central nervous system: roles in neurodegeneration and neuroprotection. *Ann N Y Acad Sci* 992, 56-71.
- Viola A., Luster A.D., 2008. Chemokines and their receptors: drug targets in immunity and inflammation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 48, 171-197.
- Visse R., Nagase H., 2003. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 92, 827-839.
- Wang Ip C., Kroner A., Fischer S., Berghoff M., Kobsar I., Maurer M., Martini R., 2006. Role of immune cells in animal models for inherited peripheral neuropathies. *Neuromolecular Med* 8, 175-190.
- Warner L.E., Hilz M.J., Appel S.H., Killian J.M., Kolodry 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 type 1B, Dejerine-Sottas, and congenital hypomyelination. *Neuron* 17, 451-460.

- Warner L.E., Shohat M., Shorer Z., Lupski J.R., 1997. Multiple de novo MPZ (P0) point mutations in a sporadic Dejerine-Sottas case. *Hum Mutat* 10, 21-24.
- Warner L.E., Mancias P., Butler I.J., McDonald C.M., Keppen L., Koob K.G., Lupski J.R., 1998. Mutations in the early growth response 2 (EGR2) gene are associated with hereditary myelinopathies. *Nat Genet* 18, 382-384.
- Waxman S.G., Kocsis J.D., Black J.A., 1995. Pathophysiologie of demyelinated axons. In: Waxman S.G., Kocsis J.D., Stys P.K. (eds.), *The axon*. Oxford: Oxford University Press, 638-461
- Wrabetz L., D'Antonio M., Pennuto M., Dati G., Tinelli E., Fratta P., Previtali S., Imperiale D., Zielasek J., Toyka K., Avila R.L., Kirschner D.A., Messing A., Feltri M.L., Quattrini A., 2006. Different intracellular pathomechanisms produce diverse Myelin Protein Zero neuropathies in transgenic mice. *J Neurosci* 26, 2358-2368.
- Xu W., Manichella D., Jiang H., Vallat J.M., Lilien J., Baron P., Scarlato G., Kamholz J., Shy M.E., 2000. Absence of P0 leads to the dysregulation of myelin gene expression and myelin morphogenesis. *J Neurosci Res* 60, 714-724.
- Young P., Suter U., 2003. The causes of Charcot-Marie-Tooth disease. *Cell Mol Life Sci* 60, 2547-2560.
- Zhang J., Shi X.Q., Echeverry S., Mogil J.S., De Koninck Y., Rivest S., 2007. Expression of CCR2 in both resident and bone marrow-derived microglia plays a critical role in neuropathic pain. *J Neurosci* 27, 12396-12406.
- Zlotnik A., Yoshie O., 2000. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 12, 121-127.

**Internetseiten:**

<http://www.molgen.ua.ac.be/CMTMutations>



## 8 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
APC	Allophycocyanin
AV594	Streptavidin, Alexa Fluor 594™ konjugiert
β-ME	β-Mercaptoethanol
bp	Basenpaar
BGaRb	Biotinylierter Ziege anti-Kaninchen IgG-Antikörper
BR	Blockierungsreagenz
BSA	Bovines Serumalbumin
CCR2	CC Chemokinrezeptor 2
CCL2	Chemokin (CC-Motiv)-Ligand 2
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>complementary</i> DNA
C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> AsNaO <sub>2</sub> ·3H <sub>2</sub> O	Natrium-Cacodylat
CMT	Charcot-Marie-Tooth
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
C <sub>t</sub>	<i>threshold cycle</i>
Cx32	Connexin 32
Da	Dalton
DAPI	4'-6-Diamidino-2-Phanylindol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECL	<i>Enhanced Chemoluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
G-CSF	Granulozyten-Kolonie Stimulierender Faktor
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor

---

gDNA	genomische DNA
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
°C	Grad Celsius
g	Gramm
h	Stunde
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HAES	Hydroxyethylstärke
HCl	Salzsäure
HKG	<i>house keeping gene</i>
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
HRP	Meerrettich-Peroxidase
IHC	Immunhistochemie
IL-6	Interleukin 6
IL-10	Interleukin 10
k	Kilo (als Vorsatz von SI-Einheiten, 10 <sup>3</sup> )
KHCO <sub>3</sub>	Kaliumhydrogencarbonat
l	Liter
M	Molar
m	Milli (als Vorsatz von SI-Einheiten, 10 <sup>-3</sup> )
M-CSF	Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor
min	Minute
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MW	Mittelwert
μ	Mikro (als Vorsatz von SI-Einheiten, 10 <sup>-6</sup> )
n	Nano (als Vorsatz von SI-Einheiten, 10 <sup>-9</sup> )
Na <sub>3</sub> (C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> )2H <sub>2</sub> O	Natriumcitrat
NaCl	Natriumchlorid

---

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	Natriumdihydrogenphosphat
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	Dinatriumhydrogenphosphat
NaN <sub>3</sub>	Natriumazid
NaOH	Natrimhydroxid
NH <sub>4</sub> Cl	Ammoniumchlorid
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
p	Pico (als Vorsatz von SI-Einheiten, 10 <sup>-12</sup> )
P0	Myelinprotein Null
PbC <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub>	Bleicitrat
PbNO <sub>3</sub>	Bleinitrat
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	R-Phycoerythrin
REST	<i>Relative Expression Software Tool</i>
PFA	Paraformaldehyd
Pmp22	Peripheres Myelinprotein 22
PNS	peripheres Nervensystem
RIN	RNA-Integritätsmaß
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonulease
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
qRT-PCR	quantitative <i>Realtime</i> -Polymerase-Kettenreaktion
SD	Standardabweichung
sec	Sekunde
Tab.	Tabelle

TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	Tris-gepufferte Saline
TEM	Transmissions-Elektronenmikroskop
TIMP-1	<i>Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-1</i>
TNF- $\alpha$	Tumor-Nekrose Faktor $\alpha$
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-diamin
U/min	Umdrehungen pro Minute
V	Volt





