

Aus der Klinik für Klinische Neurophysiologie
Prof. Dr. med. W. Paulus
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Untersuchungen zur neuromuskulären
Pathophysiologie bei der
Charcot-Marie-Tooth-Typ-1A-
Erkrankung**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Michael Bartl

aus
Speyer

Göttingen 2020

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück

Referent: Prof. Dr. med. W. Paulus

Ko-Referent/in:

Drittreferent/in:

Datum der mündlichen Prüfung:

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Untersuchungen zur neuromuskulären Pathophysiologie bei der Charcot-Marie-Tooth-Typ-1-A-Erkrankung" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den

.....

(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	3
Tabellenverzeichnis	3
Abkürzungsverzeichnis	4
1 Einleitung	7
1.1 Die Rolle von Biomarkern.....	9
1.2 Klassifikation und Genetik der CMT.....	9
1.2.1 Einteilung und Vererbung	9
1.2.2 Genetische Diagnostik	10
1.3 Klinik der CMT und elektrophysiologische Eigenschaften.....	11
1.4 Physiologische Grundlagen der neuromuskulären Funktion	12
1.4.1 Verteilung und Funktion der Ionenkanäle der Axone des peripheren Nervensystems.....	13
1.4.1.1 Spannungsabhängige Natriumkanäle.....	14
1.4.1.2 Spannungsabhängige Kaliumkanäle.....	15
1.4.2 Einwärtsgleichrichtende Ströme	17
1.4.3 Ionenpumpen.....	19
1.4.4 Das Ruhemembranpotential, die Ausbildung von Aktionspotentialen und deren Weiterleitung	19
1.4.5 Saltatorische Erregungsleitung	22
1.4.6 Die motorische Einheit	23
1.4.7 Mechanische Eigenschaften der Muskulatur und Muskelkontraktion	25
2 Material und Methoden	27
2.1 Die Rolle der Exzitabilität	27
2.2 Elektrophysiologisches Setup.....	28
2.2.1 Übersicht und Aufbau des eingesetzten Messprotokolls.....	28
2.2.2 Mathematische Modellierung myelinisierter Axone.....	31
2.2.3 Grundlagen der Elektromyographie und Anwendung der <i>Multi-Unit</i> -Elektromyographie bei CMT1A-Patienten und gesunden Probanden.....	32
2.2.4 Ablauf der EMG-Datenanalyse und Dekompositions-Algorithmus: <i>Blind-Source-Separation</i>	37
2.2.5 Analyse der dekomponierten Daten.....	41
2.2.6 Rekrutierungsverhalten	41

2.2.7 Statistische Auswertung.....	43
2.2.7.1 Messungen der Nervenexzitabilität	43
2.2.7.2 HD-sEMG	43
3 Ergebnisse	44
3.1 Axonale Erregbarkeit und Leitungsfunktion in CMT1A.....	44
3.2 Ergebnisse der EMG-Messungen	51
3.2.1 Kraftmessungen.....	52
3.2.2 Kodierungsverhalten	55
3.2.3 Rekrutierungsverhalten	55
3.2.4 Reinnervation.....	57
3.2.5 Korrelation neurophysiologischer Parameter mit CMTNS2	57
4 Diskussion	58
4.1 Anwendung der <i>Multi-Unit</i> -Elektromyographie bei CMT1A-Patienten	58
4.2 Kodierung der Entladungsraten in CMT1A	58
4.3 Beziehung zu den Positivsymptomen der Polyneuropathie	59
4.4 Die Rolle des Leitungsblocks in CMT1A	60
4.5 Kraftsteuerung in CMT1A.....	61
4.6 Rekrutierung von motorischen Einheiten in CMT1A	61
4.7 Kann eine beeinträchtigte Erregbarkeit eine beeinträchtigte Kodierung der Entladungsfrequenz in CMT1A erklären?.....	62
4.8 Klinische Relevanz der Ergebnisse	63
5 Zusammenfassung	64
Referenzen	65

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: EMG-Ableitung.....	34
Abbildung 2: Visualisierung der Kraftmessungen.....	36
Abbildung 3: Darstellung der Aktionspotentiale einzelner motorischer Einheiten.....	39
Abbildung 4: Entladungsverhalten über einen <i>pulse train</i>	39
Abbildung 5: Exzitabilität: Durchschnittswerte von CMT1A-Patienten und Kontrollen. ..	46
Abbildung 6: Ergebnisse des <i>threshold electrotonus</i>	47
Abbildung 7: Modellberechnungen für CMT1A-Patienten.....	48
Abbildung 8: Beziehung zwischen Leitfähigkeits- und Erregbarkeitsparametern.	50
Abbildung 9: Beziehung zwischen CMAP-Amplitude und Schwellen-Elektrotonus.	50
Abbildung 10: Beziehung zwischen CMAP-Amplitude und modellierter Leitfähigkeit. ...	51
Abbildung 11: Übersicht über die EMG-Parameter.	56
Abbildung 12: Korrelation mit dem CMTNS2.....	57

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Ionenverteilung zwischen intra-und extrazellulärem Milieu.....	20
Tabelle 2: Faserklassen nach Erlanger und Gasser.....	23
Tabelle 3: Modellierung der Exzitabilität des <i>N. medianus</i>	49
Tabelle 4: Basisdaten der CMT1A-Patienten.	52
Tabelle 5: Übersicht der HD-sEMG-Parameter von CMT1A-Patienten und Kontrollen. ..	53

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

6MWT/10MWT	<i>6-/10- Meter-Walk-Test</i>
9HPT	<i>9-Hole-Peg-Test</i>
AD	Autosomal-dominant
APB	<i>M. Abductor pollicis brevis</i>
AR	Autosomal-rezessiv
ATP	Adenosintriphosphat
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CB	<i>conduction block</i>
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
CMAP	<i>compound muscle action potential</i>
CMT	Charcot-Marie-Tooth-Erkrankung
CMT1A	Charcot-Marie-Tooth-1A-Erkrankung
CMTNS	CMT-Neuropathie-Score
Cmy	<i>myelin capacity</i>
CoV	<i>coefficient of variation</i>
CoVF	<i>coefficient of variability of force</i>
CoVISI	<i>coefficient of variability of interspike intervals</i>
CAX	<i>axonal capacity</i>
dHMN	distale hereditäre motorische Neuropathie
dML	distale motorische Latenz
DR	<i>discharge rate</i>
EMG	Elektromyographie
GBB	Barrett-Barrett-Leitfähigkeit
GH	max. internodale HCN-Kanalleitfähigkeit

GKfL	max. internodale schnelle K ⁺ -Leitfähigkeit
GJB1	<i>Gap Junction Beta-1-Gen</i>
HC	<i>healthy control</i>
HCN	hyperpolarisationsaktivierte, cyclisch-nukleotid-bindende Kanäle
HDAC6	Histon-Deacetylase-6
HD-sEMG	<i>high-density surface electromyography</i>
HMSN	hereditäre motorisch-sensible Neuropathie
HNPP	<i>Hereditary Neuropathy with Pressure Palsy</i>
HSN/HSAN	hereditäre sensible/autonome Neuropathie
IH	hyperpolarisationsaktivierter Kationenstrom
IOD I	<i>M. Interosseus dorsalis I</i>
IV	<i>current-threshold-relationship</i>
ISI	<i>interspike interval</i>
MPZ	<i>Myelinprotein-Zero-Gen</i>
mRNA	<i>messenger Ribonucleic Acid</i>
MRT	Magnetresonanztomographie
MSAP	Muskelsummenaktionspotential
MU	<i>motor unit</i>
MUNIX	<i>Motor Unit Number Index</i>
MVC	<i>maximal voluntary contraction</i>
NCV	<i>nerve conduction velocity</i>
NIH	National Institute of Health
NLG	Nervenleitungsgeschwindigkeit
NMJ	<i>neuromuscular junction</i>
ONLS	<i>Overall Neuropathy Limitation Scale</i>

PIC	<i>persistent inward currents</i>
PMP22	peripheres Myelin-Protein-22
Pnap	Anzahl der persistierenden Natriumkanäle
PPS	<i>pulses per second</i>
RC	<i>recovery cycle</i>
RMS	<i>root mean square</i>
RRP	<i>relative refractory period</i>
SDTC	<i>strength-duration time constant</i>
SEM	<i>standard error of mean</i>
SIL	<i>silhouette measure</i>
TA	<i>M. tibialis anterior</i>
TE	<i>threshold electrotonus</i>
Ted	<i>threshold electrotonus depolarisation</i>
Teh	<i>threshold electrotonus hyperpolarisation</i>
WES	Whole Exom Sequencing
WU	<i>Mann-Whitney-U-Test</i>

1 EINLEITUNG

Die Charcot-Marie-Tooth-Erkrankung (CMT) wurde nach den drei erstbeschreibenden Neurologen Jean-Martin Charcot (1825-1893), Pierre Marie (1853-1940) und Howard Tooth (1856-1926) benannt; dies wird auf das Jahr 1886 datiert. Sie ist die häufigste hereditäre Erkrankung des peripheren Nervensystems und stellt eine heterogene Gruppe von Neuropathien dar, für die mittlerweile über 100 assoziierte Gene identifiziert werden konnten (Bartl et al. 2019; Kazamel und Boes 2015; Pareyson et al. 2017; Rossor et al. 2016). Pathophysiologisch kommt es durch unterschiedliche beschriebene Pathomechanismen in der Regel zu einer längenabhängigen Degeneration von sensiblen und/oder motorischen Nervenfasern (Bartl et al. 2019; Rossor et al. 2013).

Die CMT ist eine zur Gruppe der sog. *orphan diseases* gehörende Erkrankung. Diese sind in den USA definiert als Erkrankungen, die weniger als 200.000 Personen betreffen. Laut dem National Institute of Health (NIH) sind davon aktuell 6800 verzeichnet (Swinney und Xia 2014).

Die Prävalenz der Erkrankung wird auf etwa 1:2500 geschätzt und zeigt hierbei eine weltweite Verbreitung ohne eine ethnische Prädisposition. Die Prävalenzangaben variieren je nach ausgewählter Studie zwischen 9 bis 28/100.000 (Barreto et al. 2016; Bartl et al. 2019; Lefter et al. 2017).

Die häufigste hereditäre Neuropathie ist die Charcot-Marie-Tooth-1A-Erkrankung (CMT1A) (Pareyson et al. 2017; Rossor et al. 2016). Eine Duplikation des Gens, das für das periphere Myelin-Protein-22 (PMP22) kodiert, konnte als verantwortliches Krankheitsgen identifiziert werden (Matsunami et al. 1992). Die CMT1A ist eine symmetrische, demyelinisierende Neuropathie mit sekundär axonalem Verlust, die zu distal betonter, langsam progredienter Muskelschwäche und -atrophie führt. Darüber hinaus zeigen Patienten neuropathische Symptome wie Muskelkrämpfe, Schmerzen und Sensibilitätsstörungen (Hypästhesien und Dysästhesien) zudem auch Fußfehlstellungen wie Hammerzehen und hohe Fußgewölbe (Shy et al. 2005). In der *landmark study* von Harding und Thomas aus dem Jahr 1980 zeigten Patienten mit hereditärer motorisch-sensibler Neuropathie Typ I in 87 % der Fälle Paresen der unteren Extremitäten, in 69 % eine Pallhypästhesie und in 53 % Sensibilitäts-

störungen für Berührung. Weitere häufige Symptome waren Schmerzen (53 %), Lagesinnstörungen (46 %) und eine Areflexie (ausgefallener Achillessehnenreflex in 89 % der Patienten) (Harding und Thomas 1980). Trotz moderner molekulardiagnostischer Verfahren sind neurophysiologische Untersuchungen für die CMT1A-Diagnose unerlässlich. Eine verlangsamte Nervenleitungsgeschwindigkeit (NLG, *nerve conduction velocity*, NCV) weist auf eine Demyelinisierung hin und ist typisch für CMT1A-Patienten (Harding und Thomas 1980). Bei der Neurographie motorischer Nerven beziehen sich die gemessenen zusammengesetzten Muskelsummenaktionspotentiale (MSAP, *compound muscle action potential*, CMAP) in Amplitude und Form des Potentials auf die Integrität von Motoreinheiten (*motor units*, MU). Allerdings zeigte sich das MSAP als Parameter zur Quantifizierung der Erkrankungsschwere, der Anzahl aktiver motorischer Einheiten und der Reinnervation im zeitlichen Verlauf der Erkrankung in mehreren Untersuchungen ungeeignet, da die Reduktion der gemessenen MSAPs nicht direkt mit dem Ausmaß des für die CMT-Erkrankung typischen axonalen Verlusts korreliert (Lewis et al. 2003; Uncini und Kuwabara 2015; van Dijk et al. 1999).

Die CMT1A ist eine langsam progredient verlaufende Erkrankung. Der Erfolg klinischer Studien hängt deshalb im besonderen Maße von sensitiven Ergebnissen und validen Biomarkern ab. Diese Marker erlauben jedoch bisher nur ein sehr eingeschränktes Verständnis von den zugrundeliegenden Mechanismen der jeweiligen Symptome. Klinisch-neurophysiologische Surrogatmarker könnten helfen, diese relevanten Vorgänge besser zu verstehen. In bisherigen Untersuchungen konnten die in der Routinediagnostik bestimmten Parameter wie die NLG, die distale motorische Latenz (dML) und die konventionelle Elektromyographie (EMG) allerdings nicht als valide Biomarker zur Beschreibung der Schwere der Erkrankung wie auch ihres Fortschreitens nachgewiesen werden. CMT-Patienten zeigen eine ausgeprägte Reduktion der NLG, allerdings ändert sich diese nicht signifikant im Laufe der Erkrankung. Die Symptomausprägung und der Grad der Beeinträchtigung korrelierten hierbei nicht mit den erfassten Veränderungen in der Elektrophysiologie. Bei CMT1A sind häufig schon initial die Nervenleitungsgeschwindigkeiten ausgeprägt reduziert, auch wenn noch eine milde Symptomatik besteht. Der klinische Schweregrad zeigt hier also keine nachgewiesene Korrelation mit dem Ausmaß der Reduktion der MSAPs oder der NLG in neurographischen Untersuchungen (Fledrich et al. 2017; Manganelli et al. 2016).

1.1 DIE ROLLE VON BIOMARKERN

Grundsätzlich ist in der klinischen Forschung die Entwicklung von validen Skalen und Messverfahren von großer praktischer Bedeutung. Ziel ist es, die Parameter als *outcome measures* in klinischen Studien einsetzen zu können. So konnte beispielsweise die Beschaffenheit der Muskulatur, die Muskelmasse und der relative Fettanteil, ermittelt in der Magnetresonanztomographie (MRT), mit der Erkrankungsschwere bei der CMT-Erkrankung korreliert werden (Morrow et al. 2018). Weiterhin wurde das Neurofilament als *tool*, welches bereits effektiv bei anderen Neuropathien eingesetzt wird, auch zur Überprüfung des sensiblen Defizits bei CMT validiert (Bartl et al. 2019; Pareyson und Shy 2018). Weitere validierte Skalen sind der CMT-Neuropathie-Score (CMTNS) (Mannil et al. 2014), der *9-Hole-Peg-Test* (9HPT) (Mori et al. 2018), der *6- und 10-Meter-Walk-Test* (6MWT, 10MWT) (Padua et al. 2016) und die *Overall Neuropathy Limitation Scale* (ONLS) (Graham und Hughes 2006). Der Einsatz dieser Skalen in klinischen Studien hat sich als effektiv erwiesen, um Krankheitsschwere und Verlauf zu erfassen. Wichtig ist allerdings, dass diese keine funktionsbasierten Beurteilungen der Erkrankungsschwere erlauben. Hierzu sind wiederum Biomarker notwendig, die die spezifische Pathophysiologie der Erkrankung mit der klinischen Beeinträchtigung und dem physiologischen, molekularen und histologischen Phänotyp korrelieren.

Molekulare Biomarker konnten aus Hautbiopsien von 266 CMT1A-Patienten bestimmt werden. Im Vergleich mit gesunden Kontrollpersonen konnten diese zur Verlaufskontrolle wie auch zur Quantifizierung der Erkrankungsschwere validiert werden (Fledrich et al. 2017). Im Vorfeld waren diese im Tiermodell aus Hautbiopsien gewonnenen worden. Es handelt sich dabei um mRNA-Biomarker (Fledrich et al. 2012). Dies ist ein Beispiel für ein *proof of concept* von Erkenntnissen aus dem Tiermodell am Menschen (Bartl et al. 2019).

1.2 KLASSIFIKATION UND GENETIK DER CMT

1.2.1 EINTEILUNG UND VERERBUNG

Die klinische Einteilung der CMT erfolgt in die häufigste Form der hereditären motorisch-sensiblen Neuropathie (HMSN), in die deutlich seltenere distale hereditäre motorische Neuropathie (dHMN) und die hereditären sensiblen/autonomen Neuropathien (HSN/HSAN). Eine weitere Einteilung kann anhand des Vererbungsmusters erfolgen. Diese gliedert sich in die autosomal-dominant (AD) vererbten demyelinisierenden (CMT1)/axonalen (CMT2) und

die autosomal-rezessiv (AR)/X-chromosomal (X) (CMT4 und CMTX) vererbten Neuropathien (Murphy et al. 2012; Pisciotta und Shy 2018). Eine Dejerine-Sottas-Neuropathie stellt allgemein eine Form mit frühzeitig einsetzenden Symptomen dar. Die Verwendung des Begriffs erfolgt unabhängig vom Vererbungsmuster (Landrieu und Baets 2013).

Die CMT1A als häufigster Vertreter ist mit einer Duplikation des *peripheren Myelinprotein-22*-Gens (*PMP22*-Gen, Region 17p11.2) assoziiert. Diese Duplikation ist die Ursache von 60 bis 70 % der demyelinisierenden CMT1-Formen. Das entspricht ungefähr 40 bis 50 % aller CMT-Fälle. Die CMTX1 wird durch eine Mutation im *Gap-Junction-Beta-1*-Gen (*GJB1*) verursacht (10 bis 20 % der CMT-Erkrankungen). Die CMT1B-Erkrankung wiederum ist mit Mutationen im *Myelinprotein-Zero*-Gen (*MPZ*-Gen) assoziiert (< 5 % der CMT-Fälle). Etwa 20 % der CMT-Erkrankungen stellen axonale CMT2-Formen dar (Bartl et al. 2019; Fridman et al. 2015; Rossor et al. 2016). Wird eine CMT-Diagnose genetisch bestätigt, dann kann in etwa 90 % der Fälle eine Mutation in einem der Gene *PMP22*, *GJB1*, *MPZ* (tritt in Nordamerika und Nordeuropa häufiger auf) (Rudnik-Schoneborn et al. 2016; Saporta et al. 2011) und entweder *MFN2* oder *GDAP1* (höhere Prävalenz im Mittelmeerraum) (Manganelli et al. 2014; Sivera et al. 2013) nachgewiesen werden. Die hereditäre Neuropathie mit Neigung zur Druckparese (HNPP) ist in 95 % der Fälle verursacht durch eine Deletion des *PMP22*-Gens. Genauere Angaben zur Prävalenz sind in der Literatur nicht vorhanden (Saporta et al. 2011).

1.2.2 GENETISCHE DIAGNOSTIK

Üblich ist ein Diagnosealgorithmus basierend auf dem klinischen Phänotyp, dem zugrundeliegenden Vererbungsmuster, der jeweiligen Häufigkeit des Subtyps in der entsprechenden ethnischen Gruppe und neurophysiologischen Messdaten (Nervenleitungsgeschwindigkeiten, Neurographie). Dieser kann bei einem Großteil der Patienten mit CMT zu einer genetischen Diagnose führen. Durch das genetische Screening auf die häufigsten Gene (*PMP22*, *GJB1*, *MPZ*, *MFN2*, *GDAP1*, *HSPB1*, *HSPB8*) kann so in ca. 60 % der Patienten mit der Verdachtsdiagnose CMT eine genetisch gesicherte Diagnose gestellt werden. (Bartl et al. 2019; Pehlivan et al. 2016; Walsh et al. 2017). Es kann eine komplette Exomsequenzierung (*Whole Exom Sequencing*, WES) oder ein *Multigene-Panel*-Test als bereits initiale Methode verwendet werden, wenn eine demyelinisierende Neuropathie vorliegt und bereits eine *PMP22*-Duplikation ausgeschlossen wurde. Neuere Entwicklungen haben zu Vorschlägen

für neue Klassifikationen geführt, in denen betroffene Gene in den Mittelpunkt gerückt wurden. Diese sind bisher allerdings noch nicht etabliert und verbreitet (Mathis et al. 2015).

1.3 KLINIK DER CMT UND ELEKTROPHYSIOLOGISCHE EIGENSCHAFTEN

Insgesamt ist die Variabilität der klinischen Symptomatik sehr hoch. Das Bild ist geprägt von symmetrischen Paresen mit distaler Betonung, Muskelatrophien, Fußfehlstellungen im Sinne einer *Pes cavus*-Deformität, Sensibilitätsstörungen, einem Steppergang und typischerweise einer Areflexie, zumindest an den unteren Extremitäten (Cornett et al. 2016). Für die ausgeprägt atrophe Muskulatur der Unterschenkel wird im deutschsprachigen Raum teilweise der Begriff „Storchenbeine“ verwendet. An den Händen ist häufig eine Atrophie des *M. interosseus dorsalis I* (IOD I) zu finden. Der Krankheitsverlauf zeigt sich typischerweise langsam progredient ohne nennenswerte Einschränkung der Lebenserwartung. Die ersten Krankheitssymptome werden zwischen dem 10. und 20. Lebensjahr deutlich. Viele Patienten berichten über Beeinträchtigungen in der motorischen Entwicklung im Laufe der Kindheit und teilweise operative Korrekturen von Fußdeformitäten (*classic phenotype*). Die Anwendung von Orthesen ist sehr oft nötig. Es sind allerdings auch Verlaufsformen mit deutlich schnellerer Progredienz und stärkerer Symptomausprägung beschrieben, die dann als *early-onset*-Erkrankungen oder *non-classic phenotype* bezeichnet werden. So kann es bei der CMT2A schon bei Erreichen des 20. Lebensjahres zu einer Rollstuhlpflichtigkeit kommen (Bartl et al. 2019; Pareyson et al. 2013; Saporta et al. 2011). Die axonale CMT, die CMT1B und die CMTX1 bei Frauen wiederum zeigen oft erst spät Symptome ca. ab dem 40. Lebensjahr (Saporta et al. 2011).

Auch eine Einteilung beruhend auf elektrophysiologischen Daten ist möglich. Die demyelinisierenden Formen (CMT1) zeigen motorische Nervenleitungsgeschwindigkeiten (mNLG) unterhalb von 38 m/s. Die axonalen Varianten (CMT2) zeichnen sich durch eine nur leichtgradig verlangsamte mNLG, oft größer als 45 m/s aus, hierbei sind die MSAP deutlich reduziert (möglicherweise nur in den unteren Extremitäten). Der Begriff der dominanten intermediären CMT-Typen (I-CMT) beschreibt Formen mit mNLG zwischen 25 und 45 m/s. Die typische CMT1A zeigt in den Neurographien ubiquitär ausgeprägt verringerte mNLG (zwischen 17 bis 21 m/s). Diese finden sich noch ausgeprägter bei den *early-onset*-Formen (CMT1B, CMT, CMT4) mit mNLG < 10 m/s (Bartl et al. 2019; Saporta und Shy 2013). Reduzierte MSAP können auch bei demyelinisierenden Formen auf Grund des Auftretens

von Leitungsblöcken (LB, *conduction block*, CB) oder einem sekundären Axonverlust, insbesondere an den Beinen, auffallen. Hier empfehlen sich Messungen der Armmnerven zur besseren Differenzierung.

1.4 PHYSIOLOGISCHE GRUNDLAGEN DER NEUROMUSKULÄREN FUNKTION

Zu den zellulären Bestandteilen des peripheren Nervensystems (PNS) gehören die Neurone und die Schwann-Zellen. Letztere bilden die Myelinscheide des peripheren Nervensystems, eine Aufgabe die im zentralen Nervensystem (ZNS) von den Oligodendrozyten als Untergruppe der Gliazellen übernommen wird. Das Neuron besteht aus einem Zellkörper (Perikaryon, Soma), welches die Organellen (raues endoplasmatisches Retikulum, sog. Nissl-Substanz, Golgi-Apparat, Zellkern, Mitochondrien, Lysosomen, Peroxisomen) enthält und weiterhin aus Bestandteilen des Zytoskeletts, wie Neuro- und Aktinfilamenten und den Mikrotubuli, besteht.

Die wichtigste Aufgabe der Schwann-Zellen besteht in der Bildung der isolierenden Myelinscheide, was die Geschwindigkeit der elektrischen Signalleitung deutlich erhöht. Grundlage hierfür ist die saltatorische Erregungsleitung, bei der die elektrische Erregung nicht kontinuierlich entlang des Axons verläuft, sondern von einem sog. Ranvier'schen Schnürring (s. u.) zum Nächsten erfolgt. Nur dort kann ein direkter Kontakt mit der Axonmembran entstehen. Dort findet die Depolarisation mit der Ausbildung eines neuen Aktionspotentials statt. Eine Schwann-Zelle bildet die dünne Myelinscheide für ein Axon, in dem sie vielfach konzentrisch um das Axon gewunden wird. Die Anzahl der Schichten ist dabei direkt proportional zum Durchmesser des Axons. So besitzen dickere Axone mehr Schichtungen als dünnere. Sehr dünne Axone wiederum sind nicht myelinisiert und leiten Signale deutlich langsamer.

Unterbrochen wird die Myelinscheide durch die Ranvier'schen Schnürringe (*nodes of Ranvier*). An diesen fehlt die Myelinscheide vollständig und so liegt die Axonmembran (auch als Axolemma bezeichnet) frei. Hieraus folgt eine Einteilung des Axons in Nodien und Internodien. Den Übergang bildet das Paranodium auf Seiten des Schnürrings und das Juxtapanodium auf Seiten des Internodiums (Peters et al. 1991).

Entlang der Axone kommt es zu einem für die Funktion und Versorgung notwendigen antero- bzw. retrograden Transport verschiedener Substanzen. Dazu zählen unterschiedliche

Proteine wie Enzyme und Bestandteile des Zytoskeletts. Eine wichtige Rolle spielen die Mikrotubuli und deren Motorproteine Dynein und Kinesin.

Im Hinblick auf die CMT-Erkrankung kommt dem Transport entlang des Axons eine wichtige Rolle zu. Die Acetylierung von α -Tubulin durch die Histon-Deacetylase-6 (HDAC6) ist relevant für die Bindung der Motorproteine Dynein und Kinesin der Mikrotubuli. Ist diese verringert kann der axonale Transport beeinträchtigt werden. Experimentell konnte durch einen HDAC6-Inhibitor (Tubastatin A) in einem Mausmodell der CMT2 der klinische Phänotyp, mit sensomotorischen Defiziten bedingt durch *HSPB1*-Mutationen, rückgebildet werden (Bartl et al. 2019; Benoy et al. 2017; Kim et al. 2016).

1.4.1 VERTEILUNG UND FUNKTION DER IONENKANÄLE DER AXONE DES PERIPHEREN NERVENSYSTEMS

Neurone können bedingt durch den spezifischen Aufbau ihrer Membranen sowohl elektrisch als auch chemisch erregt werden. Dies wird unter anderem durch den Aufbau als biphasische Biomembran (Dicke von 6 bis 8 nm) hervorgerufen. Durch die integralen Membranbestandteile wie Ionenkanäle, Ionenpumpen, Transporter und Rezeptoren wird der Fluss anorganischer Ionen reguliert, sodass es zu einer Ungleichverteilung verschiedener Ionen zwischen intra- und extrazellulär kommt. Die Ungleichverteilung der Ladungen erzeugt eine Spannung über der Membran (Polarisation). Eine Änderung der Spannung kann eine Depolarisationswelle auslösen, welche dann als sog. Aktionspotential über das Axon weitergeleitet wird.

Die Ionenkanäle verfügen durch ihre spezielle molekulare Struktur über die Eigenschaft, Ionen zu selektieren. Sie bestehen aus Transmembranproteinen mit meist helikaler Struktur, die durch die doppelte Phospholipidmembran hindurchreichen und so eine Pore oder einen Kanal bilden.

Durch eine molekulare Konformationsänderung kann der Zustand in Bezug auf die Durchlässigkeit für Ionen zwischen offen und geschlossen variiert werden. Als direkte Folge eines offenen Kanals resultiert ein extrem schneller Ladungsfluss über die Zellmembran mit bis zu 100 Millionen Ionen pro Kanal und Sekunde (Transportrate von 10^6 bis 10^8 Ionen pro Sekunde und Kanal). Der Fluss über Ionenkanäle erfolgt passiv, Transporter und Ionenpum-

pen arbeiten im Gegensatz dazu primär oder sekundär aktiv. Dies bedeutet, dass der Transport nur unter Aufwendung von Energie aus der Hydrolyse des Energieäquivalentes Adenosintri-phosphat (ATP) geschehen kann.

Die Kanäle sind selektiv für bestimmte Ionen durchlässig und für Wasser undurchlässig. Hierdurch tragen sie zur elektrischen Leitfähigkeit der Zellmembran bei. Die Verteilung der Ionenkanäle ist abhängig vom jeweiligen Neuronentyp und dessen spezifischer Funktion. Auf Grundlage der Regulation der Ionenkanäle erfolgt eine Einteilung in spannungsgesteuerte, ligandengesteuerte/ionotrope, rezeptorgekoppelte/metabotrope und konstitutiv aktive Ionenkanäle.

Die Kanäle zeigen typenabhängig ein unterschiedliches Verhalten hinsichtlich ihrer Durchlässigkeit und wechseln zwischen verschiedenen Zuständen, die eine Offenwahrscheinlichkeit bedingen, hin und her. Diese Kinetik, unter der Einwirkung von Mechanismen wie dem Membranpotential oder der Konzentration von Transmittern wird als *gating* oder „Kanalschaltverhalten“ bezeichnet. Zusätzlich können sog. alternative *Gating*-Mechanismen wie intrazelluläre Messenger, porenblockierende Proteine oder extrazelluläre Moleküle, die an membranständige Rezeptoren binden die Offenwahrscheinlichkeit beeinflussen. Sie ist für einzelne Subtypen charakteristisch. Hierdurch werden die Ionenkanäle reguliert. Die Eigenschaften der Kanäle leiten sich aus der Wahrscheinlichkeit ab, selektiv Ionen hindurchzuleiten und sind abhängig von verschiedenen Bedingungen. Dabei wird üblicherweise die Offenwahrscheinlichkeit mit einem Zahlenwert angegeben, ein Wert von z. B. 0,6 bedeutet hierbei, dass der Kanal in 60 % der Fälle geöffnet ist.

1.4.1.1 SPANNUNGSABHÄNGIGE NATRIUMKANÄLE

Natriumkanäle sind große transmembranöse Proteine, die aus vier mal sechs Transmembrandomänen (S1 bis S6) mit einer hydrophilen inneren Pore zwischen den Segmenten S5 und S6 bestehen. Diese Pore ist relevant für ihre Ionenselektivität. Das positiv geladene S4-Segment dient hierbei als Spannungssensor (Stühmer et al. 1989). Die Kanäle werden als spannungsabhängige Natriumkanäle bezeichnet, da sie im Ruhezustand geschlossen sind und sich bei einer Depolarisation der Membran öffnen. Während des Aktionspotentials steigt die Permeabilität für Natriumionen stark an (Cole und Curtis 1939). Es werden neun bekannte und strukturverwandte Isoformen der Kanäle, bezeichnet als Na_v 1.1 bis Na_v 1.9, unterschieden (Goldin et al. 2000). Über ihre Funktion und die gewebsspezifische Verteilung wurden

Erkenntnisse durch Untersuchungen unter der Verwendung von Neurotoxinen gewonnen (Catterall 1992). Humane Axone enthalten zwei unterschiedliche Typen von Natriumkanälen. Ungefähr 98 % der Natriumkanäle zeigen eine schnelle Aktivierungs- und Inaktivierungskinetik, sie sind nur für kurze Zeit geöffnet. Sowohl die Aktivierung als auch die Inaktivierung dieser Kanäle wird bei positiven Potentialen beschleunigt. In menschlichen Axonen tritt der stärkste Einwärtsstrom von Natriumionen bei Membranpotentialen von etwa 20 mV auf. Der Dauerstrom wird beim Ruhemembranpotential teilweise aktiviert und unterliegt einer unvollständigen spannungsabhängigen Inaktivierung, was zu einem bestehenden Strom innerhalb eines großen Bereichs von Membranpotentialen führt. Er ist empfindlich gegenüber Änderungen des pH-Werts, wobei eine Absenkung des pH-Werts sowohl zu einer Verringerung der Anzahl der beitragenden Kanäle als auch der Einkanalleitfähigkeit führt (Burke et al. 2001).

1.4.1.2 SPANNUNGSABHÄNGIGE KALIUMKANÄLE

Kaliumkanäle (K^+) stellen sowohl die größte als auch die vielfältigste Gruppe von Ionenkanälen dar (Gutman et al. 2005). In Bezug auf Säugetier-Axone gehören hierzu spannungsgesteuerte K^+ (K_v)-Kanäle, einwärts gleichrichtende Kanäle und Kanäle mit einer molekülspezifischen Sensitivität (Ca^{2+} , Na^+ und ATP). Sie bestehen strukturell aus vier α -Untereinheiten, mit weiteren β -Untereinheiten. Spannungsabhängige Kaliumkanäle, die sich in der späten Phase des Aktionspotentials öffnen, werden als verzögernd gleichrichtend (*delayed rectifier*) bezeichnet. Sie reagieren bedeutend langsamer als Natriumkanäle und verursachen hauptsächlich einen Auswärtsstrom (Gleichrichtung des Stroms). Strukturell ähneln sie den Natriumkanälen, bestehen aber aus vier vollständig getrennten Proteinen. Üblicherweise zeigen sie keine spannungsabhängige Inaktivierung (Kandel et al. 2013).

Bei K_v -Kanälen besteht jeweils eine Untereinheit aus sechs Transmembrandomänen, andere können aus zwei, vier oder sieben Domänen aufgebaut sein (Judge und Bever 2006). Wie bei den Na_v -Kanälen fungiert die S4-Transmembrandomäne als Spannungssensor für die K_v -Kanäle. Die Position der Kanäle befindet sich an der Außenseite der Membran, sie ermöglichen einen Ionenausstrom als Reaktion auf eine Depolarisation (Dubois 1981; Jonas et al. 1989; Larsson et al. 1996; Papazian et al. 1991; Reid et al. 1999; Safronov et al. 1993).

Bei einer insgesamt hohen Anzahl verschiedener Kaliumkanäle auf menschlichen Axonen liegt der Schwerpunkt der Kanäle hier bei den schnellen und langsamen spannungsabhängigen Kanälen. Die Bezeichnung bezieht sich auf die entsprechende Kinetik hinsichtlich der De-/Inaktivierung. Die schnellen K_v -Kanäle werden hauptsächlich von $KCNA1(K_v1.1)$ -Untereinheiten gebildet (Gutman et al. 2005). Diese sind sensitiv gegenüber 4-Aminopyridin (4-AP) und Tetraethylammonium (TEA). In großer Dichte befinden sie sich in der juxtapanodalen Region (Wang et al. 1993), im Bereich des Internodiums liegen diese Kanäle in geringerer Anzahl vor (Röper und Schwarz 1989). Eine Aktivierung der schnellen K_v -Kanäle erfolgt bei Potentialen zwischen -50 mV und +50 mV. Zu einer Deaktivierung kommt es innerhalb weniger Millisekunden bei Potentialen zwischen -120 mV und -65 mV (Reid et al. 1999; Safronov et al. 1993; Waxman 1995).

Die schnellen K_v -Kanäle dienen der Begrenzung der erneuten Erregbarkeit eines Schnürrings nach der Ausbildung eines Aktionspotentials (Barrett und Barrett 1982; Waxman und Ritchie 1993). Weiterhin tragen sie zur Ausbildung eines internodalen Ruhepotentials bei, was wichtig ist, um ein stabiles Potential am Schnürring aufrechtzuerhalten (Chiu und Ritchie 1984).

Die langsamen K_v -Kanäle besitzen entsprechend eine langsame Deaktivierungskinetik und finden sich mit der höchsten Dichte in der axonalen Membran im Bereich der Schnürringe (Röper und Schwarz 1989; Schwarz et al. 2006). Sie werden aus zwei unterschiedlichen Untereinheiten ($KCNQ2$, $KCNQ3$) gebildet (Gutman et al. 2005). Die $KCNQ2$ -Untereinheiten überwiegen in myelinisierten Axonen, die $KCNQ3$ -Untereinheiten treten häufiger in Nervenfasern von mittleren und geringen Durchmessern auf (Schwarz et al. 2006). Diese K_v -Kanäle erzeugen einen nicht inaktivierenden Kaliumstrom, der als "M"-Strom bezeichnet wird (Brown und Adams 1980; Marrion 1997). Sie sind während des Ruhemembranpotentials aktiv, halten dies aufrecht und werden bei Potentialen um -110 mV aktiviert (Reid et al. 1999). Durch die langsame Kinetik sind sie wahrscheinlich nicht für die Repolarisation nach Ausbildung eines Aktionspotentials verantwortlich. Allerdings verursachen sie eine leichte Hyperpolarisation mit einer Dauer von ca. 20 – 80 ms, wodurch die neuronale Exzitabilität reduziert wird (Baker et al. 1987). Weiterhin verhindern sie Nachpotentiale bei lang andauernden Depolarisationen, die im Zusammenhang mit hochfrequenter Aktivität auftreten (Schwarz et al. 1995). Demyelinisierte Axone zeigen eine ausgeprägte Umorganisation der $K_v1.1$ - und 1.2 -Kanalverteilung. Hierdurch kommt es zu einer Kolokalisation mit noda-

len Na⁺-Kanälen (vornehmlich Na_v1.3). Diese zeigen eine langsame Inaktivierung und können bei leichter Depolarisation ektopische Aktivität fördern, was zu einer Störung der paranodalen Funktion führen kann (Arroyo et al. 1999; Rasband 2004; Rasband et al. 1998). Ebenfalls in diesem Zusammenhang wurde eine erhöhte Expression von Na_v1.8 nachgewiesen, was möglicherweise eine erhöhte Erregbarkeit begünstigt. Die erhöhte Aktivität von K_v1-Kanälen kann die Erregbarkeit der Membran herabsetzen und zu einem Leitungsblock führen, da sich das Membranpotential dem Kaliumgleichgewichtspotential annähert (Nashmi und Fehlings 2001). Im Rahmen von Remyelinisierungsprozessen kann das vorübergehende Auftreten von K_v-Kanälen am Schnürring allerdings Repolarisationen bewirken, die eine Daueraktivierung bei geschädigten Axonen verhindert (Rasband et al. 1998). Grundsätzlich können also Veränderungen der Aktivität wie auch der Lokalisation der spannungsabhängigen Ionenkanäle, insbesondere der langsamen und schnellen Kaliumkanäle, zu einer erhöhten Erregbarkeit der Nerven führen.

1.4.2 EINWÄRTSGLEICHRICHTEnde STRÖME

Bisher wurden zwei Arten einwärts gleichrichtender Ströme beschrieben (Mayer und Westbrook 1983). Die erste Form ist ein K⁺-selektiver Strom (Constanti und Galvan 1983; Leech und Stanfield 1981). Dieser wird bei Hyperpolarisation ausgelöst und wird von der extrazellulären K⁺-Konzentration [K⁺] beeinflusst. Er basiert auf der Differenz zwischen dem Membranpotential und dem Kaliumgleichgewichtspotential (Birch et al. 1991). Der zweite Typ wird durch einen Strom aus Natrium- und Kaliumionen gebildet. Auch er wird durch Hyperpolarisation aktiviert, ist allerdings von der extrazellulären Kaliumkonzentration unabhängig. Er tritt in unterschiedlichen Zelltypen des peripheren wie auch zentralen Nervensystems auf und wird vom internodalen Axolemma gebildet (Baker et al. 1987; Eng et al. 1990; Grafe et al. 1997; Hille 1992; Jiang et al. 2008; Takigawa et al. 1997). Die Aktivierung und Deaktivierung verläuft langsamer und komplexer, mit einem Anstieg mit zunehmender Hyperpolarisation. Für den Strom wird die Abkürzung I_H verwendet (Pape 1996). Die I_H-Ströme beginnen bei einer Spannung von -45 mV bis -60 mV und erreichen ihr Maximum bei -110 mV.

Da 10 bis 15 % des I_H während des Ruhemembranpotentials aktiv sind, spielt er wahrscheinlich eine Rolle in der Regulation der Exzitabilität und der Potentialausbildung der axonalen Membran (Pape 1996). Weiterhin inaktiviert I_H nicht und senkt den Membranwiderstand bei ausgeprägter Hyperpolarisation (Maccaferri et al. 1993; McCormick und Pape 1990). Bei

länger andauernder Nervenstimulation schränkt der I_H -Strom die Auswirkung der elektrogener Hyperpolarisation (Reduktion der Erregbarkeit, bedingt durch eine erhöhte Aktivität der Na^+/K^+ -Pumpe) ein (Applegate und Burke 1989; Bostock und Grafe 1985). Dies gilt für myelinisierte wie auch für unmyelinisierte Fasern (Baker et al. 1987; Grafe et al. 1997). Laut elektrophysiologischer Studien tritt der I_H -Strom seltener in motorischen Nerven auf als in sensiblen (Kiernan et al. 2004; Lin et al. 2002). Hieraus könnte eine verminderte Fähigkeit der motorischen Axone resultieren, im Rahmen einer Demyelinisierung mittels erhöhtem I_H -Strom einer aktivitätsabhängigen Leitungsstörung entgegenzuwirken (Cappelen-Smith et al. 2000; Kaji et al. 2000). Weitere axonale K^+ -Kanäle, die hoch selektiven Calcium-aktivierten K^+ -Kanäle, werden bei einem Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration (Ca^{2+}) wie auch bei Membrandepolarisation aktiviert und tragen zu einer Repolarisation nach Auslösung eines Aktionspotentials bei (Horrigan und Aldrich 2002). Zusätzlich bewirken sie in einigen Zelltypen eine Hyperpolarisation nach einer stattgefundenen Repolarisation, was die Rate neu ausgebildeter Aktionspotentiale verringert (Sah 1996; Sun et al. 1999). Die Na^+ -aktivierten K^+ -Kanäle werden in Neuronen stark exprimiert und beeinflussen deren Entladungsraten (Bhattacharjee und Kaczmarek 2005). Sie befinden sich in unmittelbarer Nähe der spannungsgesteuerten Na^+ -Kanäle und bestimmen die Größe des depolarisierenden Nachpotentials (Liu und Leung 2004).

Die hyperpolarisationsaktivierten, cyclisch-nukleotid-bindenden Kanäle (HCN) sind unspezifische Kationenkanäle, welche durch die Bindung von cAMP (cyclisches Adenosinmonophosphat) und cGMP (cyclisches Guanosinmonophosphat) aktiviert werden. Sie spielen eine entscheidende Rolle in der Bestimmung der elektrischen Eigenschaften von Membranen und den Vorgängen der Integration von Signalen an den Dendriten. Sie tragen zur Stabilisierung des Ruhemembranpotentials bei und besitzen eine Schrittmacherfunktion. Es werden vier verschiedenen Subtypen unterschieden, die im Herzen und im Nervensystem exprimiert werden. Sie bestehen molekular betrachtet aus vier Untereinheiten (HCN1 bis HCN4) und einer Pore (Zagotta et al. 2003). Bei Potentialen nahe dem Ruhemembranpotential sind sie geöffnet. Der Subtyp HCN1 lässt sich in Gehirn, Rückenmark und den Spinalganglien nachweisen und zeigt eine schnelle Inaktivierungskinetik und nur eine schwache Regulation über cAMP. HCN2 findet sich ubiquitär mit Schwerpunkt im Hirnstamm, die Inaktivierungsgeschwindigkeit wird als intermediär beschrieben und die Steuerung ist stark von cyclischen Nukleotiden abhängig. Sie sind für den sog. *funny current* im Sinusknoten des Herzens verantwortlich und werden bei Überexpression mit neuropathischem Schmerz in Verbindung

gebracht. HCN3 ist nur in geringem Maße im Nervensystem exprimiert, die Kinetik ist langsam und der Einfluss von cAMP ist im Vergleich gering. HCN4 zeigt ebenfalls eine langsame Kinetik und die stärkste Beeinflussbarkeit durch cAMP und hat die höchste Dichte im Thalamus und dem *Bulbus olfactorius*. Alle Isoformen finden sich im Herzmuskelgewebe (Benarroch 2013). In motorischen Axonen sind die HCN-Kanäle schwächer exprimiert als in sensiblen, hieraus folgt eine geringere Anpassungsfähigkeit an eine Hyperpolarisation.

Eine Verbindung zwischen Zellstoffwechsel und elektrischer Aktivität wird durch die ATP-sensitiven K^+ -Kanäle hergestellt. Sie sind spannungsunempfindlich und bleiben daher über einen weiten Spannungsbereich hinweg geöffnet (Jonas et al. 1991). In Situationen von geringer Energieversorgung sind die Kanäle geöffnet und bewirken eine Hyperpolarisation der Membran, was vor hochfrequenter Erregung und Energieverbrauch durch die Na^+/K^+ -Pumpe und einem resultierenden Leitungsblock schützt. Weitere spannungsunabhängige K^+ -selektive Kanäle mit einer sich schnell öffnenden und wieder schließenden Aktivität zwischen -100 mV und +40 mV werden als Flimmer- K^+ -Kanäle bezeichnet (Koh et al. 1992). Sie bilden das Ruhemembranpotential in dünnen, nicht myelinisierten Nervenfasern aus und werden durch Lokalanästhetika blockiert (Bräu et al. 1995).

1.4.3 IONENPUMPEN

Ionenpumpen sind Transmembranproteine, die primär energieabhängig unter ATP-Verbrauch arbeiten. Besonders hervorzuheben ist hierbei die Na^+/K^+ -Pumpe, die einen elektrogeneren Transport von drei Natriumionen im Verhältnis zu zwei Kaliumionen über die Membran durchführt. Dieser Vorgang trägt mit 5 bis 10 mV zum Ruhemembranpotential (s. u.) bei. Der Rest wird durch einen Kaliumkonzentrationsgradienten erzeugt, der zu einem Kalium-Efflux aus der Zelle führt.

1.4.4 DAS RUHEMEMBRANPOTENTIAL, DIE AUSBILDUNG VON AKTIONSPOTENTIALEN UND DEREN WEITERLEITUNG

Die Ionenkanäle ermöglichen einen Durchtritt von Ionen durch die Zellmembran von entweder außen nach innen (Influx) oder von innen nach außen (Efflux). Für die jeweiligen Ionen besteht ein elektrochemischer Gradient. Aus ihm folgt eine elektrochemische Triebkraft. Grundlage ist die chemische Triebkraft in Folge der Konzentrationsdifferenz (Konzentration innen $[X]_i$, Konzentration außen $[X]_a$) und die elektrische Triebkraft als Folge der

Potenzialdifferenz zwischen den Membranseiten. Liegt ein Gleichgewicht vor, so sind Import und Export gleich groß, zu einem Nettofluss kommt es nur bei einem Ungleichgewicht. Das Gleichgewichtspotential (E_x) für einen bestimmten Konzentrationsgradienten lässt sich für das jeweilige Ion X (Nettowertigkeit Z_x) mittels der Nernst-Gleichung berechnen. Hierbei sind weitere Faktoren wie die absolute Temperatur (T 310 K, entspricht 37 °C), die universelle Gaskonstante (R 8,314 J/[mol x K]) sowie die Faraday-Konstante (F 96487 C/mol) zu berücksichtigen.

$$E_x = \frac{R \times T}{Z_x \times F} \times \ln \frac{[X]_a}{[X]_i}$$

Oder in der vereinfachten Form:

$$E_x = \frac{61 \text{ mV}}{z} \times \log \frac{[X]_a}{[X]_i}$$

Das zu berechnende Ruhemembranpotential einer Zelle wird bedingt durch die relative Permeabilität der Membran für die einzelnen Ionen und ihrer einzelnen Gleichgewichtspotentiale. Weiterhin spielt die intra- und extrazelluläre Ionenverteilung eine entscheidende Rolle (Tabelle 1).

Tabelle 1: Ionenverteilung zwischen intra- und extrazellulärem Milieu. (nach Veech et al. 2019; Boron und Boulpaep 2016; Behrends et al. 2017)

	Intrazellulär [mM]	Extrazellulär [mM]
Na ⁺	10 – 15	130 – 150
K ⁺	140 – 155	3,5 – 4,5
Ca ²⁺	Ca. 0,5 x 10 ⁻⁴	1 (frei) – 2,5 (gesamt)
Mg ²⁺	1 (frei) – 9 (gesamt)	0,7 (frei) – 0,9 (gesamt)
Cl ⁻	4 – 20	100 – 130
HCO ₃ ⁻	5 – 15	20 – 30
Makromolekulare Anionen (Proteine, Aminosäuren)	130 – 155	4 – 10

Die relevantesten Ionen hierbei sind Natrium-, Kalium- und Chloridionen. In den meisten Fällen wird das Ruhemembranpotential von der Permeabilität für Kaliumionen bestimmt, wodurch es in der Nähe des Kaliumgleichgewichtspotentials liegt.

Berechnungsgrundlage für das Membranpotential aller permeablen Ionen ist die Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung:

$$E_x = \frac{R \times T}{F} \times \ln \frac{P_{Na} [Na^+]_a + P_K [K^+]_a + P_{Cl} [Cl^-]_i}{P_{Na} [Na^+]_i + P_K [K^+]_i + P_{Cl} [Cl^-]_a}$$

P beschreibt die Permeabilität, in [] sind die jeweiligen Konzentrationen angegeben.

Das Aktionspotential ist eine stereotype, schnelle Reaktion einer erregbaren Zelle auf spezifische Auslösemechanismen, wie sog. adäquate Reize bei primären Sinneszellen, an der Synapse gebildete Potentiale, Signaltransduktion oder Signalleitung über Gap junctions.

Durch den Einstrom von Natriumionen kommt es zu einer Depolarisation, im Sinne einer Positivierung des Membranpotentials. Bei Erreichen eines kritischen Schwellenwerts von ca. -50 mV kommt es zu einer schnellen, stark ausgeprägten Erhöhung der Leitfähigkeit für Natriumionen. Das Aktionspotential zeigt hierbei einen stereotypen Verlauf und nur bei unterschwelligen Reizen keine Veränderung, was zu der Formulierung des sog. „Alles-oder-nichts-Gesetz“ führte. Für sehr kurze Zeit wird das Potential stark positiv (ca. +30 mV, *overshoot*). Nach 1 – 2 ms nach Reizeintritt kommt es durch eine Konformationsänderung zwischen den Segmenten 3 und 4 zu einer Inaktivierung der Natriumkanäle, die erst nach einer Hyperpolarisation wieder die Auslösung eines aktivierten Zustandes ermöglicht. Dies ist die Hauptursache für die Repolarisation. Dieser Vorgang wird unterstützt durch die Öffnung von selektiven Kanälen für Kaliumionen, die dann einen Efflux von Kalium bedingen. Dies wird als Refraktärzeit der Zelle bezeichnet. Hierdurch wird die Frequenz von Aktionspotentialen der einzelnen Zellen begrenzt. Die Begrenzung ist notwendig, um eine nur unidirektionale Reizweiterleitung entlang des Axons zu ermöglichen. Die Refraktärzeit wird weiterhin in eine absolute Refraktärzeit, in der keine Aktionspotentiale ausgelöst werden können und eine relative, mit verkleinerten Potentialen durch zum Teil wieder geöffnete Natriumkanäle unterteilt, was in diesem Sinne eine Einschränkung des „Alles-oder-nichts-Gesetz“ darstellt (Boron und Boulpaep 2016; Debanne et al. 2011).

1.4.5 SALTATORISCHE ERREGUNGSLEITUNG

Zur Ansteuerung eines Muskels muss das Aktionspotential von seinem Ursprung im α -Motoneuron über die Nervenwurzel und den peripheren Nerven geleitet werden. Dies erfolgt zum Teil über relativ weite Strecken. Des Weiteren kommt es zu einem signifikanten Amplitudenabfall, der durch den elektrischen Widerstand entlang des Axons und das Auftreten von Leckströmen verursacht wird. Die rein elektrotonische Weiterleitung über Spannungsänderungen entlang der Zellmembran ermöglicht eine sehr hohe Geschwindigkeit über kurze Strecken. Die saltatorische Leitung kann diese jedoch noch beschleunigen und effizienter gestalten.

Durch den speziellen strukturellen Aufbau der Axone wird durch die isolierende Myelinscheide der Verlust der Amplitude und die Rolle von Leckströmen deutlich reduziert. Betrachtet man den Feinbau der myelinisierten Axone, dann nimmt der Faserquerschnitt mit dem Quadrat des Radius zu. Der innere Längswiderstand R_i nimmt dadurch in Längsrichtung ab. Es gilt für die Querschnittsfläche:

$$F = \pi \times r^2$$

Die Membranoberfläche kann sich elektrisch aufladen, was als Membrankapazität C_M bezeichnet wird. Bei größerem Faserdurchmesser steigt die Membranoberfläche linear mit dem Radius an, für den Umfang gilt: $U = 2 \times \pi \times r$. Somit ist die Weiterleitung bei Fasern mit größerem Durchmesser deutlich effizienter. Gleiches gilt für den Membranwiderstand R_M , der ebenfalls mit einer Zunahme des Durchmessers abnimmt. Verringert sich die Membrankapazität erhöht sich die Geschwindigkeit der Weiterleitung analog der Formel $T(\text{Zeit}) = R_M \times C_M$.

Mit der Formel $\Delta E_{\max}(x) = \Delta E_{\max}(0) \times e^{-x/\lambda}$ wird die maximale Spannungsänderung über die Strecke x ($\Delta E_{\max}(x)$) berechnet. Hierbei ist $\Delta E_{\max}(0)$ die Spannungsänderung am Startpunkt, x der Abstand von diesem Punkt und λ die Längskonstante. Diese ist definiert als die Distanz, bei der noch 37 % der anfänglichen Potentialdifferenz vorhanden ist (typischerweise zwischen 0,1 und 5 mm).

Die hohe Dichte von Ionenkanälen an den Schnürringen ermöglicht zusätzlich die Neuausbildung von Aktionspotentialen, dies wird auch als regenerative Erregungsleitung bezeichnet.

Die physiologische Typisierung der Nervenfasern erfolgt nach Leitungseigenschaften, übliche Einteilungen sind die nach Erlanger und Gasser (s. Tabelle 2) (Boron und Boulpaep 2016).

Tabelle 2: Faserklassen nach Erlanger und Gasser. (nach Boron und Boulpaep 2016)

Faserklasse Erlanger und Gasser	Myelinisierungsgrad	Durchmesser (µm)	Leitungsgeschwindigkeit (m/s)	Vorkommen
Aα	++	13 – 20	80 – 120	afferent: Muskelspindelafferenzen; efferent: α-Motoneurone
Aβ	+	6 – 12	33 – 75	afferent: Mechanorezeptoren der Haut
Aγ	+	3 – 6	12 – 30	efferent: Muskelspindelafferenzen
Aδ	+	1 – 5	5 – 30	afferent: Thermoafferenzen, nozizeptive Afferenzen
B	+	1 – 3	3 – 15	efferent: vegetative Fasern (präganglionär)
C	marklos	0,2 – 1,5	0,5 – 2,5	afferent: nozizeptive Afferenzen; efferent: vegetative Fasern (postganglionär)

1.4.6 DIE MOTORISCHE EINHEIT

Die kleinste funktionelle Einheit des Bewegungssystems des Menschen ist die motorische Einheit (*motor unit*, MU), bestehend aus dem Motoneuron mit Sitz im Rückenmark, einschließlich seiner Dendriten und seines Axons, dem Übergang zum Muskel über die sog. motorische Endplatte (*neuromuscular junction*, NMJ) und den vom Motoneuron versorgten Muskelfasern (Duchateau und Enoka 2011). Die motorischen Einheiten erzeugen hierbei Signale, die vom ventralen Horn des Rückenmarks über die ventrale Wurzel bzw. vom Hirnstamm über die Hirnnerven zum jeweiligen Zielmuskel laufen und dort zu einer Muskelaktivierung und so zu einer Kraftgenerierung führen. Die MU erhält absteigende und aufsteigende Signale, die auf ein einzelnes Neuron konvergieren. Die Folge ist die Integration dieser Signale und die Ausbildung eines Aktionspotentials am Axonhügel. Dieses wiederum

führt zu einer Aktivierung der innervierten Muskelfasern. Das Motoneuron erhält über die Dendriten, die über ausgeprägte Verbindungen mit bis zu 50.000 Synapsen verfügen, Signale. Über exzitatorische oder inhibitorische postsynaptische Potentiale kann anschließend die Ausbildung von intrazellulären Strömen im Motoneuron erreicht werden (Duchateau und Enoka 2011; Farina et al. 2016). Man bezeichnet die für die Versorgung eines Muskels zuständigen Motoneurone auch als Motonucleus oder Motoneuronenpool (Burke und Tsairis 1977; Heckman und Enoka 2012; Tomlinson und Irving 1977). Die Motoneurone für einen Muskel sind über einige wenige Segmente des Rückenmarks verteilt. Der Pool für die proximale Muskulatur liegt weiter ventral und lateral im Verhältnis zu denen, die die distale Muskulatur versorgen, der für anteriore Muskeln mehr lateral als der für posteriore Muskeln (Jessell et al. 2011).

Die Rekrutierung der MUs folgt einer hierarchischen Struktur. Jede MU hat hierbei eine individuelle Rekrutierungsschwelle. Sie ist abhängig von ihrer individuellen Reizschwelle und dem synaptischen Input. Primär werden kleine MUs mit niedriger Schwelle, die nur wenige Muskelfasern innervieren, rekrutiert, was für die meisten MUs zutrifft. Im Verlauf kommen dann bei höherer Kraftaufwendung größere MUs mit höherem Schwellenwert hinzu. Hierbei besteht eine Assoziation zwischen der Größe der motorischen Einheiten und der Maximalkraft, die von ihnen aufgewendet werden kann (Bawa et al. 2014; Henneman 1957). Am Beispiel eines Handmuskels (IOD I) wurde dieses Verhältnis genauer untersucht. Bei 120 nachgewiesenen MUs bestand ein Verhältnis von 21 bis zu 1770 zwischen MUs und innervierten Muskelfasern (Heckman und Enoka 2012).

Ähnliche Beziehungen und Verhältnisse scheinen auch bei den meisten anderen Muskeln des Menschen zu bestehen. Diese exponentielle Verteilung der Innervation von Muskelfasern über den gesamten Motoneuronenpool ist äußerst relevant. Hieraus resultiert die Notwendigkeit, zwischen den Aktionspotentialen der MUs im Vorderhorn des Rückenmarkes und den Muskelaktionspotentialen, die in der Elektromyographie-Aufzeichnung registriert werden, zu unterscheiden. Das Verhältnis und die Differenzierung werden dabei als *neural drive* bezeichnet (Farina et al. 2010). Die von den jeweiligen MUs versorgten Muskelfasern tragen die Bezeichnung *motor unit territory* und sind in Subsegmenten des Muskels angeordnet. Sie können 10 bis 70 % des Gesamtquerschnitts eines Muskels ausmachen und Werte zwischen 3 und 20 Fasern pro 100 Muskelfasern erreichen. Häufig durchspannen sie nicht den gesamten Muskel, sondern enden innerhalb eines Muskelfaszikels. Die aus der Kontraktion einzelner Muskelfasern resultierende Kraft wird durch mehrere Gewebeschichten des

Muskels über die Sehne auf den Knochen übertragen. Hierdurch werden Kontraktionsunterschiede und der Einfluss einzelner Muskelfasern auf die Gesamtkontraktion abgeschwächt.

Eine Kraftsteigerung wird durch eine höhere Anzahl rekrutierter MUs und einen Anstieg der Entladungsrates (*discharge rate*, DR) erreicht. Der Effekt dieser Mechanismen ist je nach Muskeltyp unterschiedlich stark ausgeprägt (Adrian und Bronk 1929; Duchateau und Enoka 2011; Farina et al. 2002; Farina et al. 2016; Heckman und Enoka 2012; Heckman et al. 2009; Kukulka und Clamann 1981). Die Rekrutierungsmuster sind hier allerdings nicht starr fixiert. Anpassungen und Modifikationen können mittels Trainings aufgabenspezifisch erfolgen (Desnedt und Gidiaux 1981; Thomas et al. 1986).

Wurden MUs rekrutiert können sie je nach Aufgabe unterschiedliche Entladungsmuster zeigen. Die Frequenzmodulation unterliegt dabei verschiedenen Einflussfaktoren. Hierzu gehören z. B. elektrische wie anhaltende Einwärtsströme in die Zelle, die sog. *persistent inward currents* (PIC) (ElBasiouny et al. 2010; Heckman et al. 2008; Heckmann et al. 2005). Sie führen zu einer Bistabilität der Zellen, die auch bei fehlendem Input ein gleichbleibendes Entladungsmuster ermöglichen. Zu den chemischen Modulatoren gehören Neurotransmitter wie die biogenen Amine (u. a. Serotonin, Noradrenalin, Dopamin) (Han et al. 2007).

Die Größe der MUs ist je nach anatomischer Region und Aufgabengebiet sehr unterschiedlich. Die Steuerung der Augenmuskulatur wird durch kleine MUs mit weniger als 100 Muskelfasern reguliert. Größere Einheiten mit bis zu 1000 MUs pro Muskel versorgen die unteren Extremitäten.

1.4.7 MECHANISCHE EIGENSCHAFTEN DER MUSKULATUR UND MUSKELKONTRAKTION

Die einfachste Form der Reaktion eines Muskels auf ein ankommendes Aktionspotential ist die Einzelzuckung, als Ausdruck der Erregung von nur einer Muskelfaser.

Auch beim Muskel existiert ein „Alles-oder-nichts-Prinzip“ in Bezug auf die Erregung einer einzelnen Faser. Der Ablauf der Einzelzuckung ist hierbei auch bei Wiederholungen identisch. Die Dauer der elektrischen Erregungsphase von nur wenigen Millisekunden gegenüber dem mechanischen Prozess, der 50 bis 500 Millisekunden dauern kann, ermöglicht die erneute Ausbildung eines Aktionspotentials bei noch nicht vollständig abgelaufener Muskelkontraktion. Löst dies eine weitere Muskelreaktion aus, spricht man von der sog. Superpo-

sition, was die Kraftentfaltung des Muskels steigern kann. Dies ist auch mit mehreren nacheinander eintreffenden Aktionspotentialen möglich. Fällt der Abstand der einzelnen eintreffenden Potentiale unter die Dauer von einem Drittel einer Einzelzuckung, wird die „Verschmelzungsfrequenz“ erreicht, die dann zu einer Dauerkontraktion oder „glattem Tetanus“ führt. Ist der Abstand des zweiten eintreffenden Aktionspotentials länger als ein Drittel einer Einzelzuckung spricht man von einem „unvollständigen Tetanus“. Eine Steigerung der Kraftentfaltung ist hierbei bis um den Faktor zehn möglich.

Der glatte Tetanus wird allerdings im Rahmen von willkürlichen Bewegungen üblicherweise nicht erreicht. Diese setzen sich aus mehreren Einzelzuckungen zusammen. Hierbei spielt die Entladungsfrequenz (*discharge rate*, DR) der MUs eine wichtige Rolle. Diese kann von einer Frequenz von 6 bis 8 Hz über eine zeitliche Aufsummierung gesteigert werden. Als weitere Möglichkeit kann eine Kraftsteigerung mittels Rekrutierung weiterer MUs erfolgen. Kleine motorische Einheiten können hierbei feiner abgestimmt werden als größere. Grundlegende Bedeutung bei der Muskelkontraktion hat die Einteilung in eine isotonische und eine isometrische Kontraktionsform. Im Rahmen der isotonischen Kontraktion verkürzt sich der Muskel und die Kraftentfaltung bleibt dabei konstant. Bei der isometrischen Kontraktion wiederum erfährt der Muskel keine Änderung der Länge, nur die Sehne würde ab einer bestimmten Kraftausübung gedehnt werden. Diese Kontraktionsform entspricht der Kontraktion der Haltemuskulatur des Bewegungsapparates.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 DIE ROLLE DER EXZITABILITÄT

Die Methode des *threshold-tracking* (s. u.) stellt ein auch im klinischen Alltag gut einsetzbares Verfahren zur Messung der Nervenexzitabilität dar und liefert so Informationen über die Funktion der Ionenkanäle der jeweils untersuchten motorischen Axone (Bostock et al. 1998; Burke et al. 2001; Kiernan und Bostock 2000; Kiernan et al. 2000; Kiernan et al. 2019).

Untersuchungen konnten zeigen, dass die Exzitabilität, die Eigenschaften der Erregbarkeit widerspiegelt, bei motorischen Axonen häufig Auffälligkeiten bei unterschiedlichen Formen von Neuropathien aufweist (Krishnan et al. 2009; Moldovan et al. 2009).

Die Beeinträchtigung der Exzitabilität scheint hierbei zum einen in der veränderten Myelinstruktur der Nerven zu liegen, d. h. den passiven Eigenschaften der Leitungsstrukturen, zum anderen in den spannungsabhängigen Eigenschaften, die sich auf die Leitfähigkeit und die Verteilung der Ionenkanäle beziehen. Dies konnte bisher für die CMT1A (Jankelowitz und Burke 2013; Nodera et al. 2004) wie auch für regenerative Prozesse bei peripheren Nervenschäden (Kiernan und Bostock 2000; Krarup und Moldovan 2009; Moldovan et al. 2009; Moldovan et al. 2016) gezeigt werden.

Die Veränderungen der Exzitabilität und ihre dazugehörigen Parameter konnten mittels einfacher *space-clamp*-Membran-Modelle (Bostock et al. 1991; Kiernan et al. 2005) mit einer Nodus-Internodus-Aufteilung untersucht werden (Liang et al. 2014; Moldovan et al. 2016). Aufgrund der äußerst komplexen Veränderungen ist allerdings die Bedeutung der einzelnen Parameter für die ablaufenden pathophysiologischen Prozesse der CMT-Erkrankung weiterhin nur unzureichend verstanden.

Das 1991 entwickelte mathematische „Bostock“-Modell basiert auf dem ursprünglichen Modell von Barrett und Barrett (Barrett und Barrett 1982). Es berücksichtigt Daten aus Exzitabilitätsstudien an peripheren Nerven und bezieht pharmakologische und genetische Messmethoden mit ein. Hiermit wurden bereits die Membraneigenschaften in einem Mausmodell der CMT1B-Erkrankung untersucht (Rosberg et al. 2016), wie auch an einem weiteren mathematischen Modell die Membraneigenschaften bei der CMT1A auf Grundlage eines Rat-

tenmodells (Sereda et al. 1996). Hier wurden nun die Ergebnisse in CMT1A-Patienten validiert. Die mathematische Modellierung wurde freundlicherweise durch die AG Moldovan/Krarup, Center for Neuroscience, Universität Kopenhagen durchgeführt.

2.2 ELEKTROPHYSIOLOGISCHES SETUP

Die Messdaten aus dem Tiermodell dienten als Grundlage für weitere Untersuchungen an CMT1A-Patienten und gesunden Kontrollen. Hierdurch sollte eine Verifizierung der Ergebnisse ermöglicht werden. Alle Patienten hatten eine im Vorfeld molekulargenetisch gesicherte CMT1A-Erkrankung mit einer *PMP22*-Duplikation. Die bestehende Neuropathie war hierbei mild ausgeprägt.

Bei der Exzitabilitätsmessung an Probanden und Patienten wurde der *N. medianus* auf Höhe des Karpaltunnels unter Verwendung von nicht-polarisierbaren Ag/AgCl-Klebelektroden (EKG-Elektroden, MPC International) stimuliert. Die Kathode wurde über dem Nerven am Karpaltunnel aufgebracht und die Anode 10 cm proximal davon an der Radialseite des Unterarms. Mittels Oberflächenelektroden über dem *M. abductor pollicis brevis* (APB) wurden die MSAPs registriert und mit einem isolierten Vorverstärker (D440, Digitimer) amplifiziert. Als Referenz wurde eine Oberflächenelektrode auf der distalen Phalanx des Daumens platziert. Als isolierter Stimulator diente ein DS5-Digitimer in Verbindung mit einem Multifunktions-Datenmesssystem (NI USB-6251, National Instruments), durch den ein bipolarer, konstanter Stromreiz abgegeben wurde.

Mögliche Störsignale (*noise*) wurden mittels eines *on-line noise-eliminator* (HumBug 50/60Hz Noise Eliminator, Quest Scientific) herausgefiltert.

Die gesamte Datenerhebung an Patienten und Probanden erfolgte mit einer schriftlichen Einverständniserklärung und auf Grundlage guter klinischer Praxis sowie in Konformität mit der Deklaration von Helsinki in der auf der Website des Journal of the American Medical Association zugänglichen Version von 2013 (Ethikantrag 20/2/12, UMG).

2.2.1 ÜBERSICHT UND AUFBAU DES EINGESETZTEN MESSPROTOKOLLS

Es wurden wiederholte Erregbarkeitsmessungen des *N. medianus* in einer Reihe von fünf CMT1A-Patienten (Durchschnittsalter 50 Jahre), die eine milde Neuropathie aufwiesen,

durchgeführt. Anwendung fand hierbei das QTRAC *threshold-tracking system* (version 15/4-2013, Copyright Professor Hugh Bostock, UCL Institute of Neurology, London, UK). Als gesunde Kontrollen wurde das eigene erhobene normale Referenzmaterial, das im Vorfeld von 29 Probanden gesammelt wurde (NC29: Altersmittel 40 Jahre), verwendet (Kiernan et al. 2000). Während des TRONDNF-Protokolls wurde der Schwellenstrom, der zum Hervorrufen eines submaximalen Zielpotentials erforderlich ist, welches auf etwa die Hälfte des maximalen CMAP (negative Phase) eingestellt ist, automatisch durch ein *trial-and-error-computer-feedback* verfolgt. So konnten mehrere Erregbarkeitsmessungen nacheinander durchgeführt werden. Diese waren die *strength-duration relationship* zur Messung der *strength-duration* (Stärke-Dauer)-Zeitkonstante und des Rheobasenstroms. Dieser ist definiert als ein überschwelliger Reiz mit einer unendlichen Dauer. Weitere Messungen waren der *threshold electrotonus* und die *current-threshold relationship*, die zusammen die Akkommodation wie auch die Gleichrichtungseigenschaften der internodalen Membran widerspiegeln wie auch die Wiederherstellung der Erregbarkeit nach Fortleitung des Aktionspotentials (Refraktärperiode, Supernormal- und späte Subnormalphase). Aus diesen Erregbarkeitsmessungen können wiederum verschiedene Erregbarkeitsindizes abgeleitet werden, die im Folgenden bei ihrer jeweiligen Verwendung beschrieben werden (Kiernan et al. 2001). Alle modellierten Erregbarkeitsmaße sind in den Abbildung 7 und 8 (s. u.) dargestellt. Es ist zu beachten, dass die Temperatur bei Modellierung unverändert bei 304,8 K (31,65 °C) (Howells et al. 2012) belassen wurde, was einem NC29-Mittelwert von 32,31 °C und einem CMT1A-Mittelwert von 31,4 °C entspricht.

Nach der Festlegung eines angemessenen Zeitfensters, der *baseline* und der *stimulus-response curve* wurde die CMAP-Zielamplitude bei 40 % erfasst und die für die Evozierung des CMAP notwendige Stimulusintensität als sog. „0 % Änderung der Reizschwelle“ festgelegt.

In Graphen des *threshold tracking* werden die relativen Veränderungen der Stimulusintensität dargestellt, die nach einem unterschwellig depolarisierenden oder hyperpolarisierenden Konditionierungsreiz benötigt werden, um 40 % der CMAP-Amplitude auszulösen. Zudem können die Konditionierungsstimuli auf der y-Achse als Anteil der *threshold reduction* (TE), *threshold change* (RC) oder *current in percent threshold* (IV) abgelesen werden.

In diesem Zusammenhang bedeuten 0 % die sog. *baseline excitability*. Diese spiegelt die Stimulusintensität wider, welche ohne einen Konditionierungsreiz für das Erreichen der Ziel-CMAP-Amplitude benötigt wird.

Die *strength-duration time constant* (SDTC) legt das Verhältnis zwischen Stimulusdauer und Stimulusstärke fest. Hierbei wird getestet, welche Stimulusstärke appliziert werden muss, um bei einer jeweils variierenden Stimulusdauer dieselbe CMAP-Antwort hervorzurufen.

In der Regel wird bei einer kürzeren Stimulusdauer ein stärkerer Stimulus benötigt. Beim TRONDNF-Protokoll werden fünf Stimuli mit schrittweiser Abnahme der Stimulusdauer von 1,0 ms auf 0,8 ms, 0,6 ms, 0,4 ms und 0,2 ms appliziert.

Mittels der Weiss` Gleichung kann die Reizspannung (mA x ms) gegen die Stimulusdauer aufgetragen werden und die x-Ableitung der linearen Regression der Messpunkte bestimmt dann den SDTC-Wert (Bostock 1983; Weiss 1901).

Der Einfluss der Natriumströme auf den SDTC kann unter Nutzung des *latent addition protocols* (LA) untersucht werden (Bostock und Rothwell 1997). Hierbei ist der Abfall des Reizschwellenanstiegs, gefolgt von einem stark hyperpolarisierenden Stimulus (90 % der Reizschwelle), die Summe aus zwei Exponenten, die der passiven (schnellen) und aktiven (langsamen) Komponente der Zeitkonstante entsprechen.

Die Reizschwelle wird durch die langsame Komponente (gemessen als LA 0,2 ms), die in einem Zeitabstand von 0,2 ms auf den Stimulus folgt, bestimmt.

Beim Protokoll des *threshold electrotonus* (TE) werden die Axone depolarisierenden und hyperpolarisierenden Stimuli unterhalb der Reizschwelle ausgesetzt. Es wird der gleiche Konditionierungsstimulus (+40, +20, -20, -40 und -70 % der Intensität des Stimulus, der 40 % der Ziel-CMAP Amplitude ausgelöst hat) jeweils vor dem Teststimulus appliziert. Mit einer schrittweisen Zunahme von jeweils 10 ms, steigen die Intervalle von 0 auf 200 ms an.

Das TE-Protokoll mit einer Intensität von -70 %, testet Konditionierungsstimuli zwischen 0 und 300 ms.

Die *current-threshold-relationship* (IV) testet die Antwort des Axons auf 200 ms lange Konditionierungsstimuli mit variierender Intensität von +50 % bis zu -100 % des Stroms, der im Vorfeld das Ziel-CMAP auslösen konnte. Diese Intensität wird in Intervallen von -10 % angezeigt. Der Konditionierungsstimulus wird als Prozent des Stroms des Ziel-CMAP auf der y-Achse gegen die Änderung des Stroms zur Evozierung des Ziel-CMAP nach jedem Konditionierungsstimulus (% *threshold reduction*) aufgetragen.

Für den *recovery cycle* (RC) wird ein einzelner supramaximaler Stimulus mit einer Dauer von 1 ms mit abnehmenden Zeitintervallen vor dem jeweiligen Teststimulus abgegeben. Hierbei wird das *interstimulus interval* (ISI) als logarithmische Skala auf der x-Achse aufgetragen, mit hierbei abnehmenden Zeitintervallen von 200 bis 1,5 ms. Die jeweilige Reizschwellenänderung wird in Prozent, verglichen mit dem Strom zur Auslösung eines 40 % Ziel-CMAP, auf der y-Achse aufgetragen.

Werte unter einem ISI von 2,5 ms werden als relative Refraktärzeit angesehen (*relative refractory period*, RRP). ISIs, die eine größere Antwort als das Ziel-CMAP ausgelöst haben und dadurch einen reduzierten Strom benötigen, um die gleiche Antwort zu erzeugen, gelten als „Superexzitabilität“.

2.2.2 MATHEMATISCHE MODELLIERUNG MYELINISierter AXONE

Zur experimentellen Modellierung von Ionenkanälen stehen verschiedene bereits etablierte Modelle zur Verfügung. Bei Anwendung der Hodgkin-Huxley-Differentialgleichung (Hodgkin und Huxley 1952) und dem „Bostock-Modell“ (Bostock et al. 1991) werden transiente und persistierende Na^+ -Ströme, langsame und schnelle K^+ -Ströme, sowie einwärts gleichrichtende und passive Leck-Ströme berücksichtigt. Diese sind verteilt über unterschiedliche nodale und internodale Membranabschnitte mit unterschiedlicher Kapazität und verbunden mittels eines sog. Barrett-Barett-Widerstands (Barrett und Barrett 1982).

Betrachtet man das Modell im Gleichgewichtszustand, so werden die residuellen nodalen und internodalen Ströme des Ruhemembranpotentials durch die Na^+/K^+ -Pumpe bedingt und auch aufrechterhalten.

Hierbei wurden die Gleichungen und Parameter einer kürzlich erneuerten Version des Modells, das auch die biophysikalischen Unterschiede zwischen myelinisierten motorischen und sensiblen Axonen berücksichtigt (Howells et al. 2012), angewendet. Das Modell findet sich in dem Protokoll MEMFIT wieder, einem Teil von QtracP (Version 15/4-2013, Copyright Professor Hugh Bostock).

Freundlicherweise wurde die mathematische Modellierung durch die AG Moldovan, Center for Neuroscience, Universität Kopenhagen, durchgeführt. Mittels der Software können mehrere Parameter miteinander verglichen und optimiert werden. Dies ermöglicht es, Unterschiede zwischen dem *output* des Modells und der gemessenen multiplen Exzitabilität zu

reduzieren. Wichtig zu erwähnen ist, dass die vorliegende Untersuchung die Veränderungen in allen Modellparametern untersucht hat, die das Membranpotential, die passiven elektrischen Eigenschaften und die spannungsabhängigen Leitungseigenschaften betreffen. Die Öffnungskinetik der Ionenkanäle wurde konstant gehalten und nicht verändert.

Die Unterschiede zwischen der Modellanpassung und den tatsächlichen Werten wurden als gewichteter Durchschnittswert der folgenden Fehlergleichung erfasst:

$$([X_m - X_n] / S_n)^2$$

wobei X_m den geänderten Wert, X_n den Durchschnitt und S_n die Standardabweichung der gemessenen Werte der Nerven angibt. Diese Gewichtung ist notwendig, da die Anzahl an Parametern wie auch die jeweilige Sensitivität, Änderungen im Membranpotential zu erfassen, zwischen den einzelnen Exzitabilitätsmessungen variiert. Bei dieser Untersuchung wurde das totale Gewicht von vier verschiedenen Exzitabilitätsmessungen in dem folgenden Verhältnis gewertet: *threshold electrotonus*, *current-threshold relation*, *recovery cycle* und *strength-duration properties* mit den Verhältnissen 2:1:1:0,5

Die niedrigere Gewichtung der *strength-duration properties* ist dem Fakt geschuldet, dass die Rheobase nicht modelliert werden kann (die Ladung für einen Stimulus von einer Millisekunde ist üblicherweise eins).

Die Optimierung der Parameter wurde als ausreichend angesehen, wenn zwischen dem Modell und den Messungen ein Unterschied von mehr als 66 % registriert wurde. Diese Unterschiedsschwelle wurde sowohl für die tierexperimentelle Auswertung als auch für die auf Probanden basierten Daten genutzt.

2.2.3 GRUNDLAGEN DER ELEKTROMYOGRAPHIE UND ANWENDUNG DER MULTI-UNIT-ELEKTROMYOGRAPHIE BEI CMT1A-PATIENTEN UND GESUNDEN PROBANDEN

Die Elektromyographie (EMG), durchgeführt mit einer Nadelelektrode, ist ein etabliertes Verfahren in der neurologischen Funktionsdiagnostik. Durch ihre Anwendung können wichtige Informationen im Rahmen der Diagnostik von neuromuskulären Erkrankungen gewonnen werden. Sie ermöglichen die Untersuchung des peripheren Nervensystems hinsichtlich der sensiblen Nerven einschließlich der sensiblen Ganglien, der motorischen Einheiten und

ihrer Vorderhornzellen, weiterhin der motorischen Nerven einschließlich der neuromuskulären Endplatten und des Muskels selbst. Die korrekte Auswahl des Untersuchungsverfahrens wie auch die Garantie einer hohen Datenqualität sind hierbei essentielle Voraussetzungen. Hierdurch ist häufig ein Verständnis der zugrundeliegenden Pathophysiologie und eine Lokalisation der Prozesse möglich (Katirji et al. 2013).

Die Elektromyographie erlaubt es, die Summenaktionspotentiale motorischer Einheiten abzuleiten (Heckman und Enoka 2012; Martinez-Valdes et al. 2017; Merletti et al. 2008; Rau und Disselhorst-Klug 1997; Reaz et al. 2006). Unter der Verwendung von monopolarer oder konzentrischen Nadeln kann die Einstichaktivität beurteilt werden. Weiterhin erfasst sie Formen der physiologischen wie auch pathologischen Spontanaktivität. Hierzu gehören u. a. komplexe repetitive Entladungen, Fibrillationen und myotone Potentiale (Katirji et al. 2013). Es wird ein Feldpotential gemessen, das der Summe aller extrazellulär ableitbaren Ströme entspricht. Im klinischen Alltag sind bisher invasive Verfahren am weitesten verbreitet. In der praktischen Anwendung muss dabei immer der Nutzen des Verfahrens gegenüber den jeweiligen Risiken und Belastungen des Patienten abgewogen werden. Wichtige technische Limitationen der jeweiligen Methode entstehen bei der Übertragung zwischen den Elektroden und den Muskelfasern durch die Größe des sog. Volumenleiters. Entscheidend ist hierbei der Durchmesser des Gewebes der die beiden Komponenten voneinander trennt. Die invasiven Verfahren verringern diesen Abstand und führen so zu deutlich selektiveren Ableitungen einzelner MUs mit höherer Auflösung. Diese Methode ist allerdings schmerzhaft und kann zu Komplikationen wie Blutungen oder Infektionen führen. Bei Patienten unter einer Antikoagulation ist besondere Vorsicht geboten (Lynch et al. 2008; Merletti und Farina 2009; Merletti et al. 2008). Wird die EMG alternativ über eine Oberflächenelektrode abgeleitet, bekommt der Durchmesser des Volumenleiters eine höhere Relevanz und die zeitliche wie auch räumliche Auflösung wird herabgesetzt. Um diese Methode trotz allem effizient einsetzen zu können, ist es notwendig, moderne Algorithmen zur Analyse zu entwickeln, die den Einsatz invasiver wie auch nicht-invasiver Verfahren deutlich effizienter gestalten können. Diese Methoden finden aktuell vornehmlich in der klinischen- und Grundlagenforschung Anwendung. Sie sind die Basis der hier durchgeführten Untersuchungen und sollen im Folgenden genauer erläutert werden (Drost et al. 2006; Farina und Holobar 2015; Hogrel 2005; Holobar et al. 2009; Martinez-Valdes et al. 2016; Martinez-Valdes et al. 2017; Merletti et al. 2008; Reaz et al. 2006).

Grundlage der durchgeführten Messungen ist die Ableitung einer hochauflösenden Multikanal-Oberflächen-EMG (HD-sEMG) des *M. tibialis anterior* (TA) (Abb. 1).

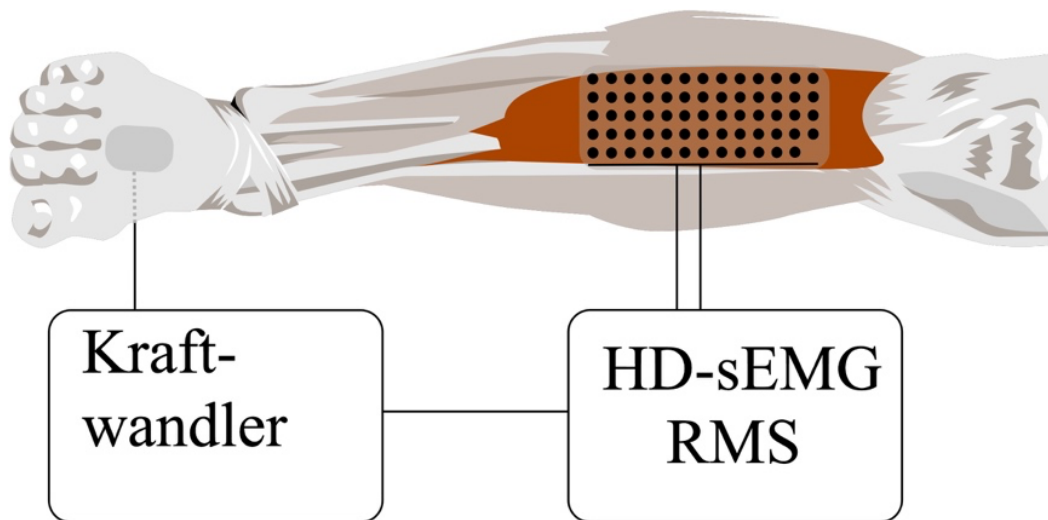


Abbildung 1: EMG-Ableitung. Die Ableitung der hochauflösenden Mehrkanal-Oberflächen-Elektromyographie (*high-density surface electromyography*, HD-sEMG) und der entsprechenden Gesamtamplitude gemessen als quadratisches Mittel (*root mean square*, RMS) erfolgte vom *M. tibialis anterior* mit einem fest definierten Abstand, um die sog. *active zone* auszusparen (Details. s. Material und Methoden). Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung von Dr. med Dirk Czesnik (AG Czesnik, UMG).

Zielsetzung war die Untersuchung des Rekrutierungs- und Entladungsverhaltens von MUs während einer isometrischen willkürlichen Kontraktion.

Eine direkte Korrelation zwischen dem Entladungsverhalten des Muskels und der erzeugten Kraft kann dadurch ermittelt werden (Farina et al. 2016; Negro et al. 2009). Hier wurde die HD-sEMG-Ableitung und MU-Dekomposition (Negro et al. 2016) bei Gesunden und Patienten angewendet, um das *rate coding* (Feuerrate), das Rekrutierungsverhalten und die Rolle der Reinnervation zu analysieren. Hypothese war dabei, dass Änderungen der geschwindigkeitsabhängigen Kodierung der Motoneurone mit der klinisch bewerteten Schwere der Erkrankung korrelieren.

In dieser Studie wurden zehn CMT1A-Patienten (CMT1A) und zehn gesunde, altersentsprechende Kontrollen (HC) mittels HD-sEMG untersucht. Im Vorfeld wurde eine Einwilligungserklärung von den Patienten und Probanden unterschrieben. Die Standards der guten klinischen Praxis wurden eingehalten. Alle Untersuchungen fanden in Übereinstimmung mit

der Deklaration von Helsinki in der Version von 2013 und unter Genehmigung der Ethikkommission der Universitätsmedizin Göttingen statt (Ethikantrag 23/6/14, UMG).

Eine Oberflächen-EMG mit hoher räumlicher Auflösung wurde aufgezeichnet, während die Probanden eine motorische Aufgabe durchführten. Diese bestand in einer isometrischen, willkürlichen Kontraktion des TA im Sinne einer Dorsalflexion. Der TA ist als Muskel für Untersuchungen leicht zugänglich. Weiterhin spielt er eine wichtige Rolle bei der Fußbewegung wie auch der Gangstabilisierung. Abgeleitet wurde das Muskelpotential über eine Matrix aus 64 (13x5) Elektroden mit einem Abstand von 8 mm zwischen den Elektroden und einer fehlenden Elektrode oben links (ELSCH064NM2, OT Bioelettronica, Turin, Italien). Aufgebracht und fixiert wurde die Elektrodenmatrix durch eine Klebeelektrode. Zur Vorbereitung der jeweiligen Messung wurde die *Array*-Elektrode gereinigt und eine biadhäsive Schaumstoffschicht (KITAD064NM2, OT Bioelettronica, Turin, Italien) direkt über dem Zielmuskel auf die Haut aufgebracht. Diese wurde mit einem leitfähigen Gel (Ten20, Neurodiagnostic Electrode Paste, WEAVER, Company, Nucla Way, Colorado USA) befüllt. Die Probanden wurden gebeten, im Vorfeld der Messung die Beinhaare zu rasieren oder zu kürzen, um die Signalaufnahme zu verbessern (im technischen Sinne Erhöhung des Signal-Rausch-Abstandes, bzw. Verhältnisses). Zusätzlich wurde die Haut in diesem Areal mit gängigen Methoden entsprechend präpariert. Hierzu gehörte die Aufräuhung mittels Schleifpapiers und eine Desinfektion mit Alkohol. Positioniert wurde die Messelektrode auf dem Muskelbauch des TA auf einer geraden Linie zwischen *Malleolus medialis* und der *Tuberositas tibia*.

Während der Messungen wurden die Probanden auf einer Untersuchungsfläche gelagert, das rechte Bein war dabei vollständig im Knie ausgestreckt. Der Fuß wurde in einem Ergometer, ähnlich dem NEG1-Knöchelergometer (v1.0, OT Bioelettronica, Turin, Italien) platziert und in Plantarflexion mit einem 45-Grad-Winkel im Knöchel an einem Pedal festgeschnallt. Weitere Fixierungen wurden an Knie und Knöchel angebracht, um die Beteiligung anderer Muskelgruppen als die des untersuchten Muskels an der Kraftausübung zu verhindern. Die Position wurde dabei im Verlauf der Messung nicht geändert. Das Pedal war an der Vorrichtung fixiert und übertrug die ausgeübte Kraft über einen kalibrierten Kraftmesser (CCT-Wandler, TF 02 Range KG:100, S/N:9965, Sens.:1.714 mV/V, Turin, Italien). Hieran wiederum wurde ein Gerät zur Digitalisierung angeschlossen (NI USB-6251, 8 Eingänge, 16 Bit, 1,25 MS/s, Multifunktions-E/A mit korreliertem digitalen E/A für USB, National In-

struments, Austin, Texas, USA). Es übertrug die aufgezeichneten Signale an den Stimulationscomputer sowie gleichzeitig an den Aufnahmecomputer. Eine konventionelle Ag/AgCl-Klebelektrode (EKG-Elektroden, MPC International S.A., Luxemburg) wurde als Erdungselektrode auf dem *Malleolus medialis* platziert. Alle Elektroden waren bei der Messung an einen Verstärker angeschlossen (TMSi, Refa_Ext, 72-Kanalsystem, ANT neuro 2010, Enschede, Niederlande). Die Aufzeichnung der EMG-Signale erfolgte unter Verwendung der ASA Software (Version 4.7.3, ANT neuro, Enschede, Niederlande). Es wurde ein monopolarer Modus mit einer fixen Abtastrate von 2048 Hz eingestellt, anschließend wurden die Daten über eine FUSBI-Box (TMSi, ANT neuro 2010, Enschede, Niederlande) an den Aufnahmecomputer übertragen. Ein Bildschirm für die visuelle Darstellung der erzeugten Kraft wurde in Augenhöhe der Probanden bzw. der Patienten in etwa einem Meter Entfernung platziert (Abb. 2).

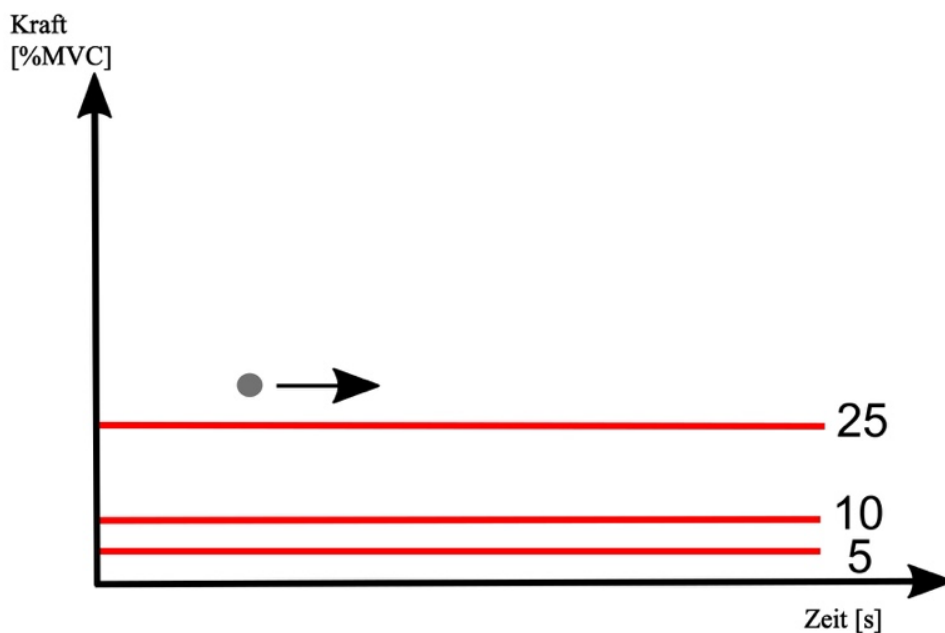


Abbildung 2: Visualisierung der Kraftmessungen. Die Probanden/Patienten führten drei isometrische Kontraktionen für jede Kraftstufe 5, 10 und 25 % der Maximalkontraktion (*maximal voluntary contraction, MVC*) durch. Die Zielkraft wurde mit einem schwarzen Punkt auf einem Bildschirm visualisiert, der sich entsprechend der ausgeübten Kraft auf dem Bildschirm in vertikaler Richtung bewegte. Dieser lief von links nach rechts, ein Durchgang entsprach 30 Sekunden. Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung von Elisabeth Veiz, M.Sc. (AG Czesnik, UMG).

Vor den Messungen wurden einige kurze Testversuche durchgeführt, damit die Teilnehmer sich mit den Aufgaben und dem Protokoll vertraut machen konnten. Nach der Trainingsphase führten die Probanden für die Dauer von einigen Sekunden eine maximale Kontraktion des TA durch. Hierbei wurde dann die maximale willkürliche Kontraktion (*maximal voluntary contraction*, MVC) aufgezeichnet. Dies wurde dreimal wiederholt. Der höchste gemessene MVC-Wert wurde dann als Kraftniveau von 100 % festgelegt. Anschließend mussten die Probanden die gleiche Aufgabe mit 5, 10 und 25 % ihrer maximalen Kraft durchführen. Zur Unterstützung wurde auf dem Bildschirm für jeden Versuch eine rote Linie in unterschiedlichen Höhen, entsprechend dem Zielkraftniveau dargestellt. Die Probanden wurden aufgefordert, einen schwarzen Punkt, der sich von links nach rechts über den Bildschirm bewegte, mittels der Dorsalflexion auf der angezeigten Linie zu halten. Die Aufgabe dauerte etwa eine Minute. Entsprechend dem Protokoll wurde jedes Kraftniveau dreimal aufgezeichnet. Die Reihenfolge wurde pseudo-randomisiert, um Trainingseffekte für die jeweiligen Stufen zu verhindern. Zwischen den Versuchen wurde eine Pause von mindestens einer Minute eingelegt. Hierdurch sollte eine ausreichende Erholung des Muskels ermöglicht und ein Auftreten von Fatigue verhindert werden. Die Dokumentation von Reihenfolge und Kraftniveaus erfolgte handschriftlich auf einem Protokoll.

2.2.4 ABLAUF DER EMG-DATENANALYSE UND DEKOMPOSITIONS-ALGORITHMUS: *BLIND-SOURCE-SEPARATION*

Initial wurde eine Vorverarbeitung der EMG-Signale unter Verwendung der Software Matlab (Simulink, Version R2018a) durchgeführt. Die hierzu verwendeten Skripte wurden dankenswerterweise von Dr. Francesco Negro (Department für klinische und experimentelle Forschung, Universität Brescia, 25123 Brescia, Italien) geschrieben und im Rahmen einer Kooperation zur Verfügung gestellt. Als Grundlage der Dekompositionsanalyse wurde für jedes Kraftniveau ein Abschnitt mit mindestens 30 Sekunden Dauer aus einer stabilen Phase der jeweiligen isometrischen Kontraktion selektiert.

Die vorverarbeiteten EMG-Signale der isometrischen, willkürlichen Kontraktionen wurden von Dr. Francesco Negro unter Verwendung eines vollautomatischen *blind-source-separation*-Algorithmus dekomponiert (Negro et al. 2016). Dieser Algorithmus kombiniert die Methoden der allgemeinen *blind-source-separation*, einer *fast fixed-point convolutive independent component*-Analyse und der *convolutive kernel compensation* (Chen und Zhou 2016; Holobar und Zazula 2007; Merletti et al. 2008; Negro et al. 2016; Thomas et al. 2006). Diese

Methoden und Verfahren sind bereits zur Auswertung und Analyse von unterschiedlichen Kontraktionen mit unterschiedlichen Kraftniveaus validiert worden (Chen und Zhou 2016; Holobar et al. 2010; Negro et al. 2016). Einer der Hauptvorteile des Dekompositionsalgorithmus ist seine Fähigkeit, Impulsfolgen derselben MUs zu schätzen, die auf unterschiedlichen Kraftniveaus aktiv waren. Hierdurch kann die Modulation der DR besser quantifiziert werden. Dennoch bringt diese Optimierung auch Nachteile mit sich. Aufgrund der unterschiedlichen Rekrutierungsschwellen von MUs, die zu einer fehlenden Vergleichbarkeit zwischen den Kraftniveaus führen, lässt sich das Verfahren in einem breiteren Kräftebereich schlechter anwenden. Willkürliche wie auch unwillkürliche Bewegungen mit höheren oder niedrigeren Kräften hätten daher vorübergehend die Rekrutierung von MUs während der anhaltenden isometrischen Kontraktionen bewirkt, wodurch die Präzision der Analyse eingeschränkt worden wäre. Aus diesem Grund wurden extreme Bewegungsartefakte im Vorfeld der Auswertung ausgeschlossen. Darüber hinaus konnte die Dekomposition für einige Probanden nur eine sehr geringe Anzahl an gemeinsamen MUs schätzen. Dies beeinflusste die statistische Aussagekraft, da die DRs aller MUs gewichtet und zusammengefasst wurden, um für jeden Teilnehmenden eine zentrale Tendenz darzustellen.

Das aufgezeichnete HD-sEMG-Signal entspricht einer Mischung von Muskelsummenaktionspotentialen. Es kommt hierbei zu zeitlichen Überlagerungen von einzelnen Wellen, was eine Identifizierung einzelner MUs anhand der Form ihrer Aktionspotentiale nahezu ausschließt. Allerdings kann durch die Kombination von Angaben über die zeitlichen und räumlichen Eigenschaften wie auch die Wahrscheinlichkeit zur Überlappung einzelner Potentiale ein sog. *sparse pulse train* für die jeweilige MU geschätzt werden (Abb. 3, 4).

Um die Überlappung der Wiederholungen einzelner Wellenformen so niedrig wie möglich zu halten, werden Impulsfolgen dabei entweder als höchstens schwach korreliert oder als ganz statistisch unabhängig betrachtet (Farina und Holobar 2015; Negro et al. 2016). Daher interpretiert der Algorithmus das Signal als eine überlappende/konvolutive Mischung von einzelnen Deltafunktionen, die die Auslösezeitpunkte der jeweiligen *motor unit action potentials* (MUAP) über einen zeitlichen Verlauf wiedergeben (Farina und Holobar 2015; Holobar und Zazula 2007; Holobar et al. 2010; Negro et al. 2016). Ziel ist es, eine möglichst hohe Anzahl von aufeinanderfolgenden MUs zu identifizieren. Hierfür werden erweiterte (zeitverzögerte) Versionen der beobachteten Matrix erstellt. Die notwendige Anzahl dieser ergänzenden Versionen orientiert sich dazu an der Dauer der MUAPs und der Anzahl der Quellen (Holobar und Zazula 2007; Negro et al. 2016).

Die *sparse deflation method* wird anschließend verwendet, um eine Konvergenz zur gleichen Quelle zu vermeiden (Martinez-Valdes et al. 2017; Negro et al. 2016). In einem ersten Schritt des Algorithmus wurden die Daten transformiert (*spatial whitened*). Anschließend wurde ein *fixed-point*-Algorithmus und eine Gram-Schmidt-Orthogonalisierung durchgeführt (Hyvärinen und Oja 1997; Negro et al. 2016; Thomas et al. 2006). Des Weiteren wurde ein *peak-detection* mit einem *k-means*-Algorithmus zur Vektorquantisierung angewendet. Zusätzlich wurden iterative Verfahren zur Erhöhung der Genauigkeit eingesetzt (Holobar und Zazula 2007; Holobar et al. 2010; Negro et al. 2016; Wang und Bai 2016). Ein Silhouetten-Vergleich (*silhouette measure*, SIL) kam zur Anwendung, um die Genauigkeit der *Cluster*-Zuordnung zu überprüfen. Dies diente der Analyse der Zuverlässigkeit der Methode. Dabei wurden nur Quellen in die Auswertung eingeschlossen, deren SIL einem Wert, der größer 0,90 war, entsprach (Negro et al. 2016).

Eine Möglichkeit, die Unterschiede zwischen den MUs zu vergleichen, besteht darin, dieselbe MU bei unterschiedlichen Kraftniveaus zu verfolgen. Hierbei wurden jeweils zwei Kraftstufen gepaart (s. u.), um die Aktivität einer MU auf unterschiedlichen Stufen gemeinsam zu dekomponieren.

Der Algorithmus sucht Gruppen von MUs, die mit hoher Wahrscheinlichkeit in den aufgezeichneten Daten wiederzufinden sind. Dann wurde das oben genannte Verfahren mit den folgenden Paaren durchgeführt: Kompositionspaar 5_10 (K/5_10): niedrige Kraftstufe 5 % verglichen mit hoher Kraftstufe 10 %, Kompositionspaar 10_25 (K/10_25): niedrige Kraftstufe 10 % verglichen mit hoher Kraftstufe 25 %.

Die dekomponierten Daten wurden mittels eines Matlab-Skripts in enger Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Dr. Francesco Negro (Department für klinische und experimentelle Forschung, Universität Brescia, 25123 Brescia, Italien) und mit Elisabeth Veiz, M.Sc. (AG Czesnik, UMG) analysiert. Für jeden Probanden/Patienten wurden drei Versuche pro Bedingung K/05_10 und K/10_25 bewertet. Dieses Vorgehen hat sich in Bezug auf die Rekrutierungsschwellenwerte als sinnvoll und effizient erwiesen (Carpentier et al. 2001; Oya et al. 2009). Die jeweiligen Entladungsraten der MU wurden dann aus dem Kehrwert ihrer *Interspike*-Intervalle in Impulsen pro Sekunde umgerechnet.

2.2.5 ANALYSE DER DEKOMPONIERTEN DATEN

Die Daten der dekomponierten MUs wurden manuell anhand ihrer geschätzten jeweils aktuellen DRs geordnet. Hierbei wurden MUs mit sehr instabilen DRs, also einer hohen Variabilität der Feuerrate im Verlauf, verworfen. Diese Instabilität wird mit hoher Wahrscheinlichkeit durch eine Quellenüberlagerung hervorgerufen. Um eine hohe Qualität der Daten zu gewährleisten, wurden die jeweiligen MUs ausgewählt, bei denen der kleinste Unterschied zwischen Zielkraft (5, 10 oder 25 %) und tatsächlich ausgeübter Kraft bestand. In der Studie war die Modulationsfähigkeit der MUs eine wichtige untersuchte Funktion. Hierfür wurden für jedes Kraftniveau und jede MU die mittlere DR, der dazugehörige Variationskoeffizient (CoV), die Zwischenraumintervalle (CoVISI) und die ausgeübte Kraft (CoVF) berechnet. Berechnungsgrundlage für den Koeffizienten war die Division der Standardabweichung (SD) mit dem Mittelwert. Ergänzend wurde die Rekrutierung aller MUs indirekt durch Berechnung des quadratischen Mittels (*root mean square*, RMS) über die gesamte Feldaktivität und alle Kraftniveaus hinweg errechnet. Zusätzlich wurde dessen Variation (i. S. der Steigung) als Funktion des Kraftniveaus ermittelt.

2.2.6 REKRUTIERUNGSVERHALTEN

Die Rekrutierung der MUs wurde indirekt über den RMS der globalen EMG-Amplitude auf verschiedenen Kraftstufen quantifiziert (Falla und Farina 2008; Farina et al. 2004). Es ist Gegenstand aktueller Diskussionen, inwiefern die globale EMG-Amplitude Rekrutierungsstrategien darstellt (Del Vecchio et al. 2017; Farina et al. 2004). Die Rekrutierung der MUs wurde über die Aktivität der Gesamtelektroden, durch die Berechnung des mittleren quadratischen Mittelwerts der MVC und der Kraftniveaus von 5, 10 und 25 % erfasst. Diese

RMS-Werte wurden dann über alle Kanäle gemittelt. Für die MVC wurden RMS-Werte für die höchste und stabilste Kontraktion berechnet. Die Werte der Kraftniveaus wurden anhand der jeweiligen MVC normiert. Zusätzlich wurde die Variation der RMS-Werte als Funktion des jeweiligen Kraftniveaus (Berechnung der Steigung) quantifiziert.

Hinsichtlich der Fragestellung wurden folgende Parameter ermittelt: Die Entladungsraten der einzelnen MUs wurden in Impulsen pro Sekunde (*pulses per second*, pps) berechnet. Dabei wurde die mittlere DR pro MU auf jeder Kraftstufe kalkuliert. Der Durchschnittswert pro Proband/Patient wurde für die weitere statistische Analyse genutzt. Zusätzlich wurde die Veränderung der Entladungsrate als Steigung zwischen den verschiedenen Kraftniveaus erfasst. So konnte quantifiziert werden, wie die MUs ihre Aktivität in Bezug auf die erzeugten Kräfte modulieren. Dafür wurde die Änderung der DR von einem niedrigeren zu einem höheren Kraftniveau betrachtet. Hier wurde für dieselbe MU (also gerade verfolgte MU) eine lineare Funktion des jeweiligen Kraftniveaus (in % MVC) beschrieben. Weiterhin wurden die Variabilitätskoeffizienten für die Abstände der Intervalle zwischen den *spikes* der Signale (CoVISI), wie auch die Koeffizienten für die erzeugte Kraft (CoVF) analysiert. Der CoVISI wurde als Verhältnis zwischen der Standardabweichung der *Spike*-Intervalle und dem Mittelwert der *Interspike*-Intervalle in Prozent berechnet. Ungewöhnlich kurze oder lange Zwischenintervalle (< 10 ms, > 250 ms) wurden aus der Analyse entfernt. In ähnlicher Weise wurde der CoVF für die Kraft, als Standardabweichung des Kraftsignals geteilt durch ihren Mittelwert, berechnet. Beide Parameter verändern sich nach bisherigen Untersuchungen im Falle einer größeren Variabilität der synaptischen Signalleitung zu den Motoneuronen (Negro et al. 2009). Weiterhin besteht die Hypothese, dass sie sich auch aufgrund einer beeinträchtigten Übertragung der Nervenaktionspotentiale oder Schwankungen in der Ausbreitungsgeschwindigkeit ändern können. Dies ist bei einer milden Form der fokalen Demyelinisierung, einem häufigen Phänomen bei hereditären Neuropathien i. S. e. erblichen Demyelinisierung, zu beobachten. Die Amplitude der globalen Oberflächen-EMG und der dekomponierten motorischen Aktionspotentiale (MUAP) wurden als indirekte Messungen der Rekrutierung von MUs analysiert. Der *root mean square* (RMS) bzw. das quadratische Mittel des globalen Oberflächen-EMG wurde für alle MUs berechnet und dann über die Elektrodenmatrix gemittelt. Die Abweichung (also die Steigung) des RMS über die Kraftniveaus wurde geschätzt. In ähnlicher Weise wurde der RMS der einzelnen MUAPs aus dem „*spike*-getriggerten“ gemittelten EMG berechnet und über alle Kanäle auf den Mittelwert gebracht (Del Vecchio et al. 2017; Martinez-Valdes et al. 2017).

In einem chronischen neuropathischen Zustand reinnervieren gesunde motorische Axone zusätzliche Muskelzellen, um den Funktionsverlust dysfunktionaler motorischer Axone zu kompensieren. Folglich nimmt die Größe der einzelnen MUs zu, dies kann als Marker für die Reinnervation dienen. Um die Rolle der Reinnervation in CMT1A für die Kraftkontrolle zu untersuchen, wurden die einzelnen MUAP-Amplituden zwischen Patienten und gesunden Kontrollen verglichen.

2.2.7 STATISTISCHE AUSWERTUNG

2.2.7.1 MESSUNGEN DER NERVENEXZITABILITÄT

Quantitative Veränderungen wurden als Durchschnittswerte \pm SEM (*standard error of mean*) angegeben. Die Analysen der unterschiedlichen Messungen der Nervenexzitabilität wurden mit der QtracP Software (Version 15/4-2013, Copyright Professor Hugh Bostock) durchgeführt. Für die statistischen Vergleiche wurde die GraphPad Prism (Version 6 für Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA) Software verwendet. Wenn benötigt, wurden die Ergebnisse der t-Tests und deren Signifikanzen bei einem Alpha-Niveau von 0,05 angegeben.

2.2.7.2 HD-sEMG

Für die statistische Analyse wurde SPSS (IBM, Version 25) verwendet. Bei Vorliegen einer Normalverteilung wurden zweiseitige, ungepaarte t-Tests durchgeführt. Nach Durchführung der *Levine*-Tests wurden beidseitige *Welch-t*-Tests bei festgestellter Varianzinhomogenität verwendet. Zur Bestimmung der Signifikanz wurde ein Alpha-Wert von 5 % festgelegt. Statistisch signifikante Daten sind mit einem * gekennzeichnet. Die nicht normalverteilten Daten wurden mit einem zweiseitigen *Mann-Whitney-U*-Test überprüft (falls durchgeführt, sind die p-Werte mit dem Kürzel WU angegeben). Für die Ergebnisse der Dekomposition wurde dieser statistische Test durchgeführt, da der Algorithmus nicht überlappende Populationen von MU bei verschiedenen Kraftniveaus identifizierte (Martinez-Valdes et al. 2017). Der Code für das EMG-Setup und die Aufzeichnung wurde mit Matlab (Version 2015b) programmiert und die Abbildungen wurden mit GraphPadPrism (Version 7.03) erstellt. Die Auswertung erfolgte mit freundlicher Unterstützung von Elisabeth Veiz, M.Sc. (AG Czesnik UMG).

3 ERGEBNISSE

Für die vorliegende Arbeit wurde die Exzitabilität von fünf CMT1A-Patienten (Alter zwischen 31 und 75 Jahren, Durchschnittsalter 47 Jahre) gemessen, die eine mild ausgeprägte Form der Neuropathie aufwiesen. Die milde Form ermöglichte es, die kompletten Sequenzen der Exzitabilitätsmessungen verlässlich durchzuführen.

Um die Veränderungen der einwärts gleichrichtenden Ströme besser untersuchen zu können, wurde eine Messung von stärker hyperpolarisierenden Strömen von -70 % und -100 % der Reizschwelle zum *threshold electrotonus* hinzugefügt und die Modellierung der Veränderungen mit Bezug auf das humane Modell (Howells et al. 2012) (Abb. 5) durchgeführt.

In der Modellierung und Optimierung der gemessenen Exzitabilitätsdaten zeigte sich, dass sechs Parameter hinreichend geeignet waren, um typische Veränderungen bei CMT1A-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen herauszuarbeiten. Im Detail zeigten die Patienten analog zu den Veränderungen im CMT1A-Rattenmodell¹ einen Anstieg der GKfL (max. internodale schnelle K⁺-Leitfähigkeit) einen Anstieg der GH (max. internodale HCN-Kanalleitfähigkeit), einen Anstieg in der Pnap (Anzahl der persistierenden Natriumkanäle), sowie einen Anstieg der GBB (Barrett-Barrett-Leitfähigkeit für den internodalen Zugang), der mit einem Anstieg der Cmy (*myelin capacity*) und einer Reduktion in der CAX (*axonal capacity*) assoziiert war.

3.1 AXONALE ERREGBARKEIT UND LEITUNGSFUNKTION IN CMT1A

Das durch Stimulation des *N. medianus* am Handgelenk hervorgerufene APB-CMAP (*abductor pollicis brevis-compound muscle action potential*) bei fünf CMT1A-Patienten betrug $5,5 \pm 0,9$ mV (Mittelwert \pm SEM), welches im Vergleich zu NC29-Referenzkontrollen ($9,1 \pm 0,6$ mV, *Mann-Whitney-U-Test* $p = 0,02177$) verringert war. Die CMAP-Latenz (gemessen über den halben Peak) betrug $11,8 \pm 1,2$ ms in CMT1A, was verglichen mit NC29-Kontrollen ($6,7 \pm 0,1$ ms, *Mann-Whitney-U-Test* $p = 1,437E^{-5}$) deutlich verlängert war. Darüber hinaus betrug der zum Hervorrufen eines 50 %igen CMAP erforderliche Reizstrom $8,15 \pm 1,3$ mA in CMT1A und nur $4,5 \pm 1,1$ mA in NC29 (*Mann-Whitney-U-Test* $p = 0,03827$).

¹ (mündliche Mitteilung von Dr. D. Czesnik, UMG, Czesnik et al. Manuskript in Vorbereitung)

Zusammengenommen passen diese gemessenen Daten zu einer demyelinisierenden Neuro-pathie mit einer Verlangsamung der Erregungsüberleitung und einer hiermit verbundenen Reduktion der neuronalen Erregbarkeit. Die multiplen Messungen der axonalen Erregbarkeit in CMT1A wichen deutlich von der Referenz NC29 ab (Abb. 5). Insbesondere gab es in CMT1A ausgeprägtere Änderungen der Schwellenwerte im Rahmen der Messungen der depolarisierenden Schwellenwerte des Elektrotonus (Ted), des hyperpolarisierenden Schwellenwertes des Elektrotonus (Teh), sowie der internodalen Akkommodation (Abb. 5). Diese Abweichungen konnten am Ende der 100-ms-Depolarisation/Repolarisation mit einem Schwellenwert von 40 % als Änderung des Ted (90-100 ms) von $45,65 \pm 0,776$ % auf $51,51 \pm 2,96$ % in CMT1A (Mann-Whitney-U-Test $p = 0,04958$) und einer Änderung des Teh (90-100 ms) von $-120,8 \pm 2,8$ % auf $-153,6 \pm 14,1$ % in CMT1A (Mann-Whitney-U-Test $p = 0,0187$) quantifiziert werden. Dieses „Auffächern“ oder *fanning out* des Elektrotonus könnte zumindest teilweise auf veränderte passive Eigenschaften der Nerven zurückzuführen zu sein (Nodera et al. 2004), die mit der Demyelinisierung in CMT1A verbunden sind. Konsistent hierzu wurde die *strength-duration time constant* (der OX-Abschnitt der Messung der Ladungsdauer) (Abb. 5) in CMT1A von $0,4261 \pm 0,0175$ ms auf einen Wert von $0,5936 \pm 0,0965$ ms erhöht (ungepaarter t-Test $p = 0,005$). In CMT1A war jedoch auch eine Zunahme der Hyperpolarisierung zu verzeichnen, nachgewiesen in der I/V-Steigung (ein Schwellenwertanalogon der Eingangsleitfähigkeit, abgeleitet durch Anpassen einer geraden Linie durch die am stärksten hyperpolarisierten drei Punkte) von $0,3745 \pm 0,0135$ bis zu einem Wert von $0,527 \pm 0,135$ (ungepaarter t-Test $p = 0,01739$). Dies ging einher mit einer erhöhten Einwärtsgleichrichtung (Abb. 5) sowie einer Verringerung der Übererregbarkeit (minimaler Mittelwert von drei benachbarten Schwellenpunkten) im Erholungszyklus (Abb. 5) von $-25,37 \pm 1,07$ % auf $-10,85 \pm 3,79$ % (Ungepaarter t-Test $p = 4,418E^{-5}$). Ähnliche Veränderungen wurden in früheren Studien zur Demyelinisierung in CMT beobachtet und auf Änderungen der spannungsabhängigen Eigenschaften zurückgeführt, genauer der Einwärtsgleichrichtung (vermittelt durch hyperpolarisationsaktivierte, cyclische nukleotid-gesteuerte HCN-Kanäle) bzw. Auswärtsgleichrichtung (vermittelt durch K^+ -Ströme) (Jankelowitz und Burke 2013; Liang et al. 2014; Nodera et al. 2004).

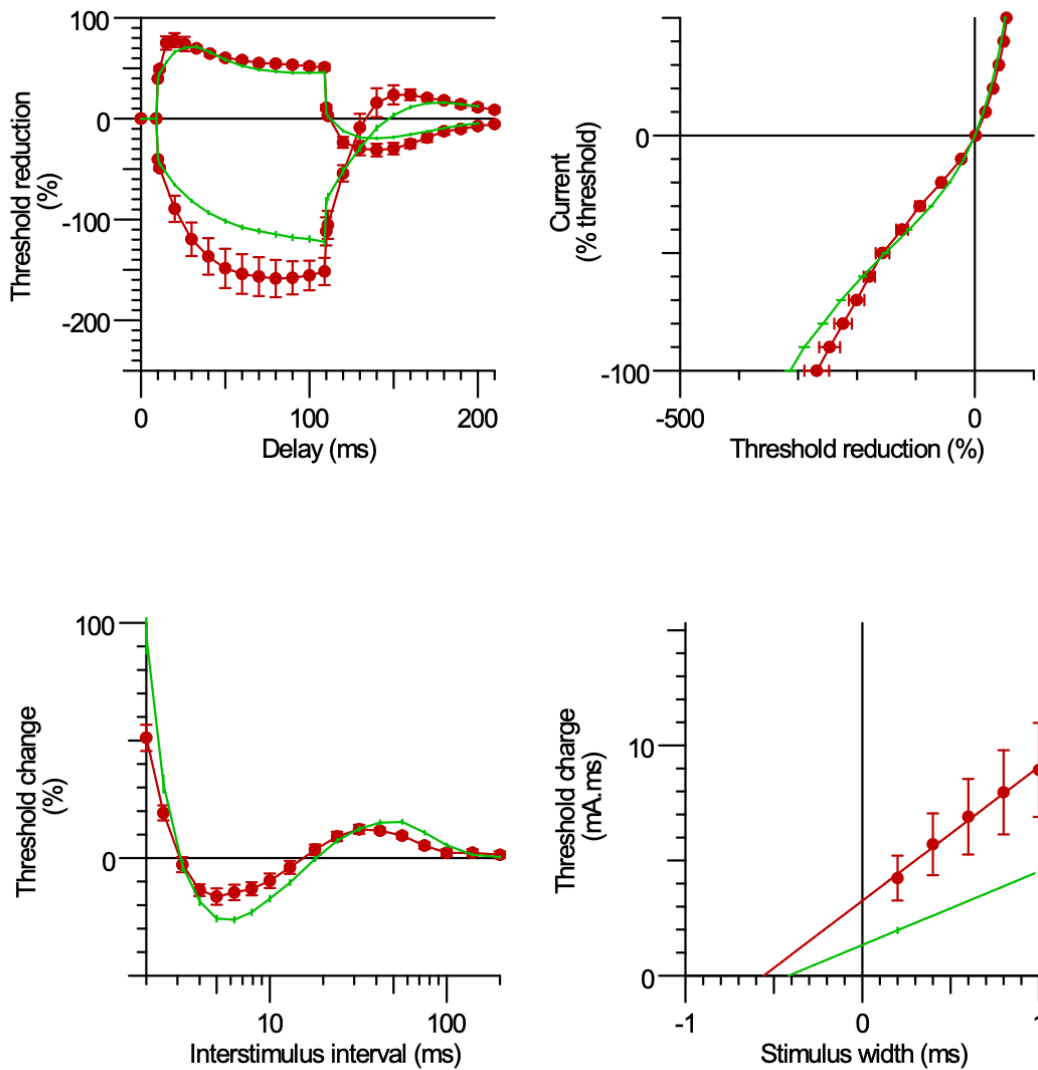


Abbildung 5: Exzitabilität: Durchschnittswerte von CMT1A-Patienten und Kontrollen. Vergleich der Durchschnittswerte von CMT1A-Patienten ($n = 5$, rote Symbole) mit den bekannten NC29(grün)-Referenzwerten (Kiernan et al. 2000). Die Fehlerbalken repräsentieren den *standard error of mean* (SEM). (ms: Millisekunden, *threshold reduction*: Reduktion der Reizschwelle, *delay*: Verzögerung, *current (% threshold)*: Strom in Prozent der Reizschwelle, *threshold change*: Änderung der Reizschwelle, *interstimulus interval*: Zwischenintervall zwischen den Stimuli, *stimulus width*: Impulsbreite des Stimulus). Die Verwendung der Abbildungen 5-10 erfolgt mit freundlicher Genehmigung von Prof. Moldovan und Dr. Krarup (Center for Neuroscience, Universität Kopenhagen).

Um den Beitrag der passiven und spannungsabhängigen Abweichungen von motorischen Axonen in CMT1A zu erfassen, wurde eine mathematische Modellierung durchgeführt. Zusätzlich zu der Hyperpolarisation von -40 % (Abb. 6) wurden auch Messungen der Schwellenwerte des Elektrotonus mit stärkeren Hyperpolarisationsströmen von -70 % und -100 % durchgeführt (Abb. 6, 7). Das Ausgangsmodell (Howells et al. 2012) ist in Abbildung 6 mit durchgezogenen Linien dargestellt.

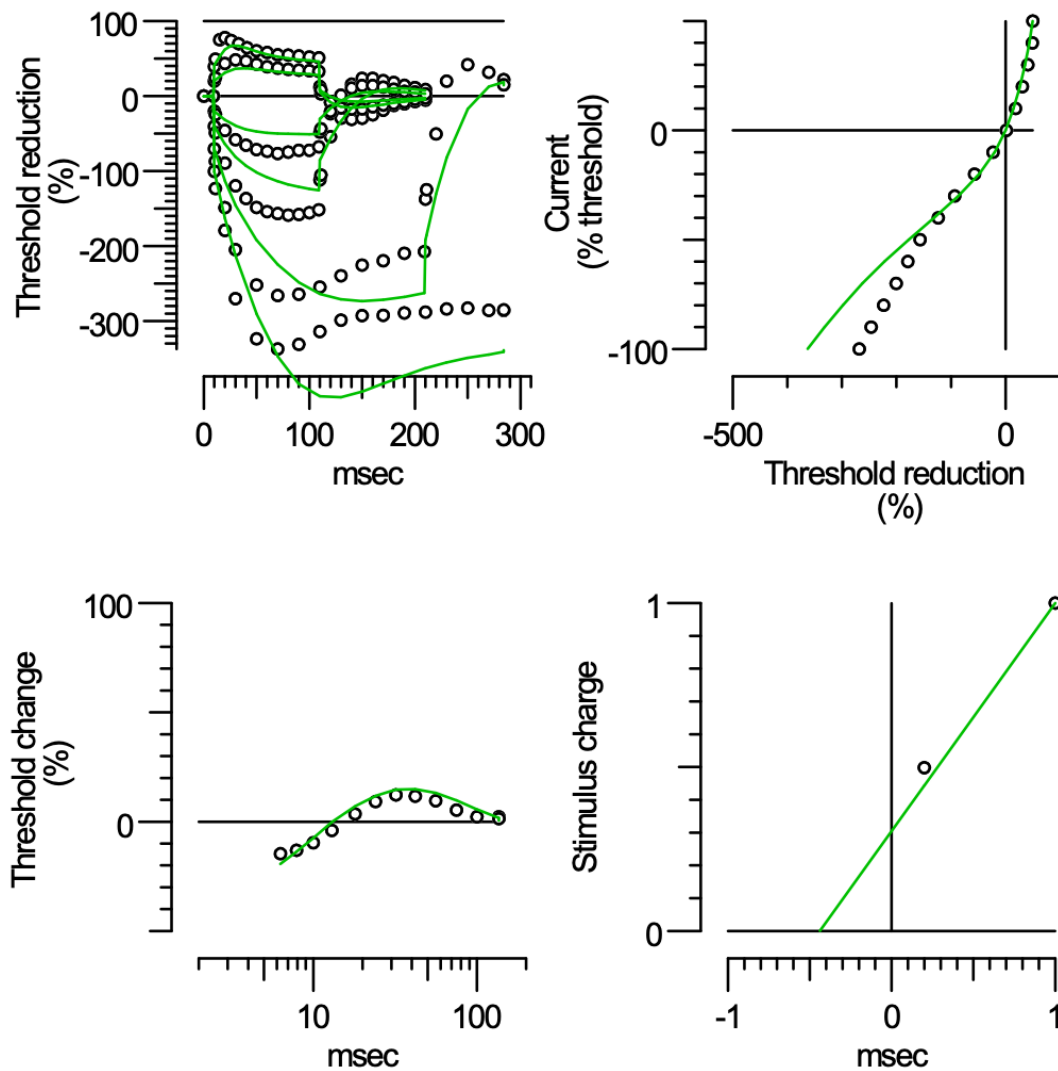


Abbildung 6: Ergebnisse des *threshold electrotonus*. Die berechneten Mittelwerte von CMT1A-Patienten werden mit offenen Symbolen wiederholt dargestellt, einschließlich *threshold electrotonus*-Messungen mit stärkeren Hyperpolarisierungsströmen von -70 % und -100 % des Schwellenwerts. Das Ausgangsmodell (Howells et al. 2012) ist mit durchgezogenen Linien (grün) dargestellt. Das für den CMT1A-Mittelwert optimierte Modell ist in Abb. 7 dargestellt (msec: Milisekunden, *threshold reduction*: Reduktion der Reizschwelle, *current (% threshold)*: Strom in Prozent der Reizschwelle, *threshold change*: Änderung der Reizschwelle, *stimulus change*: Änderung des Stimulus).

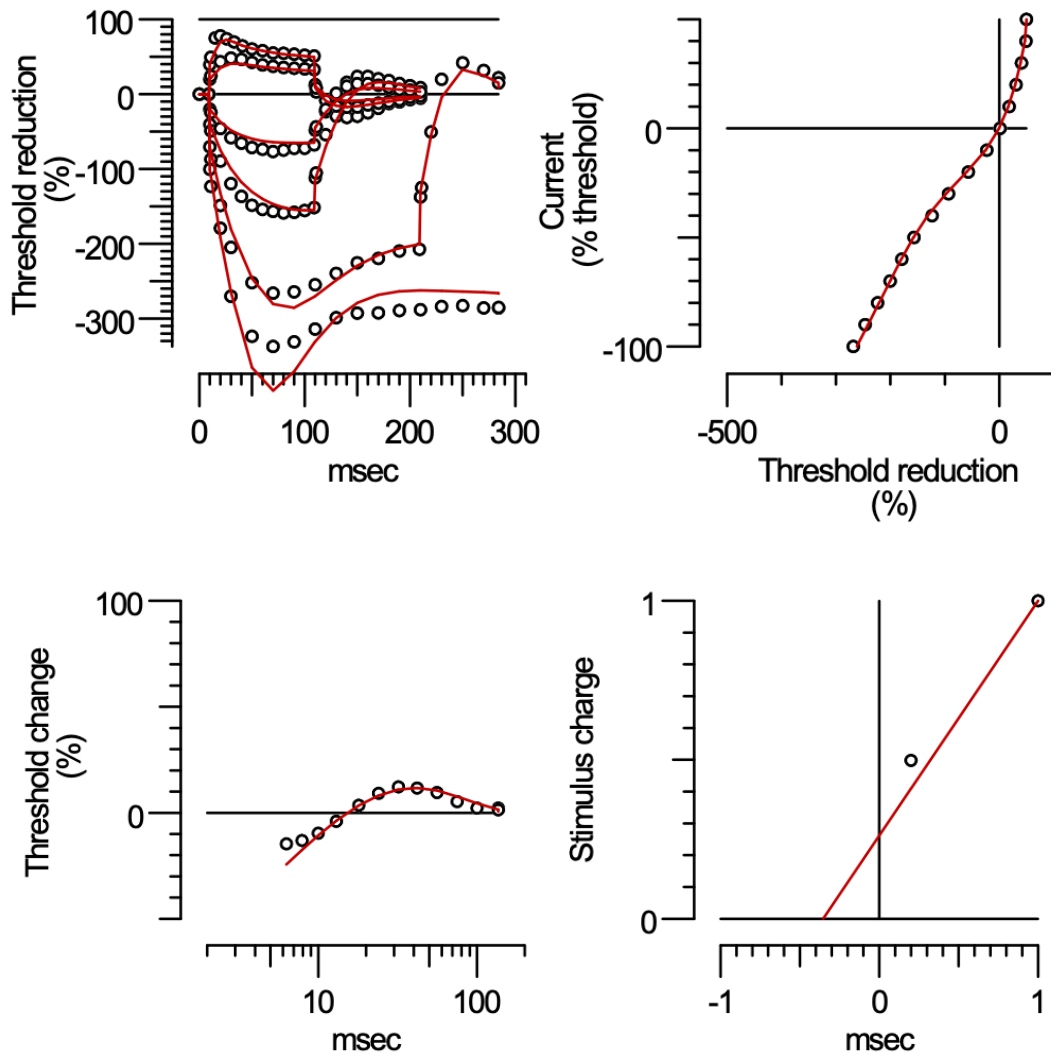


Abbildung 7: Modellberechnungen für CMT1A-Patienten. Darstellung der berechneten Mittelwerte von CMT1A-Patienten mit offenen Symbolen, einschließlich *threshold electrotonus*-Messungen mit stärkeren Hyperpolarisierungsströmen von -70 % und -100 % des Schwellenwerts. Das für die CMT1A-Mittelwerte optimierte Modell ist in rot dargestellt (msec: Milisekunden, *threshold reduction*: Reduktion der Reizschwelle, *current (% threshold)*: Strom in Prozent der Reizschwelle, *threshold change*: Änderung der Reizschwelle, *stimulus change*: Änderung des Stimulus).

Die adäquate Modellierungslösung (Tabelle 3) wurde erreicht, indem die Barrett-Barrett-Leitfähigkeit für den internodalen Zugang (G_{BB}), wie auch die max. internodale schnelle K⁺-Leitfähigkeit (G_{Kfl}), sowie die max. internodale HCN-Kanalleitfähigkeit (G_H) erhöht wurden.

Tabelle 3: Modellierung der Exzitabilität des *N. medianus*.

	Referenz	CMT1A Gruppe	CMT1A (Mittelwert +/- SEM)	CMAP r, p
GBB, Barrett-Barrett Leitfähigkeit (nS)	35,9	49,8	54,78 ± 8,369	r = 0,989 p = 0,0034*
GKfl, max. internodale schnelle K ⁺ -Leitfähigkeit (nS)	207	244	308,8 ± 71,73	r = 0,436 p = 0,464
GH, max. internodale HCN-Kanalleitfähigkeit (nS)	2,95	11,8	12,46 ± 1,137	r = 0,224 p = 0,11

Für das Ausgangsmodell wurde ein bereits publizierter Parametersatz verwendet (Howells et al. 2012), der das NC29-Referenzmaterial beschreibt (Kiernan et al. 2000). Die Modellparameter wurden hinsichtlich der bei CMT1A-Patienten gemessenen Mittelwerte der Erregbarkeit (n = 5) optimiert. Die *channel-gating*-Parameter wurden nicht verändert. Bei den Gruppenmittelwerten wurde eine ausreichende Modellierung erreicht, wenn eine Kombination aus drei Parametern optimiert wurde: GBB, GKfl und GH. Diese drei Parameter wurden dann teilweise für jede CMT1A-Aufzeichnung optimiert. Die rechte Spalte gibt die lineare Korrelation zwischen den Modellparametern und der CMAP-Amplitude bei CMT1A-Patienten an. Signifikante Korrelationen bei $p < 0,05$ sind mit einem * gekennzeichnet. SEM: *standard error of mean*, CMAP: *compound muscle action potential*.

Zusammengenommen ist es wahrscheinlich, dass die Erregbarkeitsänderungen in CMT1A einen erhöhten elektrischen Zugang zu den spannungsabhängigen, gleichrichtenden Kanälen in der internodalen Membran widerspiegeln. Es sollte jedoch darauf hingewiesen werden, dass dies nur teilweise eine Erklärung darstellt, da diese Modellierungslösung die Verlängerung der *strength-duration time constant* in CMT1A nicht berücksichtigte (Abb. 6). Da in dieser Studie keine Längsschnittdaten verfügbar waren, wurden die Querschnittsbeziehungen zwischen den medianen Parametern der Nervenleitung (als Ersatzmarker für den Schweregrad der Neuropathie) und den Erregbarkeitsmessungen untersucht. In CMT1A waren längere Latenzen mit einem Anstieg des Stimulus für 50 %-CMAP verbunden (Abb. 8, $r = 0,938$, $p = 0,021$), während sie von anderen Erregbarkeitsmaßnahmen unabhängig waren (Daten nicht gezeigt). Darüber hinaus waren in CMT1A-Patienten die kleineren CMAP-Amplituden sowohl für den Ted (90–100 ms) ($r = 0,9795$, $p = 0,0061$), als auch für den Teh (90–100 ms) ($r = 0,9661$, $p = 0,0104$) mit einer Dämpfung des *fanning out* des Schwellenelektrotonus verbunden (Abb. 9).

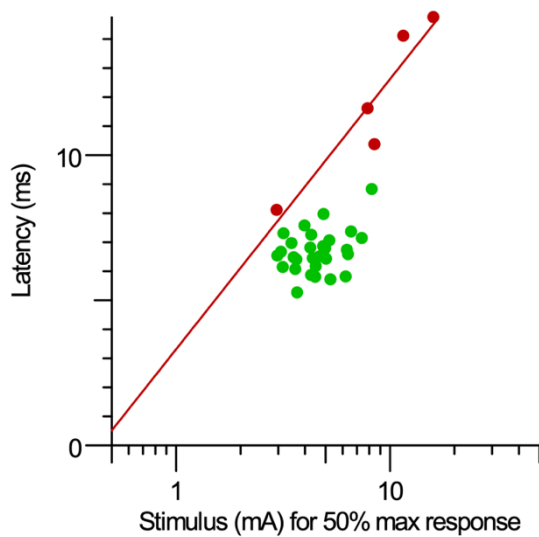


Abbildung 8: Beziehung zwischen Leitfähigkeits- und Erregbarkeitsparametern. Darstellung der Beziehung zwischen Leitfähigkeits- und Erregbarkeitsparametern in CMT1A (rot) und NC29 (grün). Für CMT1A wird die lineare Beziehung zwischen der CMAP-Latenz (*latency*) und der Stimulusstärke als $\text{Latency} = a + b \cdot \text{Stimulus}$ angegeben, wobei $a = 3,315$ und $b = 9,308$ beträgt. Die x-Achse zeigt den Stimulus an, der zur Auslösung von 50 % der maximalen Antwort notwendig ist.

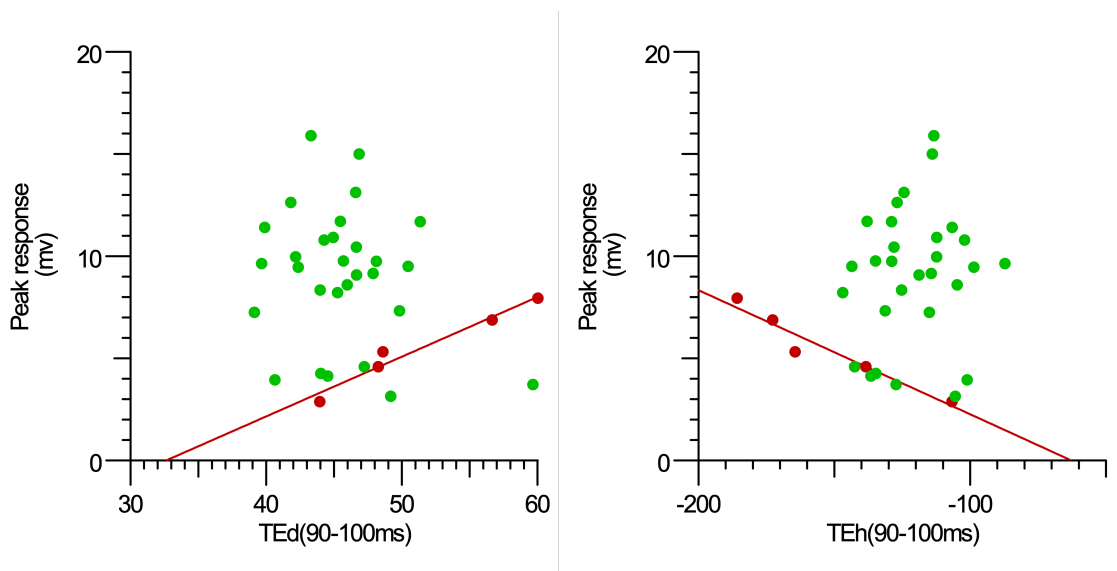


Abbildung 9: Beziehung zwischen CMAP-Amplitude und Schwellen-Elektrotonus. Darstellung der linearen Beziehung zwischen der CMAP-Amplitude und den Messungen des Schwellen-Elektrotonus bezeichnet als x , es gilt $\text{CMAP} = a + b \cdot x$ mit: TEed (threshold electrotonus depolarisation) (90-100 ms) $a = -9,536$ und $b = 0,2923$ und TEh (threshold electrotonus hyperpolarisation) (90-100 ms) $a = -3,809$ und $b = -0,061$. Es ist zu beachten, dass für NC29 keine Beziehung zwischen Leitung und Erregbarkeit beobachtet werden konnte (ms: Milisekunden, mV: Milivolt, *peak response*: höchste hervorrufbare Antwort).

Diese Beziehung zwischen Erregbarkeit und CMAP-Amplitude stimmt mit der beobachteten Abschwächung des GBB-Anstiegs bei kleineren Amplituden überein (Abb. 10, Tabelle 3).

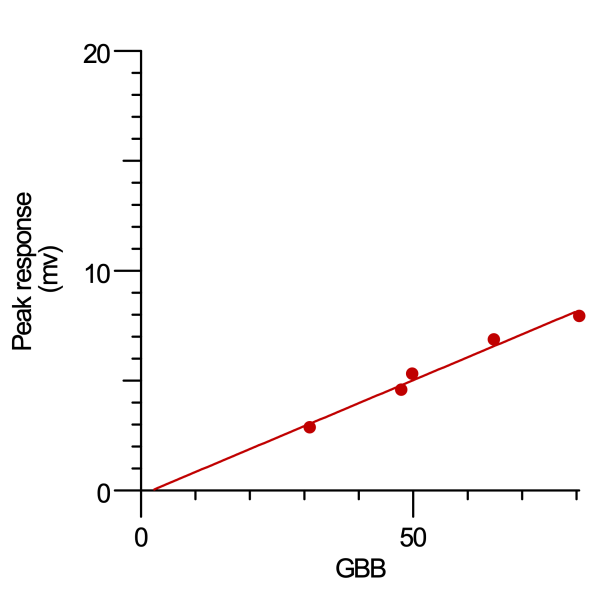


Abbildung 10: Beziehung zwischen CMAP-Amplitude und modellierter Leitfähigkeit. Dargestellte Beziehung zwischen der CMAP-Amplitude von CMT1A-Patienten (*peak response*: höchste hervorrufbare Antwort) und der modellierten Barrett-Barrett-Leitfähigkeit (GBB) (Tabelle 3). Diese lineare Beziehung zeigt: $CMAP = a + b * GBB$, wobei gilt $a = -0,2039$ und $b = 0,1044$ (mV: Milivolt).

3.2 ERGEBNISSE DER EMG-MESSUNGEN

Insgesamt wurden 20 Probanden untersucht, zehn Patienten (sechs Frauen, vier Männer) mit molekulargenetisch gesicherter CMT1A (Tabelle 4) und zehn gesunde Freiwillige (sechs Frauen, vier Männer) als gesunde Kontrollgruppe. Das Durchschnittsalter der gesunden Kontrollen betrug $49 \pm 16,3$ Jahre und der Mittelwert der CMT1A-Patienten $46 \pm 13,9$ Jahre. Keiner der gesunden Freiwilligen litt an einer Erkrankung oder nahm Medikamente ein. Eine Neuropathie oder neuropathische Symptome wurden im Vorfeld klinisch ausgeschlossen. In der Patientengruppe wurde der Schweregrad der CMT1A-Erkrankung durch den CMTNS in seiner 2.Version beurteilt (Sadjadi et al. 2014). Keiner der Patienten unterlag während der Studie einer Medikation, die bekanntermaßen mit der neuromuskulären Funktion interagiert (Statine, L-Thyroxin, Blocker von Ionenkanälen). Bei drei Patienten wurde zusätzlich der ONLS, 9HPT und 6MWT/10MWT gemessen. Bei allen 10 Teilnehmern wurde die HD-sEMG des *M. tibialis anterior* während willkürlicher isometrischer Kontraktionen bei 5, 10 und 25 % der MVC erfasst und abgeleitet.

Tabelle 4: Basisdaten der CMT1A-Patienten.

Pat. ID CMT1A	Alter	Geschlecht	CMTNS2	NCV [m/s]	CMAP [mV]	dML [ms]
1	48	Männlich	12	20	1,3	6,3
2	56	Weiblich	12	32	4,9	5,6
3	25	Weiblich	13	19	3,6	9,3
4	65	Männlich	17	22,4	1,0	7,3
5	52	Männlich	18	39,4	0,9	5,3
6	33	Weiblich	24	19	0,5	8,7
7	32	Männlich	8	31	2,9	7,2
8	52	Weiblich	20	22,9	2,0	9,0
9	34	Weiblich	14	20,1	4,1	7,0
10	62	Weiblich	8	28,9	3,7	8,2

Neurographien wurden vom *N. ulnaris* abgeleitet. (CMTNS: CMT-Neuropathie-Score, NCV: *nerve conduction velocity*, CMAP: *compound muscle action potential*, dML: distale motorische Latenz)

3.2.1 KRAFTMESSUNGEN

Um die Fähigkeit der Teilnehmer, die aufgebrachte Kraft während der Messungen von 30 Sekunden Dauer konstant halten zu können, zu quantifizieren, wurde die Variabilität der Kraft berechnet, ausgedrückt im Variabilitätskoeffizienten der Kraft (CoVF). Der CoVF variierte stark innerhalb der Patientengruppe und unterschied sich signifikant von den gesunden Kontrollen. In der Tat war die Variabilität der Kraft in der CMT1A-Patientengruppe deutlich höher (Tabelle 5, Abb. 11).

Tabelle 5: Übersicht der HD-sEMG-Parameter von CMT1A-Patienten und Kontrollen.

	Gesunde Kontr. (n = 10)		CMT1A Pat. (n = 10)		p-Werte
	Mittelwert	SEM	Mittelwert	SEM	
Parameter Kodierungsrate					
DR 5 %	9,03	0,32386	8,68	0,29531	0,437
DR 10 %	10,68	0,44849	9,22	0,38898	0,025*
DR 25 %	14,45	0,68832	12,71	0,76213	0,109
CoV _{ISI} DR 5 [%]	16,97	1,65189	16,97	1,08249	1,000
CoV _{ISI} DR 10 [%]	20,08	1,68194	20,66	2,05726	0,597 ^{WU}
CoV _{ISI} DR 25 [%]	14,45	0,68832	12,72	0,76213	0,691 ^{WU}
<i>slope</i> 5-10 % [pps/% MVC]	0,38	0,06576	0,12	0,04015	0,004**
<i>slope</i> 10-25 % [pps/% MVC]	0,22	0,02549	0,14	0,01974	0,015*
Amplitudenanalyse					
MVC in μ V	262,7	82,33	156,43	26,24	0,165
5 % der MVC [μ V]	29,13	3,97	47,81	12,46	0,247
5 % der MVC/% MVC	15,3	2,63	34,7	20,4	0,017*
10 % der MVC [μ V]	46,43	6,09	66,12	15,75	0,326
10 % der MVC/% MVC	23,4	2,63	45,5	7,35	0,018*
25 % der MVC [μ V]	76,48	9,39	90,8	13,7	0,053
25 % der MVC/% MVC	40,5	7,6	63,5	6,13	0,03*

	Gesunde Kontr. (n = 10)		CMT1A Pat. (n = 10)		p-Werte
	Mittelwert	SEM	Mittelwert	SEM	
<i>slope</i> der Ampl. 5-10	3,34	0,98	2,73	1,14	0,688
Norm. <i>slope</i> der Ampl. 5-10	1,37	0,3	1,5	0,5	0,894
<i>slope</i> der Ampl. 10-25	1,64	0,25	1,13	0,28	0,347
Norm. <i>slope</i> der Ampl. 10-25	0,8	0,17	0,89	0,18	0,877
MUAP Eigenschaften					
RMS von MUAP 5-10 [μ V]	10,16	1,27	15,37	2,907	0,089
P2P von MUAP 5-10 [μ V]	46,53	5,30	72,69	13,03934	0,075
RMS von MUAP 10-25 [μ V]	15,68	2,17	19,95	3,02037	0,283
P2P von MUAP 10-25 [μ V]	70,09	7,99	94,88	13,95695	0,073
Kraftanalyse					
5 % MVC [%]	7,89	0,66	7,97	1,19	0,956
10 % MVC [%]	14,65	1,13	17,56	3,66	1,000 ^{WU}
25 % MVC [%]	33,73	2,05	40,38	5,22	0,051 ^{WU}
CoVF _{5%MVC} [%]	4,88	0,51	13,11	1,75	0,001**
CoVF _{10%MVC} [%]	3,97	0,67	9,65	3,05	0,007** ^{WU}
CoVF _{25%MVC} [%]	3,61	0,37	3,78	0,46	0,733

Statistisch signifikante Werte (p-Wert < 0,05) sind mit einem * markiert, p-Werte < 0,01 **; bei nicht normalverteilten Werten wurde ein *Mann-Whitney-U-Test* durchgeführt (p-Werte sind mit ^{WU} markiert). DR: *discharge rate*, CoVISI: *coefficient of variability of interspike intervals*, *slope*: Steigung, MVC: *maximal voluntary contraction*, Ampl: Amplitude, pps: pulses per second, Norm.: Normalisierte Werte, RMS: *root mean square*, MUAP: *motor unit action potential*, P2P: *peak to peak*, CoVF: *coefficient of variability of force*.

3.2.2 KODIERUNGSVERHALTEN

Insgesamt wurden 539 MUs von CMT1A-Probanden und 514 von HCs erfasst. Bei 5 % MVC wurden 121 MUs in CMT1A und 92 bei gesunden Kontrollen ($p = 0,008 *$), bei 10 % MVC 176 MUs bei CMT1A und 169 bei gesunden Kontrollen ($p = 0,028 *$) und bei 25 % MVC 242 bei CMT1A und 253 bei gesunden Kontrollen ($p = 0,176$) identifiziert. Bei 10 % MVC war der Mittelwert der DRs bei CMT1A-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen signifikant niedriger (Tabelle 5, $p = 0,025 *$), bei 5 % und 25 % MVC war dies jedoch nicht der Fall (Abb. 11 A). Die Variabilität der *Interspike*-Intervalle (CoVISI) unterschied sich nicht zwischen den Gruppen (Tabelle 5, Abb. 11 C). Die CMT1A-Patienten zeigten eine geringere Steigung der Entladungsraten zwischen 5 und 10 % MVC (Tabelle 5, Abb. 11 B) sowie zwischen 10 und 25 % MVC (Tabelle 5, Abb. 11 D) im Vergleich zur Kontrollgruppe.

3.2.3 REKRUTIERUNGSVERHALTEN

Um die Rekrutierung von MUs im Bereich der *Multi-Unit*-Elektrode zu bewerten, wurde die Spannungsamplitude der EMG während der isometrischen Kontraktionen bei allen drei Kraftniveaus (5, 10 und 25 % der MVC) berechnet. Die mittlere Amplitude bei MVC in μV war höher, unterschied sich bei gesunden Probanden jedoch nicht signifikant von CMT1A-Patienten (Tabelle 5, $p = 0,165$). Interessanterweise waren die Amplituden der normalisierten Werte (RMS in % der MVC) bei gesunden Probanden im Vergleich zu CMT1A-Patienten (Tabelle 5, Abb. 11 F) bei allen Kraftwerten signifikant niedriger. Die berechneten Steigungen zwischen den Amplituden, die sich auf unterschiedliche Kraftniveaus bezogen, waren bei CMT1A-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen höher, dies jedoch nicht signifikant (Tabelle 5).

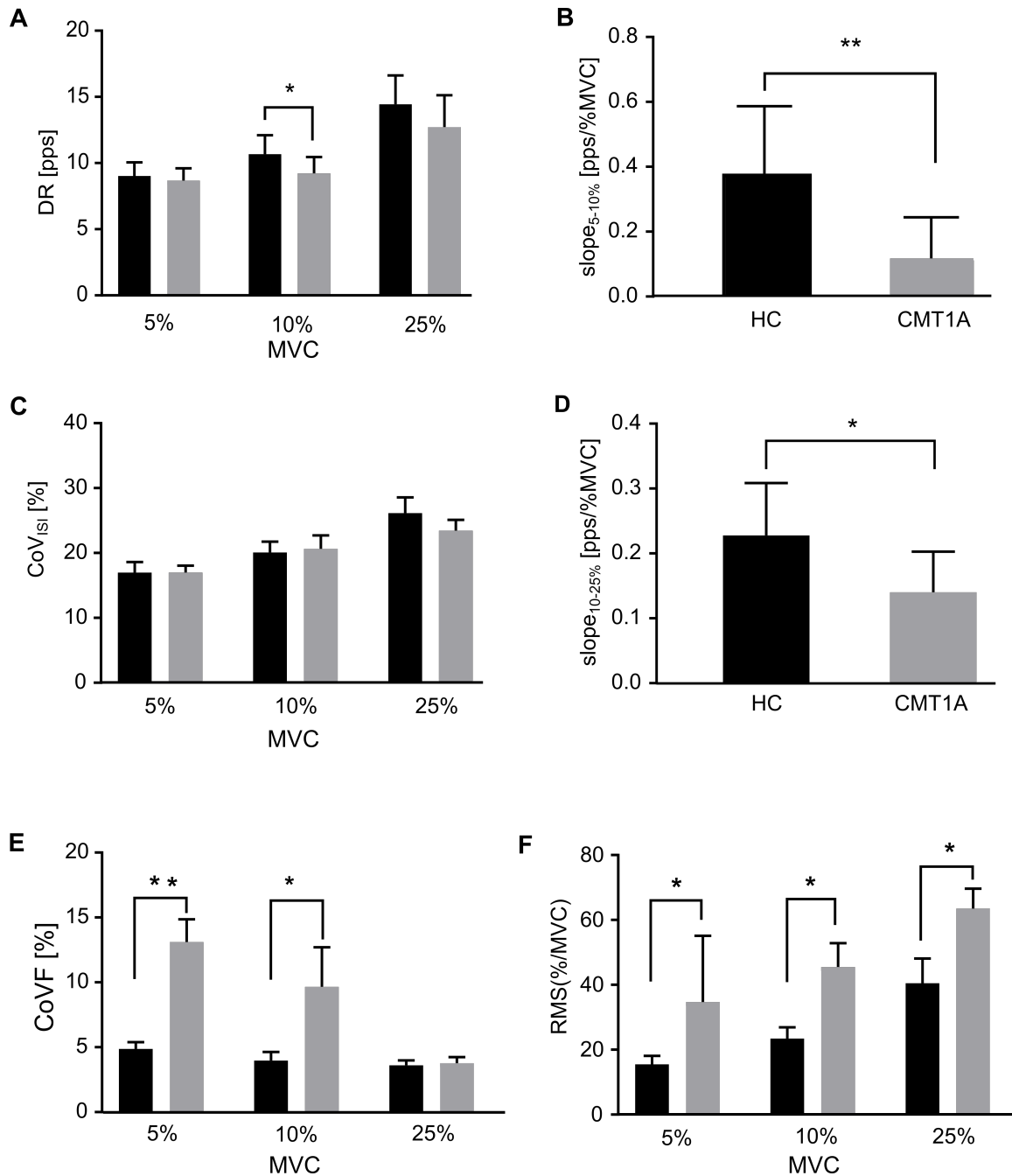


Abbildung 11: Übersicht über die EMG-Parameter. CMT1A-Patienten (CMT1A) zeigten eine niedrigere Entladungsrate (*discharge rate*, DR) als gesunde Kontrollen (*healthy controls*, grau, HC) (A) und eine signifikant niedrigere Steigung (*slope*) der DR zwischen den Kraftstufen (B), (D). Der Variabilitätskoeffizient der Zwischenintervalle (*coefficient of variability of interspike intervals*, CoVISI) der DR zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen (C). Der Variabilitätskoeffizient der Kraft (*coefficient of variability of force*, CoVF) war signifikant höher bei CMT1A, besonders auf den niedrigen Kraftstufen (E). Bei der Analyse der Rekrutierung der motorischen Einheiten (*motor units*, MU) zeigten die Pat. höhere normalisierte quadratische Mittel (*root mean square*, RMS)-Amplituden im Vergleich mit den gesunden Kontrollen (RMS in %MVC, *maximal voluntary contraction*) (F).

3.2.4 REINNERVATION

Um das Ausmaß der Reinnervation in CMT1A zu untersuchen, wurden die Amplituden aller einzelnen zerlegten Mehrkanal-MUAPs auf allen drei Kraftniveaus ausgewertet. Interessanterweise gab es keine signifikanten Unterschiede in der MUAP-Größe zwischen den CMT1A-Patienten und den gesunden Kontrollen (Tabelle 5).

3.2.5 KORRELATION NEUROPHYSIOLOGISCHER PARAMETER MIT CMTNS2

Anschließend wurden die erhobenen Werte mit dem CMTNS2 jedes CMT1A-Patienten korreliert. Hier zeigte sich eine signifikant ($p = 0,017 *$; Abb. 12) negative Korrelation zwischen der Steigung der Entladungsrate zwischen 5 % und 10 % der MVC mit einem Pearson-Wert von 0,728. Es zeigte sich keine Korrelation mit allen anderen neurophysiologischen Parametern, die in der klinischen Routine erfasst wurden. Dazu zählten die Neurographien des *N. ulnaris* (CMAP, NCV, dML) und die anderen HD-sEMG-Parameter einschließlich der Steigung des RMS ($r: 0,034, p = 0,925$), wie weiter oben ausführlich beschrieben.

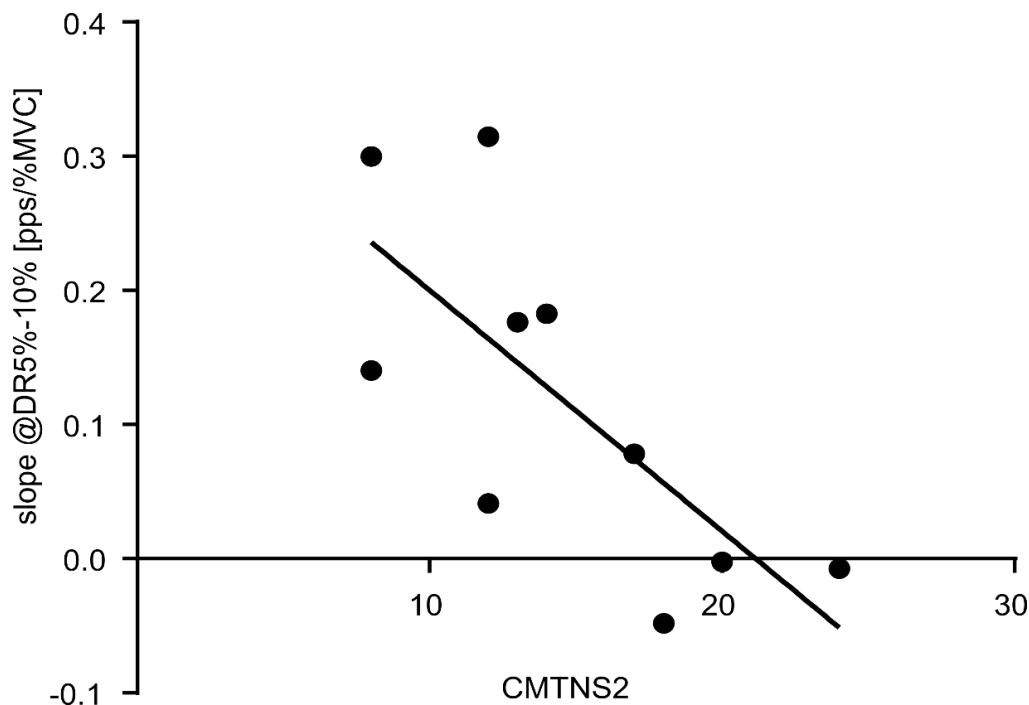


Abbildung 12: Korrelation mit dem CMTNS2. Der CMTNS2 der CMT1A-Pat. zeigte eine negative Korrelation mit den Steigungen (slope) der *discharge rates* zwischen 5 % und 10 % der MVC mit einem Pearson's r von 0,729 ($p: 0,017*$).

4 DISKUSSION

4.1 ANWENDUNG DER *MULTI-UNIT*-ELEKTROMYOGRAPHIE BEI CMT1A-PATIENTEN

Die vorliegende Studie zielte darauf ab, die MU-Kontrolleigenschaften zu analysieren und einen nicht-invasiven elektrophysiologischen Biomarker für motorische Beeinträchtigungen bei CMT1A-Patienten zu evaluieren. Durch einen Vergleich der motorischen Kontrolle der MUs des *M. tibialis anterior* über die isometrische Kontraktion bei verschiedenen Kraftniveaus konnte gezeigt werden, dass die berechnete Steigerung der Entladungsraten (als Ausdruck der Fähigkeit zur Steigerung der DR) der gleichen MUs, die bei steigenden Kraftniveaus identifiziert wurden, in CMT1A im Vergleich zu HCs verringert war (s. Tabelle 5 und Abb. 11). Dieser Parameter korrelierte weiterhin negativ mit dem CMTNS2 (s. Abb. 12). Dieses Phänomen des verminderten Anstiegs scheint durch Rekrutierungsmechanismen kompensiert zu werden. Diese wiederum wurden indirekt durch die Änderungen der RMS-Amplitude des abgeleiteten sEMG bei jeweils gleichen Kraftniveaus erfasst. Im Gegensatz zu anderen bereits angewandten Verfahren, z. B. MUNIX (Motor Unit Number Index) (Bas et al. 2018), wurden in dieser Studie MUs untersucht, die weiterhin ihre Entladungsrate und die Aktivität der Einheiten kodieren, was zur Aufklärung pathophysiologischer Mechanismen beitragen könnte. Es erfolgte also eine Analyse noch aktiver Einheiten und nicht nur eine Erfassung der Gesamtanzahl und eine Erhebung der bereits weggefallenen, inaktiven Einheiten.

4.2 KODIERUNG DER ENTLADUNGSRATEN IN CMT1A

Die Ergebnisse zeigen, dass sich die Variation (*slope*) der DR einzelner MUs in dieser Patientengruppe mit CMT1A hin zu einer reduzierten Steigerung in Bezug auf höhere Kraftniveaus verschiebt. Möglicherweise treten diese Veränderungen auf, um die Muskelschwäche und die vorhandenen Atrophien im Zusammenhang mit den chronisch neurogenen Schädigungen zu kompensieren (Mottram et al. 2014). Interessanterweise zeigen die Ergebnisse der Studie, dass die Mittelwerte der Steigungen (Variation) der DRs aller nachverfolgten MUs über alle Kraftniveaus hinweg in CMT1A signifikant niedriger waren. Es zeigte sich bei einer Erhöhung der ausgeübten Kraft eine niedrigere Steigerung der Entladungsraten zwischen den jeweiligen Kraftstufen bei CMT1A-Patienten im Vergleich mit den gesunden

Kontrollen. Dies weist darauf hin, dass bei CMT1A-Patienten die Fähigkeit zur Modulation ihrer MU-DRs zur Erhöhung der ausgeübten Kraft beeinträchtigt ist. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen gibt es zunehmend Hinweise darauf, dass die vorliegende axonale Dysfunktion und der Axonverlust Folgen der Reorganisation von Ionenkanälen im Rahmen der Pathophysiologie der Neuropathie sind (Jankelowitz und Burke 2013; Nodera et al. 2004). In einem CMT1B-Mausmodell wurde bereits gezeigt, dass die ektopische Expression eines spannungsgesteuerten Natriumkanals ($Na_v1.8$) an diesen Reorganisationsprozessen beteiligt ist (Rosberg et al. 2016). Die funktionalen Konsequenzen dieser Veränderungen und Anpassungen sind bisher allerdings kaum bekannt. Bei CMT1A ist die Fähigkeit, höhere Kräfte zu erzeugen, indem die DRs der rekrutierten MUs erhöht werden, im Gegensatz zu HCs deutlich reduziert. Die motoneuronale Erregbarkeit kann auch am Motoneuron selbst und seinen Dendriten durch die Aktivierung von persistierenden Einwärtsströmen (PIC) verändert werden (Heckman et al. 2005). Diese werden hauptsächlich in den dendritischen Regionen der Motoneurone gebildet und können der Modulation und Verstärkung der DR dienen. Dabei können die intrinsischen Membraneigenschaften sowie supraspinale Kontrollmechanismen eine Rolle spielen (Heckman et al. 2009). Auf Ebene der Ionenkanäle wurden spannungsabhängige Natrium- und Calciumkanäle als verantwortliche molekulare Mechanismen nachgewiesen (Heckman et al. 2008).

Betrachtet man diese Veränderungen, dann könnten die PICs für das nachgewiesene DR-Verhalten in dieser Patientengruppe verantwortlich sein. Dies konnte bereits bei anderen neurogenen Erkrankungen gezeigt werden (Mottram et al. 2014; Rosberg et al. 2016). Weitere Untersuchungen in größeren Kollektiven sind notwendig, um diese Beobachtungen zu validieren.

4.3 BEZIEHUNG ZU DEN POSITIVSYMPTOMEN DER POLYNEUROPATHIE

Häufig werden von CMT1A-Patienten sog. Positivsymptome angegeben. Hierzu gehören: neuropathische Schmerzen, Muskelkrämpfe und eine *Restless-Legs*-Symptomatik. Eine häufige Ursache für diese Symptome ist die Hyperexzitabilität in den entsprechenden relevanten neuronalen Netzwerken. Unter diesem Gesichtspunkt haben die einwärts gleichrichtenden und die persistierenden Natriumströme einen depolarisierenden Effekt und die erhobenen Daten zeigen einen Anstieg in beiden Komponenten (I_h und Nap) in den motorischen Axonen, was jede Form der Hyperexzitabilität verstärkt.

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass Muskelkrämpfe im Rahmen eines benignen Faszikulations-Krampussyndroms mit einem Anstieg der I_h in Exzitabilitätsuntersuchungen assoziiert sind (Czesnik et al. 2015). Ebenso wurde ein erhöhter I_h wie auch ein erhöhter Nap im Zusammenhang mit neuropathischen Schmerzen nachgewiesen (Chaplan et al. 2003; Luiz und Wood 2016).

So können diese Erkenntnisse zu einem anwachsenden Wissen beitragen, dass Modulatoren des I_h und des Nap mögliche neue Ziele in der Therapie von Positivsymptomen sein können, die im Rahmen demyelinisierender Neuropathien unterschiedlicher Ätiologie auftreten können.

4.4 DIE ROLLE DES LEITUNGSBLOCKS IN CMT1A

Eine etablierte Hypothese für eine funktionelle motorische Beeinträchtigung des Nervens bei einem Demyelinisierungsprozess ist die eines vollständigen oder unvollständigen Leitungsblocks. Dieser gilt als ein kausaler Pathomechanismus für die sensiblen und motorischen Beeinträchtigungen bei CMT1A und der erblichen Neuropathie mit Neigung zur Druckparese (HNPP) (Bai et al. 2010). Der CB ist definiert als das Versagen eines Nervenimpulses, sich entlang eines Nerven auszubreiten. In der klinischen Routine kann der CB durch einen Vergleich der Amplituden und der Bereiche unter der Kurve (*area under the curve*, AUC) des CMAP nach elektrischer Stimulation eines Nerven an zwei verschiedenen Stellen nachgewiesen werden (Uncini und Kuwabara 2015). CB-Messungen repräsentieren jedoch nur CMAPs der Axone, die immer noch Aktionspotentiale an den neuromuskulären Übergang weiterleiten. Bei einem nicht vollständigen CB könnte mit einer Zunahme der Variabilität der MU-Abflussraten gerechnet werden. In der aktuellen Studie konnte jedoch kein statistischer Unterschied zwischen den insgesamt über 500 identifizierten und ausgewerteten motorischen Einheiten festgestellt werden. Man misst mit der Ermittlung eines Leitungsblocks methodisch indirekt die nicht mehr funktionsfähigen motorischen Einheiten, Aussagen über die funktionierenden können nur eingeschränkt getroffen werden.

In dieser Studie wiederum wurden mittels HD-sEMG die funktionsfähigen Einheiten untersucht, die keinen Leitungsblock aufweisen. In diesem Zusammenhang muss allerdings diskutiert werden, ob eine Kontraktion mit einer Dauer von 30 bis 40 Sekunden zu kurz sein kann, um einen CB zu erfassen. Der Hauptbefund einer verringerten Steigung in der DR

könnte, wie oben diskutiert, durch Veränderungen des elektrischen Zugangs zur internodalen Membran und den dort lokalisierten spannungsgesteuerten Kanälen bedingt sein.

4.5 KRAFTSTEUERUNG IN CMT1A

Die erhobenen Daten zeigen eine signifikant erhöhte Variabilität der Kraft bei den CMT1A-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen. Am stärksten war diese Variabilität bei niedrigen Kraftwerten von 5 % MVC ausgeprägt. Eine rationale Erklärung dieses Phänomens könnte darin bestehen, dass die sensomotorische Kontrolle und Steuerung der Muskulatur in CMT1A beeinträchtigt ist. Die Fähigkeit, die DR zu modulieren und so eine Anpassung der ausgeübten Muskelkraft zu erzeugen, ist gegenüber Gesunden reduziert. Dies spiegelt sich auch in Störungen der Feinmotorik und Abstimmung der Kraft bei der Ausführung präziserer Bewegungsabläufe wider.

4.6 REKRUTIERUNG VON MOTORISCHEN EINHEITEN IN CMT1A

Im motorischen System kann eine Kraftentwicklung durch die Geschwindigkeitskodierung und/oder durch eine Erhöhung der Anzahl aktiver MUs innerhalb des motorisch-neuronalen Pools erreicht werden. Dies wird als Rekrutierung bezeichnet (McPhedran et al. 1965). Da CMT1A-Patienten die Kraft, wie oben beschrieben, nicht durch eine Geschwindigkeitskodierung erhöhen können, würde man hier erwarten, dass dies durch die Rekrutierung von weiteren MUs bewirkt wird. Durch eine Analyse der Spannungsamplitude des gesamten aufgezeichneten Messbereichs eines Signals konnte diese Hypothese in der aktuellen Studie belegt werden. Unsere Daten zeigen, dass die normierte Spannung während der isometrischen Kontraktion in CMT1A bei allen Kraftstufen im Vergleich zu HCs signifikant höher war. Darüber hinaus unterschieden sich die Änderungen der EMG-Amplitude über die Kraftniveaus nicht zwischen CMT1A und HCs. Auch unter der Berücksichtigung der Einschränkungen globaler EMG-Ableitungen zur Erfassung von verschiedenen Rekrutierungsstrategien (Farina et al. 2014) ist es daher möglich, dass die CMT1A-Patienten, um dieselben normalisierten Kraftniveaus wie gesunde Personen zu erreichen, ein entsprechend verändertes Rekrutierungsverhalten zur Kompensation aufweisen.

4.7 KANN EINE BEEINTRÄCHTIGTE ERREGBARKEIT EINE BEEINTRÄCHTIGTE KODIERUNG DER ENTLADUNGSFREQUENZ IN CMT1A ERKLÄREN?

Frühere Untersuchungen zur Erregbarkeit von motorischen Axonen im Rahmen einer Demyelinisierung in CMT ergaben, dass die Beeinträchtigung der passiven elektrischen Leitungseigenschaften aufgrund von Veränderungen des Myelins und des axonalen Kalibers mit Änderungen der spannungsabhängigen Eigenschaften einhergeht. Hierzu gehört eine erhöhte Gleichrichtung nach außen (vermittelt durch K^+ -Ströme) sowie eine erhöhte Einwärtsrektifikation, vermittelt durch hyperpolarisationsaktivierte, cyclische-nukleotidgesteuerte HCN-Kanäle (Jankelowitz und Burke 2013; Liang et al. 2014; Nodera et al. 2004). Unter der Verwendung eines validierten mathematischen Modells (Howells et al. 2012) wurde gezeigt, dass Erregbarkeitsstörungen bei einer Gruppe von fünf CMT1A-Patienten mit milder Neuropathie größtenteils durch einen verbesserten elektrischen Zugang zu den spannungsgesteuerten Kanälen in der internodalen Membran, einschließlich der schnellen K^+ -Kanäle, erklärt werden können (Abb. 5, Tabelle 3). Frühere morphologische Studien ergaben, dass die für eine normale repetitive Impulsleitung erforderliche juxtaparanodale Sequestrierung von K_v1 -Kanälen bei demyelinisierender CMT beeinträchtigt ist (Devaux und Scherer 2005; Kohl et al. 2010; Li 2015). Ströme könnten die Depolarisation des Knotens (Ranvier'scher Schnürring) einschränken und die repetitive Leitung in CMT1A beeinträchtigen. Es wurde gezeigt, dass eine Zunahme der CMAP-Latenz mit einer Beeinträchtigung der Erregbarkeit korreliert. Dies wurde gemessen durch eine Zunahme des Reizstroms bei einer maximalen Reaktion von 50 % (Abb. 8), die auch als unabhängiges Maß für die Unterscheidung zwischen verschiedenen demyelinisierenden Neuropathien angesehen werden kann (Liang et al. 2014). Der Grad des "Auffächerns", insbesondere im Rahmen des hyperpolarisierenden Elektrotonus, wurde als Biomarker für Erregbarkeitsänderungen in CMT1A gewertet (Fledrich et al. 2014). In einer Querschnittskorrelationsanalyse wurde ermittelt, dass bei Patienten mit niedrigeren CMAP-Amplituden (möglicherweise als Hinweis auf ein fortgeschrittenes Krankheitsstadium) das *fanning out* abgeschwächt auftrat (Abb. 9, 10). Die einfachste Erklärung für diesen Befund ist, dass Fasern, die mit den stärksten Erregbarkeitsstörungen innerhalb der Motoneuronpopulation einhergehen, zuerst absterben. Als solches ist der erhöhte elektrische Zugang zur Internodalmembran, der durch die Zunahme des GBB angezeigt wird, ein Hinweis auf die Schwere der Krankheit - entweder als ein Teil des axonalen Abbaus oder aufgrund eines spezifischeren pathogenen Prozesses (Kleinecke et al. 2017).

4.8 KLINISCHE RELEVANZ DER ERGEBNISSE

Der CMTNS2 ist ein validiertes klinisches Messwerkzeug, das für die Verwendung in klinischen Studien entwickelt wurde und motorische und sensible Symptome sowie neurophysiologische Befunde kombiniert (Sadjadi et al. 2014). Molekulare Biomarker, die aus mRNA aus Hautgewebe stammen, haben sich als ein nützliches Prognosewerkzeug etabliert (Fledrich et al. 2017). Direkte Rückschlüsse auf die funktionelle Konsequenz für die neuromuskuläre Funktion können daraus jedoch nicht abgeleitet werden.

Axonaler Verlust und niedrigerer MUNIX wurden als messbare Ergebnisse des Fortschreitens der Erkrankung beschrieben, die mit der klinischen Behinderung bei CMT1A zusammenhängen (Bas et al. 2018). In der vorliegenden Studie wurde zum ersten Mal analysiert, wie sich das elektrische Verhalten vieler MUs gleichzeitig bei CMT1A-Patienten zeigt. Hierbei zeigte sich, dass die Kodierung und Rekrutierung von MUs und der DR im Vergleich zu HCs verändert sind. Um die klinische Signifikanz zu belegen, wurden diese Ergebnisse mit standardisierten Werten (NCV, CMTNS2) korreliert. Es wurde gezeigt, dass die Steigung der DR bei zunehmenden Kraftniveaus negativ mit dem CMTNS2 korreliert. Eine Erklärung könnte sein, dass eine erhöhte axonale Erregbarkeit und/oder Aktivierung von PICs direkte pathophysiologische Prozesse repräsentiert, die eine Sättigung der DR verursachen. Daher kann die Steigung der DR in CMT1A als einer der ersten mechanismenbasierten *In-vivo*-Biomarker diskutiert werden, der möglicherweise in zukünftigen klinischen Studien verwendet werden kann.

In der CMT1A-Erkrankung kommt es zu strukturellen Veränderungen peripherer Nerven, die sich in der Nervenerregbarkeit und dem Entladungs- und Rekrutierungsverhalten motorischer Einheiten widerspiegeln. Elektrophysiologische Messmethoden wie das HD-sEMG und die Messung der Nervenexzitabilität sind hierbei einfach anzuwendende Verfahren, die im Tiermodell wie auch am Patienten eine Erfassung dieser Veränderungen und die Korrelation mit klinischen Parametern ermöglichen. Zur Etablierung dieser Methoden sind weitere klinische Studien notwendig, um die Messprotokolle auf die höchste klinische Effizienz zu bringen und die Effektivität der Messungen hinsichtlich einer beschleunigten Diagnostik und exakten Verlaufsbeobachtung zu optimieren.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Charcot-Marie-Tooth-Typ-1A-Erkrankung ist die häufigste erbliche bedingte Neuropathie ohne eine aktuell verfügbare ursächliche Therapie. Die vorliegende Arbeit überprüft, ob die hochauflösende Oberflächen-Elektromyographie mit Ableitung von 64 Kanälen eine effektive Methode zur Messung der Erkrankungsschwere darstellt, indem die elektrophysiologischen Eigenschaften einzelner motorischer Einheiten bei der Durchführung isometrischer Kontraktionen auf unterschiedlichen Kraftstufen bestimmt werden.

Hierzu wurde die Elektromyographie simultan mit der ausgeübten Muskelkraft von zehn Patienten mit genetisch gesicherter Erkrankung und zehn gesunden Kontrollpersonen aufgezeichnet, während eine isometrische Dorsalflexion des Fußes bei verschiedenen Kraftniveaus durchgeführt wurde. Bei den Patienten war bei jeder Kraftstufe die aufsummierte gesamte elektrische Muskelaktivität in relativen Einheiten bezogen auf die normalisierte Maximalkraft größer als bei Probanden. Wie aus der Physiologie bekannt, feuerten die einzelnen Aktionspotentiale der motorischen Einheiten bei zunehmender Kraft mehr, bei den Patienten allerdings mit geringerer Zunahme. Dies lässt sich bei gleicher Kraftentwicklung nur durch Rekrutierung zusätzlicher motorischer Einheiten erklären.

In den Messungen der Nervenexzitabilität, die bei fünf Patienten durchgeführt wurden, zeigten die entsprechenden mathematischen Modellierungen einen erhöhten elektrischen Zugang zur internodalen Membran, verbunden mit einem Anstieg der internodalen Gleichrichtungsströme nach außen und innen. Dieser Befund korreliert sehr gut mit der bekannten Strukturveränderung des Internodiums bei hereditären demyelinisierenden Neuropathien.

Bei den Patienten spielt eine eingeschränkte Fähigkeit zur Erhöhung der Entladungsraten der motorischen Einheiten bei höheren Kraftstufen eine wichtige Rolle. Der Anstieg der Entladungsraten korreliert hierbei gut mit der Schwere der Erkrankung. Hiernach ist es möglich, dass erhöhte axonale Kaliumströme während des Demyelinisierungsprozesses zu den durch die hochauflösende Oberflächen-Elektromyographie gemessenen Änderungen des Kodierungsverhaltens im Sinne eines verringerten Anstiegs der Entladungsraten und einer früheren Rekrutierung weiterer motorischer Einheiten beitragen.

REFERENZEN

- Adrian ED, Bronk DW (1929): The discharge of impulses in motor nerve fibres: Part II. The frequency of discharge in reflex and voluntary contractions. *J Physiol* 67, i3-151
- Applegate C, Burke D (1989): Changes in excitability of human cutaneous afferents following prolonged high-frequency stimulation. *Brain* 112, 147-164
- Arroyo EJ, Xu YT, Zhou L, Messing A, Peles E, Chiu SY, Scherer SS (1999): Myelinating Schwann cells determine the internodal localization of K_v1.1, K_v1.2, K_vβ2, and Caspr. *J Neurocytol* 28, 333-347
- Bai Y, Zhang X, Katona I, Saporta MA, Shy ME, O'Malley HA, Isom LL, Suter U, Li J (2010): Conduction block in PMP22 deficiency. *J Neurosci* 30, 600-608
- Baker M, Bostock H, Grafe P, Martius P (1987): Function and distribution of three types of rectifying channel in rat spinal root myelinated axons. *J Physiol* 383, 45-67
- Barreto LC, Oliveira FS, Nunes PS, de Franca Costa IM, Garcez CA, Goes GM, Neves EL, de Souza Siqueira Quintans J, de Souza Araujo AA (2016): Epidemiologic Study of Charcot-Marie-Tooth Disease: A Systematic Review. *Neuroepidemiology* 46, 157-165
- Barrett EF, Barrett JN (1982): Intracellular recording from vertebrate myelinated axons: mechanism of the depolarizing afterpotential. *J Physiol* 323, 117-144
- Bartl M, Stassart RM, Fledrich R, Sereda MW (2019): Aktuelles zur Charcot-Marie-Tooth-Erkrankung. *Nervenheilkunde* 38, 389-396
- Bas J, Delmont E, Fatehi F, Salort-Campana E, Verschueren A, Pouget J, Lefebvre MN, Grapperon AM, Attarian S (2018): Motor unit number index correlates with disability in Charcot-Marie-Tooth disease. *Clin Neurophysiol* 129, 1390-1396
- Bawa PN, Jones KE, Stein RB (2014): Assessment of size ordered recruitment. *Front Hum Neurosci* 8, 532
- Behrends JC, Bischofberger J, Deutzmann R (Hrsg.): *Duale Reihe Physiologie*. 3. Auflage; Thieme, Stuttgart 2017

- Benarroch EE (2013): HCN channels: function and clinical implications. *Neurology* 80, 304-310
- Benoy V, Vanden Berghe P, Jarpe M, Van Damme P, Robberecht W, Van Den Bosch L (2017): Development of Improved HDAC6 Inhibitors as Pharmacological Therapy for Axonal Charcot-Marie-Tooth Disease. *Neurotherapeutics* 14, 417-428
- Bhattacharjee A, Kaczmarek LK (2005): For K^+ channels, Na^+ is the new Ca^{2+} . *Trends Neurosci* 28, 422-428
- Birch B, Kocsis J, Di Gregorio F, Bhisitkul R, Waxman S (1991): A voltage- and time-dependent rectification in rat dorsal spinal root axons. *J Neurophysiol* 66, 719-728
- Boron W, Boulpaep E (Hrsg.): *Medical Physiology E-Book*. 3. Auflage; Elsevier Health Sciences, Amsterdam 2016
- Bostock H (1983): The strength-duration relationship for excitation of myelinated nerve: computed dependence on membrane parameters. *J Physiol* 341, 59-74
- Bostock H, Grafe P (1985): Activity-dependent excitability changes in normal and demyelinated rat spinal root axons. *J Physiol* 365, 239-257
- Bostock H, Rothwell JC (1997): Latent addition in motor and sensory fibres of human peripheral nerve. *J Physiol* 498, 277-294
- Bostock H, Baker M, Reid G (1991): Changes in excitability of human motor axons underlying post-ischaemic fasciculations: evidence for two stable states. *J Physiol* 441, 537-557
- Bostock H, Cikurel K, Burke D (1998): Threshold tracking techniques in the study of human peripheral nerve. *Muscle Nerve* 21, 137-158
- Bräu M, Nau C, Hempelmann G, Vogel W (1995): Local anesthetics potently block a potential insensitive potassium channel in myelinated nerve. *J Gen Physiol* 105, 485-505
- Brown D, Adams P (1980): Muscarinic suppression of a novel voltage-sensitive K^+ current in a vertebrate neurone. *Nature* 283, 673-676

- Burke D, Kiernan MC, Bostock H (2001): Excitability of human axons. *Clin Neurophysiol* 112, 1575-1585
- Burke RE, Tsairis P (1977): Histochemical and physiological profile of a skeletofusimotor (beta) unit in cat soleus muscle. *Brain Res* 129, 341-345
- Cappelen-Smith C, Kuwabara S, Lin CSY, Mogyoros I, Burke D (2000): Activity-dependent hyperpolarization and conduction block in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Ann Neurol* 48, 826-832
- Carpentier A, Duchateau J, Hainaut K (2001): Motor unit behaviour and contractile changes during fatigue in the human first dorsal interosseus. *J Physiol* 534, 903-912
- Catterall WA (1992): Cellular and molecular biology of voltage-gated sodium channels. *Physiol Rev* 72, 15-48
- Chaplan SR, Guo HQ, Lee DH, Luo L, Liu C, Kuei C, Velumian AA, Butler MP, Brown SM, Dubin AE (2003): Neuronal hyperpolarization-activated pacemaker channels drive neuropathic pain. *J Neurosci* 23, 1169-1178
- Chen M, Zhou P (2016): A Novel Framework Based on FastICA for High Density Surface EMG Decomposition. *IEEE Trans Neural Syst Rehabil Eng* 24, 117-127
- Chiu S, Ritchie JM (1984): On the physiological role of internodal potassium channels and the security of conduction in myelinated nerve fibres. *Proc R Soc Lond Biol Sci* 220, 415-422
- Cole KS, Curtis HJ (1939): Electric impedance of the squid giant axon during activity. *J Gen Physiol* 22, 649-670
- Constanti A, Galvan M (1983): Fast inward-rectifying current accounts for anomalous rectification in olfactory cortex neurones. *J Physiol* 335, 153-178
- Cornett KM, Menezes MP, Bray P, Halaki M, Shy RR, Yum SW, Estilow T, Moroni I, Foscan M, Pagliano E et al. (2016): Phenotypic Variability of Childhood Charcot-Marie-Tooth Disease. *JAMA Neurol* 73, 645-651
- Czesnik D, Howells J, Negro F, Wagenknecht M, Hanner S, Farina D, Burke D, Paulus W (2015): Increased HCN channel driven inward rectification in benign cramp fasciculation syndrome. *Brain* 138, 3168-3179

- Debanne D, Campanac E, Bialowas A, Carlier E, Alcaraz G (2011): Axon physiology. *Physiol Rev* 91, 555-602
- Del Vecchio A, Negro F, Felici F, Farina D (2017): Associations between motor unit action potential parameters and surface EMG features. *J Appl Physiol* 123, 835-843
- Desnedt HE, Gidiaux E (1981): Spinal motoneuron recruitment in man: rank deordering with direction but not with speed of voluntary movement. *Science* 214, 933-936
- Devaux JJ, Scherer SS (2005): Altered ion channels in an animal model of Charcot-Marie-Tooth disease type IA. *J Neurosci* 25, 1470-1480
- Drost G, Stegeman DF, van Engelen BG, Zwarts MJ (2006): Clinical applications of high-density surface EMG: a systematic review. *J Electromyogr Kinesiol* 16, 586-602
- Dubois JM (1981): Evidence for the existence of three types of potassium channels in the frog Ranvier node membrane. *J Physiol* 318, 297-316
- Duchateau J, Enoka RM (2011): Human motor unit recordings: origins and insight into the integrated motor system. *Brain Res* 1409, 42-61
- ElBasiouny SM, Schuster JE, Heckman CJ (2010): Persistent inward currents in spinal motoneurons: important for normal function but potentially harmful after spinal cord injury and in amyotrophic lateral sclerosis. *Clin Neurophysiol* 121, 1669-1679
- Eng DL, Gordon TR, Kocsis JD, Waxman S (1990): Current-clamp analysis of a time-dependent rectification in rat optic nerve. *J Physiol* 421, 185-202
- Falla D, Farina D (2008): Non-uniform adaptation of motor unit discharge rates during sustained static contraction of the upper trapezius muscle. *Exp Brain Res* 191, 363-370
- Farina D, Holobar A (2015): Human? Machine interfacing by decoding the surface electromyogram [life sciences]. *IEEE Signal Process Mag* 32, 115-120
- Farina D, Fosci M, Merletti R (2002): Motor unit recruitment strategies investigated by surface EMG variables. *J Appl Physiol* 92, 235-247
- Farina D, Merletti R, Enoka RM (2004): The extraction of neural strategies from the surface EMG. *J Appl Physiol* 96, 1486-1495

- Farina D, Merletti R, Enoka RM (2014): The extraction of neural strategies from the surface EMG: an update. *J Appl Physiol* 117, 1215-1230
- Farina D, Holobar A, Merletti R, Enoka RM (2010): Decoding the neural drive to muscles from the surface electromyogram. *Clin Neurophysiol* 121, 1616-1623
- Farina D, Negro F, Muceli S, Enoka RM (2016): Principles of Motor Unit Physiology Evolve With Advances in Technology. *Physiology (Bethesda)* 31, 83-94
- Fledrich R, Schlotter-Weigel B, Schnizer TJ, Wichert SP, Stassart RM, Meyer zu Horste G, Klink A, Weiss BG, Haag U, Walter MC et al. (2012): A rat model of Charcot-Marie-Tooth disease 1A recapitulates disease variability and supplies biomarkers of axonal loss in patients. *Brain* 135, 72-87
- Fledrich R, Stassart RM, Klink A, Rasch LM, Prukop T, Haag L, Czesnik D, Kungl T, Abdelaal TA, Keric N et al. (2014): Soluble neuregulin-1 modulates disease pathogenesis in rodent models of Charcot-Marie-Tooth disease 1A. *Nat Med* 20, 1055-1061
- Fledrich R, Mannil M, Leha A, Ehbrecht C, Solari A, Pelayo-Negro AL, Berciano J, Schlotter-Weigel B, Schnizer TJ, Prukop T et al. (2017): Biomarkers predict outcome in Charcot-Marie-Tooth disease 1A. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 88, 941-952
- Fridman V, Bundy B, Reilly MM, Pareyson D, Bacon C, Burns J, Day J, Feely S, Finkel RS, Grider T et al. (2015): CMT subtypes and disease burden in patients enrolled in the Inherited Neuropathies Consortium natural history study: a cross-sectional analysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 86, 873-878
- Goldin AL, Barchi RL, Caldwell JH, Hofmann F, Howe JR, Hunter JC, Kallen RG, Mandel G, Meisler MH, Netter YB et al. (2000): Nomenclature of voltage-gated sodium channels. *Neuron* 28, 365-368
- Grafe P, Quasthoff S, Grosskreutz J, Alzheimer C (1997): Function of the hyperpolarization-activated inward rectification in nonmyelinated peripheral rat and human axons. *J Neurophysiol* 77, 421-426
- Graham RC, Hughes RA (2006): A modified peripheral neuropathy scale: the Overall Neuropathy Limitations Scale. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 77, 973-976

- Gutman GA, Chandy KG, Grissmer S, Lazdunski M, Mckinnon D, Pardo LA, Robertson GA, Rudy B, Sanguinetti MC, Stühmer W (2005): International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacol Rev* 57, 473-508
- Han P, Nakanishi ST, Tran MA, Whelan PJ (2007): Dopaminergic modulation of spinal neuronal excitability. *J Neurosci* 27, 13192-13204
- Harding AE, Thomas PK (1980): Genetic aspects of hereditary motor and sensory neuropathy (types I and II). *J Med Genet* 17, 329-336
- Heckman CJ, Enoka RM (2012): Motor unit. *Compr Physiol* 2, 2629-2682
- Heckman CJ, Gorassini MA, Bennett DJ (2005): Persistent inward currents in motoneuron dendrites: implications for motor output. *Muscle Nerve* 31, 135-156
- Heckman CJ, Johnson M, Mottram C, Schuster J (2008): Persistent inward currents in spinal motoneurons and their influence on human motoneuron firing patterns. *Neuroscientist* 14, 264-275
- Heckman CJ, Mottram C, Quinlan K, Theiss R, Schuster J (2009): Motoneuron excitability: the importance of neuromodulatory inputs. *Clin Neurophysiol* 120, 2040-2054
- Henneman E (1957): Relation between size of neurons and their susceptibility to discharge. *Science* 126, 1345-1347
- Hille B: Ionic channels of excitable membranes. 2. Auflage; Sinauer Associates Inc, Massachusetts 1992
- Hodgkin AL, Huxley AF (1952): A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J Physiol* 117, 500-544
- Hogrel JY (2005): Clinical applications of surface electromyography in neuromuscular disorders. *Neurophysiol Clin* 35, 59-71
- Holobar A, Zazula D (2007): Multichannel blind source separation using convolution kernel compensation. *IEEE Trans Signal Process* 55, 4487-4496

- Holobar A, Farina D, Gazzoni M, Merletti R, Zazula D (2009): Estimating motor unit discharge patterns from high-density surface electromyogram. *Clin Neurophysiol* 120, 551-562
- Holobar A, Minetto MA, Botter A, Negro F, Farina D (2010): Experimental analysis of accuracy in the identification of motor unit spike trains from high-density surface EMG. *IEEE Trans Neural Syst Rehabil Eng* 18, 221-229
- Horrigan FT, Aldrich RW (2002): Coupling between voltage sensor activation, Ca²⁺ binding and channel opening in large conductance (BK) potassium channels. *J Gen Physiol* 120, 267-305
- Howells J, Trevillion L, Bostock H, Burke D (2012): The voltage dependence of I_h in human myelinated axons. *J Physiol* 590, 1625-1640
- Hyvärinen A, Oja E (1997): A fast fixed-point algorithm for independent component analysis. *Neural Comput* 9, 1483-1492
- Jankelowitz SK, Burke D (2013): Pathophysiology of HNPP explored using axonal excitability. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 84, 806-812
- Jessell TM, Surmeli G, Kelly JS (2011): Motor neurons and the sense of place. *Neuron* 72, 419-424
- Jiang YQ, Xing GG, Wang SL, Tu HY, Chi YN, Li J, Liu FY, Han JS, Wan Y (2008): Axonal accumulation of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channels contributes to mechanical allodynia after peripheral nerve injury in rat. *Pain* 137, 495-506
- Jonas P, Bräu ME, Hermsteiner M, Vogel W (1989): Single-channel recording in myelinated nerve fibers reveals one type of Na channel but different K channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 7238-7242
- Jonas P, Koh DS, Kampe K, Hermsteiner M, Vogel W (1991): ATP-sensitive and Ca-activated K channels in vertebrate axons: novel links between metabolism and excitability. *Pflugers Arch* 418, 68-73
- Judge SI, Bever Jr CT (2006): Potassium channel blockers in multiple sclerosis: neuronal Kv channels and effects of symptomatic treatment. *Pharmacol Ther* 111, 224-259

- Kaji R, Bostock H, Kohara N, Murase N, Kimura J, Shibasaki H (2000): Activity-dependent conduction block in multifocal motor neuropathy. *Brain* 123, 1602-1611
- Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, Siegelbaum S, Hudspeth AJ, Mack S (Hrsg.): Principles of neural science. 5. Auflage; McGraw-Hill Companies, New York 2013
- Katirji B, Kaminski HJ, Ruff RL (Hrsg.): Neuromuscular disorders in clinical practice. 2. Auflage; Springer Science & Business Media, Berlin 2013
- Kazamel M, Boes CJ (2015): Charcot Marie Tooth disease (CMT): historical perspectives and evolution. *J Neurol* 262, 801-805
- Kiernan MC, Bostock H (2000): Effects of membrane polarization and ischaemia on the excitability properties of human motor axons. *Brain* 123, 2542-2551
- Kiernan MC, Cikurel K, Bostock H (2001): Effects of temperature on the excitability properties of human motor axons. *Brain* 124, 816-825
- Kiernan MC, Lin CSY, Burke D (2004): Differences in activity-dependent hyperpolarization in human sensory and motor axons. *J Physiol* 558, 341-349
- Kiernan MC, Burke D, Andersen KV, Bostock H (2000): Multiple measures of axonal excitability: a new approach in clinical testing. *Muscle Nerve* 23, 399-409
- Kiernan MC, Isbister GK, Lin CS, Burke D, Bostock H (2005): Acute tetrodotoxin-induced neurotoxicity after ingestion of puffer fish. *Ann Neurol* 57, 339-348
- Kiernan MC, Bostock H, Park SB, Kaji R, Krarup C, Krishnan AV, Kuwabara S, Lin CS, Misawa S, Moldovan M et al. (2019): Measurement of axonal excitability: Consensus guidelines. *Clin Neurophysiol* 131, 308-323
- Kim JY, Woo SY, Hong YB, Choi H, Kim J, Choi H, Mook-Jung I, Ha N, Kyung J, Koo SK et al. (2016): HDAC6 Inhibitors Rescued the Defective Axonal Mitochondrial Movement in Motor Neurons Derived from the Induced Pluripotent Stem Cells of Peripheral Neuropathy Patients with HSPB1 Mutation. *Stem Cells Int* 2016, 9475981
- Kleinecke S, Richert S, de Hoz L, Brügger B, Kungl T, Asadollahi E, Quintes S, Blanz J, McGonigal R, Naseri K et al. (2017): Peroxisomal dysfunctions cause lysosomal storage and axonal Kv1 channel redistribution in peripheral neuropathy. *Elife* 6, e23332

- Koh DS, Jonas P, Bräu ME, Vogel W (1992): A TEA-insensitive flickering potassium channel active around the resting potential in myelinated nerve. *J Membr Biol* 130, 149-162
- Kohl B, Fischer S, Groh J, Wessig C, Martini R (2010): MCP-1/CCL2 modifies axon properties in a PMP22-overexpressing mouse model for Charcot-Marie-tooth 1A neuropathy. *Am J Pathol* 176, 1390-1399
- Krarpup C, Moldovan M (2009): Nerve conduction and excitability studies in peripheral nerve disorders. *Curr Opin Neurol* 22, 460-466
- Krishnan AV, Lin CS, Park SB, Kiernan MC (2009): Axonal ion channels from bench to bedside: a translational neuroscience perspective. *Prog Neurobiol* 89, 288-313
- Kukulka CG, Clamann HP (1981): Comparison of the recruitment and discharge properties of motor units in human brachial biceps and adductor pollicis during isometric contractions. *Brain Res* 219, 45-55
- Landrieu P, Baets J (2013): Early onset (childhood) monogenic neuropathies. *Handb Clin Neurol* 115, 863-891
- Larsson HP, Baker OS, Dhillon DS, Isacoff EY (1996): Transmembrane movement of the shaker K⁺ channel S4. *Neuron* 16, 387-397
- Leech C, Stanfield P (1981): Inward rectification in frog skeletal muscle fibres and its dependence on membrane potential and external potassium. *J Physiol* 319, 295-309
- Lefter S, Hardiman O, Ryan AM (2017): A population-based epidemiologic study of adult neuromuscular disease in the Republic of Ireland. *Neurology* 88, 304-313
- Lewis RA, Li J, Fuerst DR, Shy ME, Krajewski K (2003): Motor unit number estimate of distal and proximal muscles in Charcot-Marie-Tooth disease. *Muscle Nerve* 28, 161-167
- Li J (2015): Molecular regulators of nerve conduction-lessons from inherited neuropathies and rodent genetic models. *Exp Neurol* 267, 209-218
- Liang C, Howells J, Kennerson M, Nicholson GA, Burke D, Ng K (2014): Axonal excitability in X-linked dominant Charcot Marie Tooth disease. *Clin Neurophysiol* 125, 1261-1269

- Lin CSY, Kuwabara S, Cappelen-Smith C, Burke D (2002): Responses of human sensory and motor axons to the release of ischaemia and to hyperpolarizing currents. *J Physiol* 541, 1025-1039
- Liu X, Leung LS (2004): Sodium-activated potassium conductance participates in the depolarizing afterpotential following a single action potential in rat hippocampal CA1 pyramidal cells. *Brain Res* 1023, 185-192
- Luiz AP, Wood JN (2016): Sodium Channels in Pain and Cancer: New Therapeutic Opportunities. *Adv Pharmacol* 75, 153-178
- Lynch SL, Boon AJ, Smith J, Harper Jr CM, Tanaka EM (2008): Complications of needle electromyography: hematoma risk and correlation with anticoagulation and antiplatelet therapy. *Muscle Nerve* 38, 1225-1230
- Maccaferri G, Mangoni M, Lazzari A, DiFrancesco D (1993): Properties of the hyperpolarization-activated current in rat hippocampal CA1 pyramidal cells. *J Neurophysiol* 69, 2129-2136
- Manganelli F, Tozza S, Pisciotta C, Bellone E, Iodice R, Nolano M, Geroldi A, Capponi S, Mandich P, Santoro L (2014): Charcot-Marie-Tooth disease: frequency of genetic subtypes in a Southern Italy population. *J Peripheral Nerv Syst* 19, 292-298
- Manganelli F, Pisciotta C, Reilly MM, Tozza S, Schenone A, Fabrizi GM, Cavallaro T, Vita G, Padua L, Gemignani F et al. (2016): Nerve conduction velocity in CMT1A: what else can we tell? *Eur J Neurol* 23, 1566-1571
- Mannil M, Solari A, Leha A, Pelayo-Negro AL, Berciano J, Schlotter-Weigel B, Walter MC, Rautenstrauss B, Schnizer TJ, Schenone A et al. (2014): Selected items from the Charcot-Marie-Tooth (CMT) Neuropathy Score and secondary clinical outcome measures serve as sensitive clinical markers of disease severity in CMT1A patients. *Neuromuscul Disord* 24, 1003-1017
- Marrion NV (1997): Control of M-current. *Annu Rev Physiol* 59, 483-504
- Martinez-Valdes E, Laine C, Falla D, Mayer F, Farina D (2016): High-density surface electromyography provides reliable estimates of motor unit behavior. *Clin Neurophysiol* 127, 2534-2541

- Martinez-Valdes E, Negro F, Laine CM, Falla D, Mayer F, Farina D (2017): Tracking motor units longitudinally across experimental sessions with high-density surface electromyography. *J Physiol* 595, 1479-1496
- Mathis S, Goizet C, Tazir M, Magdelaine C, Lia AS, Magy L, Vallat JM (2015): Charcot-Marie-Tooth diseases: an update and some new proposals for the classification. *J Med Genet* 52, 681-690
- Matsunami N, Smith B, Ballard L, Lensch MW, Robertson M, Albertsen H, Hanemann CO, Muller HW, Bird TD, White R et al. (1992): Peripheral myelin protein-22 gene maps in the duplication in chromosome 17p11.2 associated with Charcot-Marie-Tooth 1A. *Nat Genet* 1, 176-179
- Mayer M, Westbrook G (1983): A voltage-clamp analysis of inward (anomalous) rectification in mouse spinal sensory ganglion neurones. *J Physiol* 340, 19-45
- McCormick DA, Pape HC (1990): Properties of a hyperpolarization-activated cation current and its role in rhythmic oscillation in thalamic relay neurones. *J Physiol* 431, 291-318
- McPhedran AM, Wuerker RB, Henneman E (1965): Properties of motor units in a homogenous red muscle (soleus) of the cat. *J Neurophysiol* 28, 71-84
- Merletti R, Farina D (2009): Analysis of intramuscular electromyogram signals. *Philos Trans A Math Phys Eng Sci* 367, 357-368
- Merletti R, Holobar A, Farina D (2008): Analysis of motor units with high-density surface electromyography. *J Electromyogr Kinesiol* 18, 879-890
- Moldovan M, Alvarez S, Krarup C (2009): Motor axon excitability during Wallerian degeneration. *Brain* 132, 511-523
- Moldovan M, Alvarez S, Rosberg MR, Krarup C (2016): Persistent alterations in active and passive electrical membrane properties of regenerated nerve fibers of man and mice. *Eur J Neurosci* 43, 388-403
- Mori L, Prada V, Signori A, Pareyson D, Piscoquito G, Padua L, Pazzaglia C, Fabrizi GM, Picelli A, Schenone A (2018): Outcome measures in the clinical evaluation of ambulatory Charcot-Marie-Tooth 1A subjects. *Eur J Phys Rehabil Med* 55, 47-55

- Morrow JM, Evans MRB, Grider T, Sinclair CDJ, Thedens D, Shah S, Yousry TA, Hanna MG, Nopoulos P, Thornton JS et al. (2018): Validation of MRC Centre MRI calf muscle fat fraction protocol as an outcome measure in CMT1A. *Neurology* 91, e1125-e1129
- Mottram CJ, Heckman CJ, Powers RK, Rymer WZ, Suresh NL (2014): Disturbances of motor unit rate modulation are prevalent in muscles of spastic-paretic stroke survivors. *J Neurophysiol* 111, 2017-2028
- Murphy SM, Laura M, Fawcett K, Pandraud A, Liu YT, Davidson GL, Rossor AM, Polke JM, Castleman V, Manji H et al. (2012): Charcot-Marie-Tooth disease: frequency of genetic subtypes and guidelines for genetic testing. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 83, 706-710
- Nashmi R, Fehlings MG (2001): Mechanisms of axonal dysfunction after spinal cord injury: with an emphasis on the role of voltage-gated potassium channels. *Brain Res Brain Res Rev* 38, 165-191
- Negro F, Holobar A, Farina D (2009): Fluctuations in isometric muscle force can be described by one linear projection of low-frequency components of motor unit discharge rates. *J Physiol* 587, 5925-5938
- Negro F, Muceli S, Castronovo AM, Holobar A, Farina D (2016): Multi-channel intramuscular and surface EMG decomposition by convolutive blind source separation. *J Neural Eng* 13, 026027
- Nodera H, Bostock H, Kuwabara S, Sakamoto T, Asanuma K, Jia-Ying S, Ogawara K, Hattori N, Hirayama M, Sobue G, et al. (2004): Nerve excitability properties in Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Brain* 127, 203-211
- Oya T, Riek S, Cresswell AG (2009): Recruitment and rate coding organisation for soleus motor units across entire range of voluntary isometric plantar flexions. *J Physiol* 587, 4737-4748
- Padua L, Pazzaglia C, Pareyson D, Schenone A, Aiello A, Fabrizi GM, Cavallaro T, Santoro L, Manganelli F, Gemignani F et al. (2016): Novel outcome measures for Charcot-Marie-Tooth disease: validation and reliability of the 6-min walk test and StepWatch Activity Monitor and identification of the walking features related to higher quality of life. *Eur J Neurol* 23, 1343-1350

- Papazian DM, Timpe LC, Jan YN, Jan LY (1991): Alteration of voltage-dependence of Shaker potassium channel by mutations in the S4 sequence. *Nature* 349, 305-310
- Pape HC (1996): Queer current and pacemaker: the hyperpolarization-activated cation current in neurons. *Annu Rev Physiol* 58, 299-327
- Pareyson D, Shy ME (2018): Neurofilament light, biomarkers, and Charcot-Marie-Tooth disease. *Neurology* 90, 257-259
- Pareyson D, Marchesi C, Salsano E (2013): Dominant Charcot-Marie-Tooth syndrome and cognate disorders. *Handb Clin Neurol* 115, 817-845
- Pareyson D, Saveri P, Pisciotta C (2017): New developments in Charcot-Marie-Tooth neuropathy and related diseases. *Curr Opin Neurol* 30, 471-480
- Pehlivan D, Beck CR, Okamoto Y, Harel T, Akdemir ZH, Jhangiani SN, Withers MA, Goksungur MT, Carvalho CM, Czesnik D et al. (2016): The role of combined SNV and CNV burden in patients with distal symmetric polyneuropathy. *Genet Med* 18, 443-451
- Peters A, Palay S, Webster H (Hrsg.): *The fine structure of the nervous system*. 3. Auflage; Oxford University Press, New York 1991
- Pisciotta C, Shy ME (2018): Neuropathy. *Handb Clin Neurol* 148, 653-665
- Rasband MN (2004): It's "juxta" potassium channel! *J Neurosci Res* 76, 749-757
- Rasband MN, Trimmer JS, Schwarz TL, Levinson SR, Ellisman MH, Schachner M, Shrager P (1998): Potassium channel distribution, clustering, and function in remyelinating rat axons. *J Neurosci* 18, 36-47
- Rau G, Disselhorst-Klug C (1997): Principles of high-spatial-resolution surface EMG (HSR-EMG): single motor unit detection and application in the diagnosis of neuromuscular disorders. *J Electromyogr Kinesiol* 7, 233-239
- Reaz MBI, Hussain M, Mohd-Yasin F (2006): Techniques of EMG signal analysis: detection, processing, classification and applications. *Biological Proced Online* 8, 11-35

- Reid G, Scholz A, Bostock H, Vogel W (1999): Human axons contain at least five types of voltage-dependent potassium channel. *J Physiol* 518, 681-696
- Röper J, Schwarz JR (1989): Heterogeneous distribution of fast and slow potassium channels in myelinated rat nerve fibres. *J Physiol* 416, 93-110
- Rosberg MR, Alvarez S, Klein D, Nielsen FC, Martini R, Levinson SR, Krarup C, Moldovan M (2016): Progression of motor axon dysfunction and ectopic Nav1.8 expression in a mouse model of Charcot-Marie-Tooth disease 1B. *Neurobiol Dis* 93, 201-214
- Rossor AM, Tomaselli PJ, Reilly MM (2016): Recent advances in the genetic neuropathies. *Curr Opin Neurol* 29, 537-548
- Rossor AM, Polke JM, Houlden H, Reilly MM (2013): Clinical implications of genetic advances in Charcot-Marie-Tooth disease. *Nat Rev Neurol* 9, 562-571
- Rudnik-Schoneborn S, Tolle D, Senderek J, Eggermann K, Elbracht M, Kornak U, von der Hagen M, Kirschner J, Leube B, Muller-Felber W et al. (2016): Diagnostic algorithms in Charcot-Marie-Tooth neuropathies: experiences from a German genetic laboratory on the basis of 1206 index patients. *Clin Genet* 89, 34-43
- Sadjadi R, Reilly MM, Shy ME, Pareyson D, Laura M, Murphy S, Feely SM, Grider T, Bacon C, Piscoquito G et al. (2014): Psychometrics evaluation of Charcot-Marie-Tooth Neuropathy Score (CMTNSv2) second version, using Rasch analysis. *J Peripher Nerv Syst* 19, 192-196
- Safronov B, Kampe K, Vogel W (1993): Single voltage-dependent potassium channels in rat peripheral nerve membrane. *J Physiol* 460, 675-691
- Sah P (1996): Ca²⁺-activated K⁺ currents in neurones: types, physiological roles and modulation. *Trends Neurosci* 19, 150-154
- Saporta AS, Sottile SL, Miller LJ, Feely SM, Siskind CE, Shy ME (2011): Charcot-Marie-Tooth disease subtypes and genetic testing strategies. *Ann Neurol* 69, 22-33
- Saporta MA, Shy ME (2013): Inherited peripheral neuropathies. *Neurol Clin* 31, 597-619

- Schwarz J, Glassmeier G, Cooper E, Kao TC, Nodera H, Tabuena D, Kaji R, Bostock H (2006): KCNQ channels mediate IKs, a slow K⁺ current regulating excitability in the rat node of Ranvier. *J Physiol* 573, 17-34
- Schwarz JR, Reid G, Bostock H (1995): Action potentials and membrane currents in the human node of Ranvier. *Pflugers Arch* 430, 283-292
- Sereda M, Griffiths I, Puhlhofer A, Stewart H, Rossner MJ, Zimmerman F, Magyar JP, Schneider A, Hund E, Meinck HM et al. (1996): A transgenic rat model of Charcot-Marie-Tooth disease. *Neuron* 16, 1049-1060
- Shy ME, Blake J, Krajewski K, Fuerst DR, Laura M, Hahn AF, Li J, Lewis RA, Reilly M (2005): Reliability and validity of the CMT neuropathy score as a measure of disability. *Neurology* 64, 1209-1214
- Sivera R, Sevilla T, Vilchez JJ, Martinez-Rubio D, Chumillas MJ, Vazquez JF, Muelas N, Bataller L, Millan JM, Palau F et al. (2013): Charcot-Marie-Tooth disease: genetic and clinical spectrum in a Spanish clinical series. *Neurology* 81, 1617-1625
- Stühmer W, Conti F, Suzuki H, Wang XD, Noda M, Yahagi N, Kubo H, Numa S (1989): Structural parts involved in activation and inactivation of the sodium channel. *Nature* 339, 597-603
- Sun XP, Schlichter LC, Stanley EF (1999): Single-channel properties of BK-type calcium-activated potassium channels at a cholinergic presynaptic nerve terminal. *J Physiol* 518, 639-651
- Swinney DC, Xia S (2014): The discovery of medicines for rare diseases. *Future Med Chem* 6, 987-1002
- Takigawa T, Alzheimer C, Quasthoff S, Grafe P (1997): A specific blocker reveals the presence and function of the hyperpolarization-activated cation current IH in peripheral mammalian nerve fibres. *Neuroscience* 82, 631-634
- Thomas CK, Ross BH, Stein RB (1986): Motor-unit recruitment in human first dorsal interosseous muscle for static contractions in three different directions. *J Neurophysiol* 55, 1017-1029
- Thomas J, Deville Y, Hosseini S (2006): Time-domain fast fixed-point algorithms for convolutive ICA. *IEEE Signal Process Lett* 13, 228-231

- Tomlinson BE, Irving D (1977): The numbers of limb motor neurons in the human lumbosacral cord throughout life. *J Neurol Sci* 34, 213-219
- Uncini A, Kuwabara S (2015): Nodopathies of the peripheral nerve: an emerging concept. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 86, 1186-1195
- van Dijk JG, van Benten I, Kramer CG, Stegeman DF (1999): CMAP amplitude cartography of muscles innervated by the median, ulnar, peroneal, and tibial nerves. *Muscle Nerve* 22, 378-389
- Veech RL, King MT, Pawlosky R, Bradshaw PC, Curtis W (2019): Relationship between inorganic ion distribution, resting membrane potential, and the $\Delta G'$ of ATP hydrolysis: a new paradigm. *FASEB J* 33, 13126-13130
- Walsh M, Bell KM, Chong B, Creed E, Brett GR, Pope K, Thorne NP, Sadedin S, Georgeson P, Phelan DG et al. (2017): Diagnostic and cost utility of whole exome sequencing in peripheral neuropathy. *Ann Clin Trans Neurol* 4, 318-325
- Wang H, Kunkel DD, Martin TM, Schwartzkroin PA, Tempel BL (1993): Heteromultimeric K⁺ channels in terminal and juxtaparanodal regions of neurons. *Nature* 365, 75-79
- Wang X, Bai Y (2016): The global Minmax k-means algorithm. *Springerplus* 5, 1665
- Waxman SG, Ritchie JM (1993): Molecular dissection of the myelinated axon. *Ann Neurol* 33, 121-136
- Waxman SG, Kocsis JD, Stys PK (Hrsg.): *The axon: structure, function, and pathophysiology*. 1. Auflage; Oxford University Press, Oxford 1995
- Weiss G (1901): Sur la possibilité de rendre comparables entre eux les appareils servant à l'excitation électrique. *Arch Ital Biol* 35, 413-446
- Zagotta WN, Olivier NB, Black KD, Young EC, Olson R, Gouaux E (2003): Structural basis for modulation and agonist specificity of HCN pacemaker channels. *Nature* 425, 200-205

DANKSAGUNG

Mein herzlicher Dank gilt Prof. Dr. med. Walter Paulus, Universitätsmedizin Göttingen (UMG), der mich für die klinische Neurophysiologie, die Neurologie als Ganzes, sowie für wissenschaftliches Arbeiten begeistert hat und maßgeblich an meiner wissenschaftlichen und klinischen Ausbildung beteiligt gewesen ist. Weiterhin an Dr. med. Dirk Czesnik, UMG, der die Arbeit an diesem Projekt initiiert hat und mich während des gesamten Verlaufs betreut hat. Danke außerdem an Dr. rer. nat. Francesco Negro, Universität Brescia, für die konstruktive Zusammenarbeit bei der Anwendung der *Multi-Unit*-EMG Technologie und Elisabeth Veiz, M. Sc., UMG, für die gute Kooperation bei der Datenanalyse und an die AG Moldovan/Krarup, Center for Neuroscience, Universität Kopenhagen, für die mathematische Modellierung der Exzitabilitätsmessungen. Danksagungen gehen weiterhin an Prof. Dr. med. Michael W. Sereda, UMG, Max-Planck-Institut für exp. Medizin, für die Möglichkeit der Arbeit im Forschungsgebiet hereditäre Neuropathien und die klinische Untersuchung von CMT1A-Patientinnen und Patienten. Weiterhin an Dr. med. Thomas Prukop, UMG, MPI für exp. Medizin, der die Patientinnen und Patienten in der Neurogenetikambulanz betreut hat und an Dr. rer. nat. Lisa Reinecke und Anja Schadenberg, UMG, für die gute Zusammenarbeit bei der Rekrutierung und Organisation. Außerdem gilt mein Dank den medizinisch-technischen Assistentinnen Julia Graf und Franziska Hilger für die tatkräftige Unterstützung bei den EMG- und Exzitabilitätsmessungen. Ich bedanke mich außerdem herzlich für die langjährige und intensive Unterstützung bei jeglichen Projekten und beruflichen Aktivitäten in Forschung und Klinik bei Marion Kurze, UMG, und bei Prof. Dr. med. Claudia Trenkwalder, UMG und Paracelsus-Elena-Klinik Kassel, für die Förderung und Unterstützung meiner wissenschaftlichen Tätigkeiten.