

**Aus der Neurologischen Klinik und Poliklinik
der Universität Würzburg**

Direktor: Professor Dr. med. Jens Volkmann

**CSF-1-Rezeptor Inhibitor als Therapieansatz in Mausmodellen für
Charcot-Marie-Tooth Neuropathien Typ 1**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

David Lukas Schreiber

aus München

Würzburg, Juni 2018



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

Korreferent: Prof. Dr. med. Heike Rittner

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 08.01.2019

Der Promovend ist Arzt.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Charcot-Marie-Tooth Neuropathien: Klinik und Klassifikation	1
1.2 CMT 1 Subtypen und ihre Mausmodelle	3
1.2.1 Charcot-Marie-Tooth Neuropathie Typ 1A	3
1.2.2 Charcot-Marie-Tooth Neuropathie Typ 1B.....	4
1.2.3 Charcot-Marie-Tooth Neuropathie Typ 1X	5
1.3 Die Rolle des Immunsystems in der Pathogenese von CMT 1	6
1.4 Der CSF-1 Signalweg als Angriffspunkt für eine medikamentöse Intervention	10
1.5 Ziel der Arbeit	11
2. Material und Methoden	12
2.1 Technisches Equipment, Reagenzien, Puffer und Lösungen, Primer Sequenzen und Antikörper	12
2.2 Mausmodelle und Genotypisierung	12
2.3 CSF-1-Rezeptor-Inhibitor Behandlung	13
2.4 Greiftest.....	13
2.5 Neurophysiologische Messungen.....	14
2.6 Präparation, Entnahme und Fixierung des Gewebes.....	14
2.7 Immunhistochemie	15
2.7.1 Immunhistochemische Färbung gegen F4/80 und CD34	15
2.7.2 Immunhistochemische Färbung neuromuskulärer Synapsen.....	16
2.8 Semidünnschnitte und Elektronenmikroskopie.....	16
2.9 Statistische Methoden	17
3. Ergebnisse	19
3.1 CSF-1-Rezeptor-Inhibitor Behandlung Cx32 defizienter Mäuse (CMT 1X)	19
3.1.1 CSF1RI Behandlung führt zur Reduktion der Makrophagenanzahl im Nervus Quadriceps.....	19
3.1.2 Verbesserung ultrastruktureller Veränderungen in behandelten Cx32 defizienten Mutanten.....	21
3.1.3 Erhalt der neuromuskulären Innervation unter CSF1RI Behandlung	26

3.1.4 Verbesserung funktioneller Parameter Cx32 defizienter Mutanten unter CSF1RI Behandlung.....	28
3.2 CSF-1-Rezeptor-Inhibitor Behandlung P0 heterozygoter Mäuse (CMT 1B)	34
3.2.1 CSF1RI Behandlung führt zu Reduktion der Makrophagenanzahl im Nervus Quadriceps.....	34
3.2.2 Verbesserter Erhalt der Myelinintegrität nach CSF1RI Behandlung.....	36
3.2.3 Trend zu verbesserter neuromuskulärer Innervation unter CSF1RI Behandlung ...	40
3.2.4 Verbesserung funktioneller Parameter P0 heterozygoter Mäuse unter CSF1RI Behandlung.....	41
3.3 CSF-1-Rezeptor-Inhibitor Behandlung PMP22 transgener Mäuse (CMT 1A)	44
3.3.1 CSF1RI Behandlung führt zur Reduktion der Makrophagenanzahl im Nervus Quadriceps.....	44
3.3.2 Ultrastrukturelle Untersuchungen zeigen keinen Effekt der CSF1RI Behandlung.	45
3.3.3 Keine Verbesserung funktioneller Parameter nach CSF1RI Behandlung	47
4. Diskussion	49
4.1 Reduktion der sekundären Entzündungsreaktion unter CSF1RI Behandlung	49
4.2 CMT 1X: Verbesserung histopathologischer und funktioneller Parameter in Cx32def Mäusen unter CSF1RI Behandlung.....	50
4.3 CMT 1B: Teilweise Verbesserung histopathologischer und funktioneller Parameter in P0het Mäusen unter CSF1RI Behandlung	51
4.4 CMT 1A: Keine Verbesserung der pathologischen Charakteristika in PMP22tg Mäusen unter CSF1RI Behandlung	52
4.5 CSF1RI als mögliches Therapeutikum für CMT 1 Neuropathien	54
5. Zusammenfassung.....	57
6. Anhang	59
6.1 Materialien	59
6.1.1 Technisches Equipment.....	59
6.1.2 Reagenzien	60
6.1.3 Puffer und Lösungen	61
6.1.4 Primer Sequenzen.....	62
6.1.5 Antikörper	63
6.2 Literaturverzeichnis.....	64
6.3 Abbildungsverzeichnis	73

6.4 Abkürzungsverzeichnis	76
---------------------------------	----

Danksagung

Lebenslauf

Ein Teil der Ergebnisse dieser Promotionsarbeit wurde bereits in folgender Publikation veröffentlicht:

Klein D, Patzkó Á, Schreiber D, van Hauwermeiren A, Baier M, Groh J, West BL, Martini R (2015) Targeting the colony stimulating factor I receptor alleviates two forms of Charcot-Marie-Tooth disease in mice. *Brain* 138:3193–3205.

1. Einleitung

1.1 Charcot-Marie-Tooth Neuropathien: Klinik und Klassifikation

Charcot-Marie-Tooth Neuropathien (CMT), auch als Hereditäre motorisch-sensible Neuropathien (HMSN) bezeichnet, sind eine große Gruppe klinisch und genetisch heterogener Erkrankungen des peripheren Nervensystems. Erstmals 1886 beschrieben von Jean-Martin Charcot, Pierre Marie und Howard Henry Tooth, sind sie mit einer Häufigkeit von 1:2500 die häufigsten hereditären Neuropathien (Skre, 1974; Emery, 1991; Gutmann and Shy, 2015). Klinisch präsentieren sich die CMT Neuropathien typischerweise mit muskulären Defiziten der Extremitäten, welche von distal nach proximal fortschreiten. Hierbei sind zuerst die langen Nerven der unteren Extremität betroffen und erst im späteren Verlauf die oberen Extremitäten. Klassische Folgen des neuronalen Schadens sind Muskelatrophie, vor allem des Musculus tibialis anterior, eine daraus resultierende Gangunsicherheit bis zur Rollstuhlpflichtigkeit, Verlust der tiefen Sehnenreflexe sowie diverse Fußdeformitäten wie Hammerzehen und Pes Cavus (Szigeti and Lupski, 2009; Brennan et al., 2015) (**Abbildung 1**). Weiterhin zeigen bis zu 70% der Betroffenen sensorische Defizite, welche aber im Vergleich zur motorischen Komponente in der Regel eher schwach ausgeprägt sind und eine untergeordnete Rolle spielen. Typischerweise betroffen sind das Vibrationsempfinden, die Temperaturwahrnehmung sowie die Schmerzwahrnehmung (Szigeti and Lupski, 2009). Zusätzlich sind auch Plus-Symptome in Form von verstärkter Schmerz- und Hitzewahrnehmung beschrieben, welche vermutlich auf Veränderungen in epidermalen kleinkalibrigen Nervenfasern zurückzuführen sind (Nolano et al., 2015).

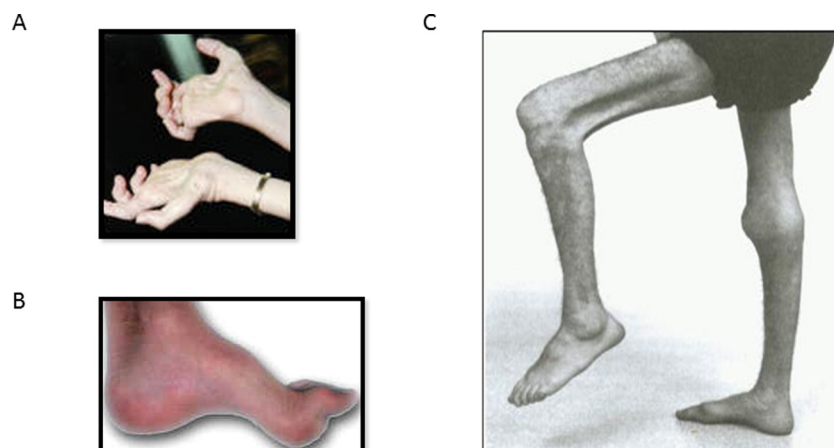


Abbildung 1 Typische klinische Ausprägung von CMT Neuropathien mit primärem Befall der unteren Extremitäten. (A) Hand mit Flexionsdeformitäten und Muskelatrophie. (B) Pes Cavus mit Hammerzehen. (C) Distale und proximale Muskelatrophie der unteren Extremität mit Spitzfuß durch Peroneuslähmung. (Bild adaptiert von (Brennan et al., 2015); mit freundlicher Genehmigung von Elsevier)

Die Manifestationsschwere der Symptome und der Beginn der Erkrankung sind sehr variabel. Erste Symptome können bereits in der Kindheit aber auch erst im späten Erwachsenenalter auftreten. Die Lebenserwartung ist durch die Erkrankung nicht verringert, jedoch resultiert aus oben genannter Klinik eine enorme Einschränkung der Lebensqualität. Da bis heute keine spezifische Therapie verfügbar ist, sind die Patienten auf eine symptomatische Behandlung mit Krankengymnastik, chirurgischen und orthopädischen Interventionen, Orthesen und Schmerztherapie angewiesen (Reilly and Shy, 2009; Schenone et al., 2011).

Ursächlich sind bereits über 1000 Mutationen in etwa 80 krankheitsassoziierten Genen bekannt, welche vor allem durch systematisches Screening betroffener Familien in den letzten 15 Jahren entdeckt wurden (Timmerman et al., 2014).

Die enorme Heterogenität der genetischen Ursachen und die überlappenden klinischen Symptome der einzelnen Formen führten zu Schwierigkeiten, die verschiedenen Formen der Neuropathie einer eindeutigen Systematik unterzuordnen. Eine erste Klassifikation erfolgte 1968 und basiert insbesondere auf elektrophysiologischen Untersuchungen und histologischen Kriterien. Hierbei werden zwei Typen unterschieden: Dem Subtypen CMT 1 werden diejenigen Fälle zugeordnet, welche durch verlangsamte Nervenleitgeschwindigkeiten unter 38 m/s und somit primär durch eine Schädigung der Myelinscheide auffallen. Histologisch können hier hypertrophe Veränderungen der Nerven beobachtet werden, welche das Korrelat von raumfordernden sogenannten Zwiebelschalen (Onion Bulbs) und Ödemen sind. Der Subtyp CMT 2 hingegen zeigt vor allem Verringerungen der Muskelsummenaktionspotenziale bei einer über 38 m/s erhaltenen Nervenleitgeschwindigkeit, was für einen primär axonalen Schaden spricht (Dyck and Lambert, 1968b, a; Harding and Thomas, 1980).

Der Begriff *hereditäre motorisch-sensible Neuropathie* wurde erstmals 1974 von P.K. Thomas für eine Gruppe von hereditären Neuropathien eingeführt (Thomas et al., 1974) und 1980 von E. Harding und P.K. Thomas zu HMSN I-III (Harding and Thomas, 1980) bzw. 1993 von P.J. Dyck zu HMSN I-VII erweitert (Pareyson et al., 2006). Hierfür wurden hauptsächlich klinische Kriterien zur Klassifizierung verwendet. HMSN I entspricht dem oben beschriebenen Subtyp CMT 1, HMSN II ist gleichzusetzen mit CMT 2. HMSN III entspricht dem von J. Dejerine und J. Sottas 1893 erstmals beschriebenen und nach ihnen benannten

Dejerine-Sottas Syndrom. Weiter unterteilt sind HMSN IV oder Refsum Krankheit, HMSN V, welche zusätzlich mit spastischer Paraplegie einhergeht, sowie HMSN VI und VII welche durch Optikusatrophy bzw. Retinitis pigmentosa charakterisiert sind (Pareyson et al., 2006). Mit der fortschreitenden Entdeckung der verantwortlichen Gene und Erbgänge wurde die Situation jedoch zunehmend komplizierter und erforderte laufende Überarbeitungen der Systematik (Mathis et al., 2015). Zusammenfassend werden die heute bekannten Mutationen in autosomal-dominant vererbte Formen, die einen primär demyelinisierenden Phänotyp (CMT 1) oder einen primär axonal schädigenden Phänotyp (CMT 2) zeigen, autosomal-rezessive Formen (CMT 4) und intermediäre Formen eingeteilt (Patzko and Shy, 2011).

Trotz der oben genannten Vielzahl an verantwortlichen Genen haben Studien gezeigt, dass ca. 90% der Erkrankungen auf Mutationen in den Genen für PMP22, MPZ, GJB1 und MFN2 zurückzuführen sind und somit den Subtypen CMT 1 (PMP22, MPZ, GJB1) und CMT 2 (MFN2) zugeordnet werden können (Murphy et al., 2012; Fridman et al., 2015). Dies unterstreicht, warum die Erforschung gerade dieser Subtypen aus klinischer Sicht die größte Relevanz beizumessen ist.

1.2 CMT 1 Subtypen und ihre Mausmodelle

1.2.1 Charcot-Marie-Tooth Neuropathie Typ 1A

CMT 1A ist mit einem Anteil von 75 bis 80% der häufigste CMT 1 Subtyp und zudem die häufigste Form aller CMT Neuropathien (Suter and Scherer, 2003; Zhou and Griffin, 2003). Die langsam fortschreitende Erkrankung beginnt in der Regel in den ersten beiden Lebensjahrzenten und zeigt die für CMT typischen, oben genannten, klinischen Symptome. Charakteristisch ist eine stark verlangsamte Nervenleitgeschwindigkeit von etwa 20 m/s, welche häufig bereits vor dem Auftreten erster Symptome nachgewiesen kann, sowie die in Nervenbiopsien auffällige Formation sogenannter Zwiebelschalenmuster (Onion Bulbs) als Zeichen verstärkter De- und Remyelinisierung (Guenard et al., 1996; Patzko and Shy, 2011).

Ursächlich ist CMT 1A auf eine Duplikation von 1,4 Mb auf Chromosom 17p11.2 zurückzuführen, welche im kodierenden Bereich des peripheren Myelinproteins 22 (PMP22) liegt (Lupski et al., 1991; Raeymaekers et al., 1991).

PMP22 ist ein 22-kDa schweres Protein und macht 2-5% des peripheren Myelinproteins aus. Es wird von Schwann-Zellen produziert und ist Teil der kompakten Regionen der Myelin-

scheide (Jerath and Shy, 2015). Zwar ist eine Beteiligung von PMP22 bei Apoptosevorgängen (Fabbretti et al., 1995) sowie bei der Schwann-Zell Proliferation (Giambonini-Brugnoli et al., 2005) bekannt, die konkrete Funktion des Proteins in der Myelinscheide ist jedoch nach wie vor unklar (Jerath and Shy, 2015). Wie wichtig das Protein für die korrekte Myelinbildung ist, zeigte eine Studie mit PMP22 Knockout Mäusen. Neben einem verspäteten Start der Myelinbildung, kam es im Verlauf zu einer schweren Demyelinisierung und dem Verlust von Axonen (Adlkofer et al., 1995). Andere bekannte klinische Manifestationen von *PMP22* Mutationen sind, neben CMT 1A, die hereditäre Neuropathie mit Neigung zur Drucklähmung (*PMP22* Deletion), CMT 1E (Punktmutation) und das Dejerine-Sottas-Syndrom (Punktmutation) (Jerath and Shy, 2015).

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Mausmodell ist ein erstmals 1998 von C. Huxley vorgestelltes transgenes Mausmodell, welches heterozygot vier Kopien *PMP22* enthält und somit eine leichte Überexpression des humanen PMP22 zeigt (Huxley et al., 1998). Obwohl klinisch ohne Phänotyp sind elektrophysiologisch und histologisch charakteristische Pathologien zu finden, die denen aus Patientenbiopsien sehr ähnlich sind. Bereits im Alter von 2 Monaten zeigen sich verringerte Nervenleitgeschwindigkeiten, reduzierte Muskelsummenaktionspotentiale sowie histologisch eine vermehrte De- und Remyelinisierung mit Zwiebelschalenbildung und hypermyelinisierten Axonen (Huxley et al., 1998; Kobsar et al., 2005).

1.2.2 Charcot-Marie-Tooth Neuropathie Typ 1B

CMT 1B ist mit weniger als 10% aller CMT 1 und unter 5% aller CMT Patienten der seltenste der in dieser Studie untersuchten Subtypen. Klinisch lassen sich hier zwei Phänotypen unterscheiden. Während die eine Gruppe durch ein frühes Einsetzen der Symptome und Nervenleitgeschwindigkeiten der oberen Extremität unter 15 m/s geprägt ist, zeigt das zweite Patientenkollektiv erst im Erwachsenenalter Symptome und hat Nervenleitgeschwindigkeiten über 30 m/s (Shy, 2004).

Die genetische Ursache der CMT 1B Neuropathie liegt in einer heterozygoten Punktmutation des auf Chromosom 1 liegenden *P0* (auch MPZ = Myelin Protein Zero genannt) Gens (Hayasaka et al., 1993), welches für das periphere Myelinprotein P0 kodiert. Das Myelin Protein Zero macht etwa 50% der Glykoproteine des peripheren Nervensystems aus und ist somit das am häufigsten vorkommende Myelinprotein. Es ist als Transmembranprotein eine Komponente des kompakten Myelinanteils und fungiert hauptsächlich als Adhäsionsprotein, das nebeneinanderliegende Myelinlamellen miteinander verbindet und somit eine wichtige

Funktion in der Myelinkompaktierung besitzt (Niemann et al., 2006). Weiterhin ist das richtige P0 Mengenverhältnis von Bedeutung. Sowohl eine Verringerung wie auch eine Überexpression kann zu Hypomyelinisierung führen (Martini et al., 1995; Wrabetz et al., 2000; Yin et al., 2000). Gegenwärtig sind über 200 Mutationen im *P0* Gen bekannt, die eine periphere Neuropathie verursachen können, sich zum Teil phänotypisch aber stark voneinander unterscheiden. Warum auf bestimmte Mutationen ein spezifischer Phänotyp folgt, ist bis heute noch nicht vollständig verstanden (Gabreels-Festen et al., 1996; Shy, 2006; Jerath and Shy, 2015). Neben CMT 1B können *P0* Mutationen auch Ursache des Dejerine-Sottas Syndroms, der kongenitalen Hypomyelinisierung sowie anderer polymorpher Subtypen sein (Shy, 2004). Das in dieser Studie für CMT 1B untersuchte Mausmodell ist heterozygot defizient für P0 (Martini et al., 1995) und unterscheidet sich deutlich von der 1992 erstmals zur Untersuchung des P0 Proteins verwendeten homozygoten null-Mutante (Giese et al., 1992). Während homozygote Tiere bereits im jungen Alter durch schwere Hypomyelinisierung, Dekompaktierung und Degeneration des Myelins auffallen und somit eher dem Dejerine-Sottas Syndrom oder schweren CMT 1B Formen ähneln, zeigen heterozygote Tiere einen wesentlich milderen Phänotyp. Junge heterozygote Tiere haben anfangs häufig einen normalen Myelinstatus, welcher sich erst mit zunehmendem Alter langsam progressiv verschlechtert. Typische histologische Veränderungen der peripheren Nerven sind De- und Remyelinisierung sowie Zwiebel-schalenbildung. Weiterhin zeigen sich mit zunehmendem Alter auch verringerte Nervenleitgeschwindigkeiten, verlangsamte F-Wellen-Latenzen und reduzierte Muskelsummenaktionspotentiale. P0 heterozygote Tiere sind somit ein Modell der milderen und häufigeren CMT 1B Formen (Martini et al., 1995; Martini, 1997; Shy et al., 1997).

1.2.3 Charcot-Marie-Tooth Neuropathie Typ 1X

CMT 1X ist mit etwa 10-15% aller CMT Formen nach CMT 1A die zweithäufigste CMT Neuropathie (Saporta et al., 2011). Genetische Ursache sind Funktionsverlustmutationen des für Connexin 32 (CX32) kodierenden *GJB1* (*Gap Junction Protein beta 1*) Gens auf Chromosom Xq13.1 (Bergoffen et al., 1993). Connexin 32 ist eines von 20 in Säugetieren hoch konservierten Connexinen (Willecke et al., 2002) und kommt außer in Schwann-Zellen auch in Oligodendrozyten, Hepatozyten und Neuronen vor (Scherer et al., 1995). Es ist, im Unterschied zu PMP22 und P0, Teil des nicht-kompakten Myelins und innerhalb der Myelinscheide im Bereich der Schmidt-Lanterman Inzisuren sowie der paranodalen Zone lokalisiert (Balice-Gordon et al., 1998). Die Funktion der Connexin Proteine ist die Bildung von Gap Junctions. Hierbei formen jeweils sechs Connexine in der Zellmembran verankerte Hemikanäle, Con-

nexone genannt, welche durch Zusammenlagerung mit anderen Connexonen oben genannte Gap Junctions bilden (Abrams et al., 2000). Diese porenbildenden Zellkontakte erleichtern die interzelluläre Ausbreitung von elektrischen Signalen, kleinen Molekülen und Ionen und verkürzen durch ihre Verbindung nebeneinanderliegender Myelinlamellen den Diffusionsweg von abaxonalen Lamellen bis zum Axon ca. um den Faktor 1000. Dieser Diffusionsweg innerhalb ein und derselben Zelle wird auch "reflexive junction" genannt (Suter and Scherer, 2003).

Trotz der mehr als 400 bekannten Mutationen im *GJB1* Gen, ist der klinische Phänotyp relativ homogen. Erste Symptome zeigen sich in der Regel ab der späten Kindheit und nehmen progressiv mit dem Alter zu. Hierbei steht im Unterschied zu CMT 1A und B eher die axonale Degeneration als typisches Merkmal im Vordergrund, während die Nervenleitgeschwindigkeit oft nur mäßig verringert ist (Hahn et al., 2000; Jerath and Shy, 2015).

Aufgrund des X-chromosomalen Erbgangs sind Männer in der Regel stärker betroffen, da Frauen aufgrund der Lyonisierung (X-Inaktivierung) immer noch in etwa die Hälfte der normalen Menge funktionsfähiges Cx32 synthetisieren können (Shy et al., 2007).

Als korrespondierendes Mausmodell für CMT 1X wurde in dieser Studie eine Connexin32 defiziente Mauslinie verwendet (Nelles et al., 1996). Diese Mäuse zeigen, wie auch die anderen oben beschriebenen CMT 1 Modelle, keinen auffälligen klinischen Phänotyp, jedoch können ab einem Alter von 4 Monaten histologisch und elektrophysiologisch charakteristische Veränderungen nachgewiesen werden. Neben de- und dünnmyelinisierten Axonen sowie Zwiebelschalenbildung fallen auch spezifische, insbesondere den axonalen Schaden repräsentierende, Merkmale auf. Dies sind Myelinabschnitte mit ungewöhnlich dicken periaxonalen Collars (vom Schwann-Zell-Körper am meisten distal gelegene Zytoplasmaanteile), axonale Vakuolen als Zeichen axonalen Schadens, eine vermehrte Anzahl von axonalen Regenerationsbündeln sowie reduzierte Muskelsummenaktionspotentiale (Anzini et al., 1997; Martini, 1997; Kobsar et al., 2003; Klein et al., 2014).

1.3 Die Rolle des Immunsystems in der Pathogenese von CMT 1

Um wirksame Therapien zu entwickeln, ist das Verständnis der Pathogenese unabdinglich. Zwar können dank der Hilfe moderner molekularer und genetischer Untersuchungsmethoden die Pathomechanismen der CMT 1 Neuropathien immer besser entschlüsselt werden. Aufgrund der enormen genetischen Heterogenität sind subtypübergreifende Ansätze jedoch schwierig zu finden (Jerath and Shy, 2015).

Interessanterweise konnte in den letzten Jahren das Immunsystem als wichtiger Mediator in der Pathogenese der CMT 1 Subtypen A, B und X identifiziert werden (Martini and Willison, 2016).

Erste Hinweise auf einen Einfluss des Immunsystems ergaben sich durch das Ansprechen einiger CMT Patienten auf Immunsuppressiva (Dyck, 1982) sowie durch eine auffällig erhöhte Anzahl von Lymphozyten im Blut dieser Patienten (Williams et al., 1987).

In Übereinstimmung mit diesen Beobachtungen zeigten histologische Untersuchungen peripherer Nerven von P0het Mausmutanten eine erhöhte Anzahl von Makrophagen und Lymphozyten (Shy et al., 1997; Schmid et al., 2000). Die Relevanz dieser Zellen wurde durch die Verkreuzung von P0 Mutanten mit immundefizienten RAG-1 ^{-/-} Tieren deutlich, welche nicht in der Lage sind, reife T- und B-Zellen auszubilden. Diese Doppelmutanten zeigten eine geringer ausgeprägte Demyelinisierung (Schmid et al., 2000). Gleiches konnte in Cx32def / RAG-1^{-/-} Doppelmutanten beobachtet werden (Kobsar et al., 2003).

Neben der adaptiven Immunantwort, erwies sich auch die angeborene, speziell die Makrophagen, als wichtiger Mediator in der Pathogenese (Klein and Martini, 2016). In allen drei in dieser Arbeit untersuchten CMT 1 Mausmutanten konnte eine erhöhte Anzahl von Makrophagen in peripheren Nerven im Vergleich zu Wildtyp Tieren nachgewiesen werden. Besonders auffällig waren hier elektronenmikroskopische Untersuchungen, die mit Myelindebris beladene Makrophagen (phagozytierende Makrophagen) in enger Assoziation zu demyelinisierten Axonen zeigten (Carenini et al., 2001; Kobsar et al., 2002; Kobsar et al., 2005; Ip et al., 2006). Als wichtige Mediatoren, die Migration, Aktivierung und Proliferation der Makrophagen beeinflussen, konnten MCP-1 (Monocyte-Chemoattractant-Protein-1; synonym: CCL2) und CSF-1 (Colony-Stimulating-Factor-1) identifiziert werden.

MCP-1 wird von Schwann-Zellen sezerniert und durch die MEK/ERK Signalkaskade reguliert, deren erhöhte Aktivität in allen drei Mausmodellen nachweisbar ist (Fischer et al., 2008a; Groh et al., 2010; Kohl et al., 2010). Dabei zeigten Untersuchungen mit fluoreszierenden Knochenmarkszellen (GFP-Zellen), dass MCP-1 besonders für die Migration von Monozyten aus der Blutbahn (Fischer et al., 2008b; Groh et al., 2010) sowie für die Lenkung von aktivierten Makrophagen in Richtung mutierter Schwann-Zellen verantwortlich ist (Groh et al., 2015). Bei der Untersuchung von CMT 1 / MCP-1 ^{+/-} Doppelmutanten, welche nur die halbe Menge MCP-1 bilden, sowie bei Inhibition des MEK/ERK Signalweges zeigten sich im Alter von sechs Monaten neben einer deutlichen Reduktion der Makrophagenanzahl, weniger Demyelinisierung, ein geringerer axonaler Schaden, verbesserte elektrophysiologische Parameter, eine verstärkte nervale Regeneration und verbesserte klinische Parameter (Greifkraft)

(Fischer et al., 2008b; Fischer et al., 2008a; Groh et al., 2010; Kohl et al., 2010). Jedoch ist zu beachten, dass dieser Effekt lediglich transient und im Alter von 12 Monaten nicht mehr nachweisbar war (Groh et al., 2010). Weiterhin konnte bei CMT 1 / MCP-1 $-/-$ Doppelmutanten, also bei einem vollständigen Fehlen von MCP-1, keine suffiziente Makrophagenreduktion und konsekutiv kein verbesserter Phänotyp beobachtet werden (Fischer et al., 2008b). Ursache hierfür ist möglicherweise eine kompensatorische Hochregulation von CSF-1.

CSF-1 und der zugehörige CSF-1-Rezeptor, eine Tyrosinkinase, spielen eine wichtige Rolle in der Homöostase von Gewebsmakrophagen, Osteoklasten und Paneth-Zellen. Weiterhin haben neue Studien den CSF-1-Rezeptor Signalweg als wichtigen Faktor in der neuronalen Entwicklung und Differenzierung sowie in der Homöostase der Mikroglia identifiziert (Chitu et al., 2016). Das in den peripheren Nerven der in dieser Studie untersuchten CMT 1 Mutanten hochregulierte CSF-1 wird im Unterschied zu MCP-1 von Fibroblasten produziert, die auffälligerweise häufig in engem Kontakt zu phagozytierenden Makrophagen stehen. Diese Nähe der beiden Zelltypen zueinander konnte auch in humanen Nervenbiopsien nachgewiesen werden (Groh et al., 2012).

Funktionell hat CSF-1 wenig Einfluss auf die Rekrutierung von Makrophagen aus der Blutbahn, sondern wirkt aktivierend, differenzierend und proliferationsfördernd auf die residente endoneurale Makrophagenpopulation (Muller et al., 2007).

Die Rolle von CSF-1 in der Pathogenese von CMT 1 Neuropathien wurde vor allem durch Studien mit osteopetrotischen (op/op) Mäusen deutlich, welche durch eine Punktmutation im *CSF-1* Gen nicht in der Lage sind, das entsprechende Protein zu produzieren (Yoshida et al., 1990). Die aus der Verkreuzung von P0het bzw. Cx32def mit op/op Mäusen hervorgehenden Doppelmutanten zeigten deutlich weniger Makrophagen in peripheren Nerven, eine geringere Demyelinisierung und einen geringeren axonalen Schaden (Carenini et al., 2001; Groh et al., 2012). Ähnliche Beobachtungen konnten auch bei den schwer zu züchtenden osteopetrotischen PMP22tg Doppelmutanten gemacht werden (Groh, Klein und Martini, unpublizierte Daten).

Von den verschiedenen existierenden CSF-1 Isoformen erwies sich hier das sezernierte Proteoglykan als pathomechanistisch relevant, während das Zelloberflächenprotein eher zur Inhibition der Makrophagenaktivierung beiträgt (Groh et al., 2016).

Wie genau die erhöhte Makrophagenanzahl zu den typischen zu beobachtenden Pathologien führt, ist noch nicht vollständig entschlüsselt. Einerseits legt der oben beschriebene, enge Kontakt von phagozytierenden Makrophagen mit demyelinisierten Axonen einen direkten „Angriff“ auf die Myelinscheiden nahe. Hierbei erfolgt die Markierung der Myelinscheide als

Angriffsziel zumindest bei P0het Mutanten mittels endogener Antikörper, wie Verkreuzungsstudien mit B-Zell defizienten JHD $-/-$ Tieren gezeigt haben (Klein et al., 2015a). Andererseits konnte ein wichtiger Einfluss der Makrophagen auf die Schwann-Zell Differenzierung nachgewiesen werden, da osteopetrotische Cx32def Tiere nicht nur verbesserte histologische Parameter und eine verringerte Makrophagenanzahl, sondern zusätzlich auch einen erhaltenen differenzierten Phänotyp zeigten (Groh et al., 2015). Wie wichtig die Schwann-Zell Differenzierung für den Erhalt der Myelinscheide und der axonalen Integrität ist, zeigte auch eine Behandlungsstudie mit Neuregulin in einem CMT 1A Rattenmodell. Die durch genetisch hochreguliertes oder injiziertes Neuregulin verhinderte Dedifferenzierung der Schwann-Zellen führte zu verringerter Demyelinisierung und reduziertem axonalem Schaden (Fledrich et al., 2014).

Zusammenfassend führen die in den CTM 1 Subtypen A, B und X beschriebenen Schwann-Zell Mutationen über bisher unbekannte Mechanismen zu einer Aktivierung des MEK/ERK Signalwegs. Dies führt zur Freisetzung von MCP-1 mit anschließendem Einstrom von Makrophagen aus der Blutbahn und der Rekrutierung dieser an mutierten Schwann-Zellen. Gleichzeitig kommt es durch einen bisher nicht bekannten Aktivator („Activator 1“) zu der Stimulation von Fibroblasten mit darauffolgender CSF-1 („Activator 2“) Freisetzung, welches proliferationsfördernd und aktivierend auf die endoneuralen Makrophagen wirkt. Diese phagozytieren nun einerseits Myelin mithilfe endogener Antikörper und induzieren andererseits eine Dedifferenzierung der Schwann-Zellen mit konsekutivem axonalem Schaden und Myelinverlust (**Abbildung 2**) (Martini and Willison, 2016).

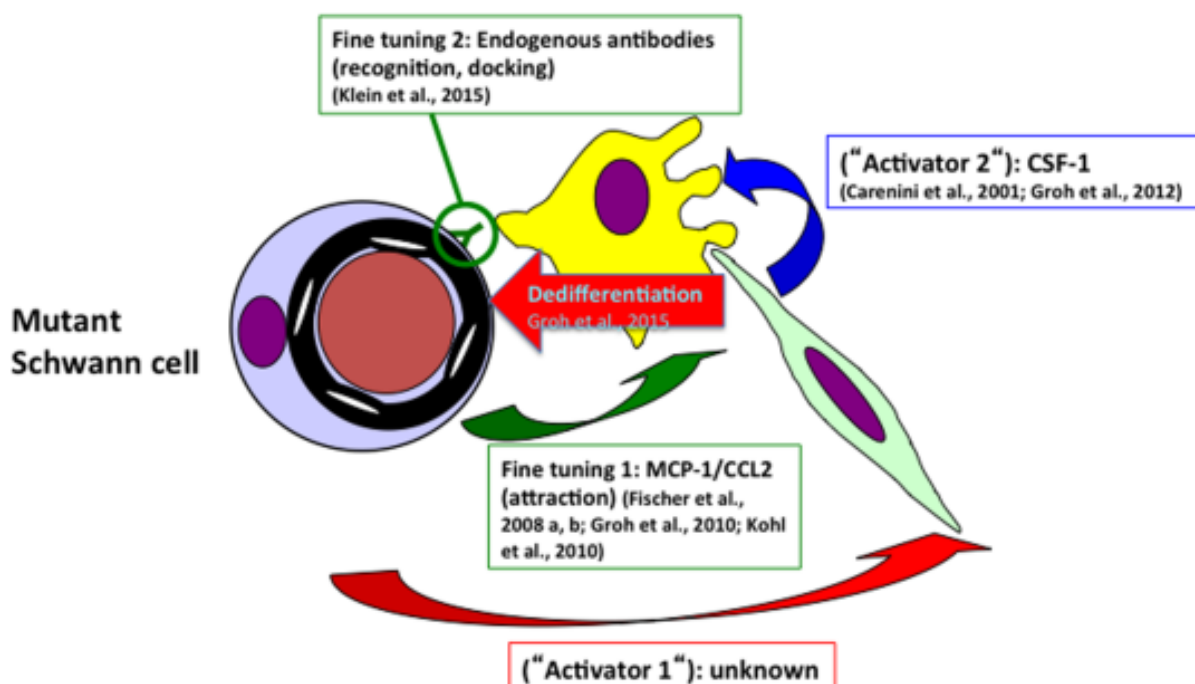


Abbildung 2 Pathogenesemodell der CMT 1 Neuropathien. Durch Schwann-Zell Mutationen (P0het, PMP22tg, Cx32def) kommt es zur MEK/ERK Aktivierung und konsekutiver MCP-1 Freisetzung, welche zum Influx von Makrophagen führt. Weiterhin wird durch einen bisher unbekanntem Mechanismus (Activator 1) eine CSF-1 Sekretion der Fibroblasten induziert. CSF-1 ist Hauptmediator des dargestellten Pathogenesemodells und führt zu einer gesteigerten Proliferation und Aktivierung der endoneuralen Makrophagen. Diese verursachen durch Myelinphagozytose, zum Teil mit Hilfe von endogenen Antikörpern, sowie durch eine induzierte Dedifferenzierung der Schwann-Zellen die typischen Pathologien (Bild adaptiert von (Martini and Willison, 2016); mit freundlicher Genehmigung von John Wiley & Sons)

1.4 Der CSF-1 Signalweg als Angriffspunkt für eine medikamentöse Intervention

Die oben beschriebene sekundäre Entzündungsreaktion als gemeinsamer Mediator in der Pathogenese der häufigen CMT 1 Subtypen A, B und X prädisponiert diese als subtypübergreifenden Angriffspunkt.

Während eine Intervention im MEK/ERK Signalweg bei Halbierung der MCP-1 Proteinmenge nur zu einem transienten Effekt führte, bzw. eine MCP-1 Defizienz aufgrund einer reaktiven CSF-1 Hochregulation gar keinen Effekt zeigte (Groh et al., 2010; Kohl et al., 2010), überzeugte der langfristige Erhalt der axonalen Integrität und der Myelinscheiden bei Verkreuzung mit CSF-1 defizienten Tieren (Carenini et al., 2001; Groh et al., 2012).

Weitere Studien mit osteopetrotischen Cx32def Doppelmutanten zeigten außerdem, dass eine verstärkte Aktivität des MEK/ERK Signalweges in Abwesenheit von CSF-1 weder zur Schwann-Zell Dedifferenzierung noch zu den typischen histologischen Veränderungen führte (Groh et al., 2015) und identifizierten CSF-1 somit als wichtigsten Mediator im oben beschriebenen Modell.

Eine Intervention im CSF-1 Signalweg scheint somit eine vielversprechende Therapieoption für die Subtypen A, B und X der CMT 1 Neuropathien.

1.5 Ziel der Arbeit

Die zentrale Rolle von CSF-1 in der sekundären Entzündungsreaktion der CMT 1 Neuropathien Typ A, B und X sowie die positiven Effekte bei einer genetischen Defizienz dieses Proteins machen den CSF-1/CSF-1-Rezeptor Signalweg zu einem vielversprechenden Angriffspunkt einer möglichen therapeutischen Intervention.

In der vorliegenden Arbeit soll nun die Wirkung eines oral applizierten niedermolekularen CSF-1-Rezeptor Inhibitors (PLX5622) auf die Krankheitsausprägung untersucht werden.

Hierfür wurden Mausmodelle der Subtypen CMT 1 A, B, X sowie Wildtypen nach zwei unterschiedlichen Protokollen behandelt. Dabei erhielt eine Gruppe den Inhibitor bereits ab dem Alter von drei Monaten bis zum Alter von zwölf Monaten (präventiver Ansatz), die andere hingegen erst ab dem Alter von neun Monaten bis zum Alter von fünfzehn Monaten (therapeutischer Ansatz).

In der anschließenden funktionellen und strukturellen Auswertung lag der Fokus auf folgenden Fragen:

- Führt die Therapie zu einer effizienten Makrophagenreduktion?
- Zeigt sich ein Effekt in strukturellen Parametern wie der Demyelinisierung, dem axonalen Schaden oder der Regenerationsfähigkeit des genetisch induzierten Schadens?
- Kann die Therapie das funktionelle Ergebnis der Erkrankung verbessern?

2. Material und Methoden

2.1 Technisches Equipment, Reagenzien, Puffer und Lösungen, Primer Sequenzen und Antikörper

Details zu den verwendeten Materialien sind im Anhang unter Technisches Equipment (6.1.1), Reagenzien (6.1.2), Puffer und Lösungen (6.1.3), Primer Sequenzen (6.1.4) und Antikörper (6.1.5) aufgeführt.

2.2 Mausmodelle und Genotypisierung

In diese Studie wurden Mäuse mit folgenden Genotypen eingeschlossen: Cx32def Mutanten (Nelles et al., 1996) mit einem Funktionsverlust des Connexin 32 Gap Junction Proteins, P0het Mutanten (Giese et al., 1992), welche charakteristischerweise geringere Mengen des Myelinproteins P0 exprimieren, sowie peripheres Myelinprotein 22 überexprimierende PMP22tg Mutanten (Huxley et al., 1998). Zusätzlich wurden wildtyp Kontrollen untersucht, welche, ebenso wie alle oben genannten Mutanten, einen C57BL/6 Hintergrund besaßen.

Die Genotypisierung erfolgte mittels konventioneller PCR Technik. Die benötigte DNA wurde mit Hilfe von DNeasy blood & tissue kit (Quiagen) aus Ohrbiopsien isoliert. Der PCR-Ansatz betrug 25µl, bestehend aus 24µl Pre-Mix und 1µl aufgereinigter DNA. Nach 2-minütiger Denaturierung bei 93°C und 40 Zyklen bestehend aus 30 Sekunden bei 93°C, 45 Sekunden bei 66°C zur Primerhybridisierung und 90 Sekunden bei 72°C zur Elongation sowie abschließend 10 Minuten bei 72°C folgte eine Auftrennung der Amplifizierten DNA mittels Gelelektrophorese. Zur Auswertung wurden die PCR-Produkte mittels Gel Star (Lonza) angefärbt.

Die Tiere wurden in der Neurologischen Klinik und Poliklinik der Universität Würzburg unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen in individuell belüfteten Käfigen gehalten. Der Tag-/Nachtrhythmus betrug 12/12 Stunden.

Alle Experimente wurden von der zuständigen Behörde, der Regierung von Unterfranken, genehmigt.

2.3 CSF-1-Rezeptor-Inhibitor Behandlung

Die Behandlung erfolgte oral durch einen niedermolekularen CSF-1-Rezeptor Inhibitor (PLX5622, im Folgenden auch als CSF1RI abgekürzt), welcher in einer Konzentration von 300 mg/kg dem Futter beigemischt war. Zu diesem hatten die Tiere 24 Stunden pro Tag freien Zugang. Die gewählte Konzentration entsprach hierbei der niedrigsten Inhibitorkonzentration, die in einer 14 tägigen Fütterung zu einer 70 prozentigen Reduktion der F4/80 positiver Makrophagen in Quadricepsnerven-Querschnitten führte (Van Hauwermeiren und Klein, unpublizierte Daten).

Das Inhibitorfutter wurde von der Firma Plexxikon Inc. (Berkeley, Kalifornien) bereitgestellt.

Um den möglichen Effekt der CSF1RI Behandlung in unterschiedlichen Krankheitsstadien zu erfassen, wurden Behandlungsstrategien mit verschiedenen Start- und Endpunkten gewählt.

Im Sinne eines präventiven Behandlungsansatzes, d. h. vor vollständiger Ausprägung der klinischen und histologischen Charakteristika, wurde ein Behandlungsmodell mit frühem Therapiestart im Alter von drei Monaten und einer Analyse im Alter von sechs bzw. zwölf Monaten verwendet (im Folgenden als präventiver Therapieansatz bezeichnet).

Um einen möglichen therapeutischen Effekt bei bereits fortgeschrittener Pathogenese zu erkennen, wurde ein Behandlungsmodell mit spätem Therapiestart im Alter von neun Monaten und einer Analyse im Alter von fünfzehn Monaten gewählt (im Folgenden als therapeutischer Therapieansatz bezeichnet).

Innerhalb jedes Behandlungsregimes wurden Mäuse aller drei oben beschriebener CMT 1 Modelle (Cx32def, P0het, PMP22tg) sowie Wildtypen mit Inhibitor-Futter gefüttert. Als Kontrollen wurden Mäuse mit jeweils gleichem Genotyp gewählt, welche kein Inhibitor-Futter erhielten.

2.4 Greiftest

Um den für CMT 1 Neuropathien charakteristischen Kraftverlust zu erfassen, wurde die maximale Greifkraft der Hinterbeine der Mäuse gemessen. Verwendet wurde ein Grip Strength Meter (Columbus Instruments, Columbus, OH, USA), auf dessen Haltestange die Mäuse mit den Hinterbeinen gesetzt wurden, um anschließend unter gleichmäßigem Kraftaufwand heruntergezogen zu werden. Zur Erhebung der Daten wurden für jedes Tier jeweils zehn Messungen hintereinander an drei verschiedenen Tagen zur jeweils gleichen Uhrzeit durchgeführt.

Hierbei wurde pro Messung die maximale von der Maus aufgebrachte Greifkraft notiert. Zur Analyse wurden die Mittelwerte der Genotypgruppen miteinander verglichen.

Um intergeschlechtliche Kraftunterschiede auszuschließen, sind in direkt miteinander verglichenen Gruppen alle Tiere gleichen Geschlechts.

Zusätzlich wurden alle Tiere vor der ersten Messung gewogen, um bei der folgenden Auswertung gewichtsbedingte Kraftunterschiede ausschließen zu können.

2.5 Neurophysiologische Messungen

Zur Durchführung neurophysiologischer Messungen wurden behandelte Tiere sowie Kontrolltiere mit 8µl pro Gramm Körpergewicht Ketavet und Xylavet haltigem Anästhetikum per intraperitonealer Injektion anästhesiert. Anschließend wurden die Mäuse zur Aufrechterhaltung der Körpertemperatur auf eine Wärmeplatte gelegt. Während der Messungen erfolgte eine regelmäßige Kontrolle der Körpertemperatur, welche konstant zwischen 34 und 36°C lag.

Die detaillierte Durchführung erfolgte wie bereits früher beschrieben (Zielasek et al., 1996).

Die Elektroden zur distalen Stimulation wurden in der Nähe der Incisura ischiadica major (sciatic notch) sowie zur proximalen Stimulation am Knöchel platziert (Nervus tibialis). Die ableitende Elektrode befand sich in den Fußmuskeln nahe der Ferse. Zusätzlich wurde eine subkutane Referenzelektrode platziert. Die Stimulation erfolgte supramaximal und es wurden folgende Parameter erhoben: Als Maß für den axonalen Schaden dienten die Muskelsummenaktionspotenziale (CMAP = compound muscle action potential) sowohl bei distaler als auch bei proximaler Stimulation. Für Schäden der Myelinscheiden dienten Nervenleitgeschwindigkeiten und F-Wellen-Latenzen als Marker. Alle Messungen erfolgten auf der linken Seite.

Für die Versuche wurde ein Digital Neurosoft-Evidence 3102 Elektromyograph verwendet (Schreiber&Tholen Medizintechnik).

Die Neurophysiologischen Messungen wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Dennis Klein durchgeführt, welcher für Genotyp und Behandlungsstatus geblindet war.

2.6 Präparation, Entnahme und Fixierung des Gewebes

Zur Aufarbeitung des Gewebes für immunhistochemische Analysen wurden die Mäuse tiereschutzgerecht durch Kohlenstoffdioxidnarkose euthanasiert und fünf Minuten transkardial mit

Heparin/PBS gespült. Anschließend erfolgte die Präparation und Entnahme des Nervus femoralis, inklusive dessen peripherer Fortsätze Nervus quadriceps und saphenus, sowie des Musculus flexor digitorum brevis. Diese wurden in OCT-Medium eingebettet und in, durch flüssigen Stickstoff gekühltem, Methylbutan tiefgefroren. Nerven und Muskeln wurden schließlich zur weiteren Verarbeitung mit einem Cryostat (Leica) in 10µm dicke Querschnitte geschnitten und bei -20°C gelagert. Um immer die gleichen Bereiche des Nervs zu untersuchen, wurden die Querschnitte jeweils ab dem Übergang von Nervus femoralis in Nervus quadriceps und Nervus saphenus auf Objektträger aufgenommen.

Zur Vorbereitung des Gewebes für Semidünnschnitte und Elektronenmikroskopie wurden die Mäuse mit Kohlenstoffdioxid euthanasiert und anschließend mit 4%Paraformaldehyd (PFA) / 2%Glutaraldehyd in 0,1M Cacodylatpuffer transkardial perfundiert. Spinalwurzeln (L4-L5) sowie periphere Nerven (N. femoralis mit quadriceps und saphenus) wurden präpariert, entnommen und in selbiger Lösung bei 4°C über Nacht postfixiert.

2.7 Immunhistochemie

Alle Immunfluoreszenzbilder wurden mit einem Axiophot 2 Mikroskop (Zeiss) bei 40-facher Vergrößerung aufgenommen.

2.7.1 Immunhistochemische Färbung gegen F4/80 und CD34

Zur immunhistochemischen Färbung von Makrophagen und Fibroblasten wurde eine F4/80 / CD34 Doppelfärbung auf Querschnitten des Nervus femoralis angefertigt. Nach Acetonfixierung bei -20°C (10min) und dem Waschen mit PBS wurden die Proben mit 5% BSA/PBS geblockt (30min) und anschließend mit dem ersten Primärantikörper (Ratte Anti-Maus CD34, 1:1000) bei 4°C über Nacht inkubiert.

Am nächsten Tag wurde mit PBS gewaschen und mit einem Ziege Anti-Ratte Alexa Fluor 488 Sekundärantikörper (1:300, 1 Stunde) inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS folgte ein Avidin-Biotin-Block (SP-2001, Vector laboratories) sowie der zweite Primärantikörper (biotinylierter F4/80 Ratte Anti-Maus Antikörper, 1:300, MCA497B Serotec, 1 Stunde), welcher, nach Waschen mit PBS, durch Cy3-konjugiertes Streptavidin (1:100, CED-CLCSA1010, Biozol, 1 Stunde) angefärbt wurde. Anschließend erfolgte eine Kernfärbung mit

4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI, 1:500.000, Sigma-Aldrich). Zum Eindeckeln wurde Aqua-Poly/Mount verwendet.

Die Auswertung erfolgte mit dem GNU Image Manipulation Programm (GIMP, Version 2.8). Auf jeweils 7 bis 10 Querschnitten pro Tier wurden die Makrophagen und Fibroblasten quantifiziert und anschließend ein Mittelwert gebildet.

In dieser Arbeit werden ausschließlich Bilder der F4/80 Färbung gezeigt. Da jedoch eine Doppelfärbung durchgeführt wurde, ist diese oben zur Vollständigkeit beschrieben.

2.7.2 Immunhistochemische Färbung neuromuskulärer Synapsen

Um den Erhalt der neuromuskulären Innervation zu untersuchen, wurden Präsynapsen mit Hilfe gegen Synaptophysin gerichteter Antikörper sowie Postsynapsen mit Hilfe von α -Bungarotoxin auf Querschnitten des Flexor digitorum brevis Muskels gefärbt.

Die Proben wurden mit PBS gewaschen und anschließend mit 5%BSA/PBS geblockt (30 Min.). Es folgte die Inkubation mit Meerschweinchen Anti-Maus Synaptophysin Antikörpern (1:500, 101004, Synaptic Systems, 4°C) über Nacht.

Nach erneutem Waschen wurden die Proben mit Cy3-konjugierten Esel Anti-Meerschweinchen Antikörpern (1:300, 706-165-148, Dianova, 1 Stunde) und Alexa Fluor 488 konjugiertem α -Bungarotoxin (1:300, B-13422, Molecular Probes, 1 Stunde) inkubiert und mit Aqua-Poly/Mount eingedeckelt.

Zur Auswertung wurden mindestens 100 neuromuskuläre Synapsen pro Tier mit Hilfe eines Axiophot 2 Mikroskop (Zeiss) auf Innervation, Denervation und partielle Denervation untersucht.

2.8 Semidünnschnitte und Elektronenmikroskopie

Nachdem das Gewebe wie oben beschrieben entnommen und über Nacht postfixiert wurde, folgte eine Osmifizierung mit 2% OsO₄ in oben beschriebenem Puffer, eine Dehydrierung in Aceton und die Einbettung in Spurr's Medium. Für Semidünnschnitte wurden nun 0,5 μ m dicke Querschnitte angefertigt und mit Methylenblau gefärbt. Nach 10 Minuten in Xylol wurden die Objektträger mit Vitro-Clud eingedeckelt. Die Aufnahme der Bilder erfolgte an einem Axiophot 2 Mikroskop (Zeiss) bei 100-facher Vergrößerung.

Zur Vorbereitung für die Elektronenmikroskopie wurden nach Einbettung in Spurr's Medium 80nm dicke Ultradünnschnitte angefertigt, auf einen Kupferrahmen gespannt und mit Bleizitrat kontrastiert. Anschließend wurden mit einer an ein Leo 906E Elektronenmikroskop (Zeiss) angeschlossenen ProScan Slow Scan CCD Kamera Bilder der Nerven- bzw. Spinalwurzelquerschnitte aufgenommen (iTEM software; Olympus Soft Imaging Solutions GmbH). Die Auswertung erfolgte mittels ImageJ. Es wurden jeweils abnormal myelinisierte Axone (= dünn- oder demyelinisierte Axone), axonale Regenerationsbündel, Axone pro Cluster, periaxonale Vakuolen und phagozytierende Makrophagen im Verhältnis zur Gesamtaxonzahl quantifiziert.

2.9 Statistische Methoden

Der Untersucher war bei allen Quantifizierungen und morphometrischen Analysen gegenüber Genotyp und Behandlungsstatus geblindet. Zur Abschätzung der benötigten Stichprobengrößen wurde das Programm G*Power (3.1.3) verwendet. Die Daten wurden mittels Shapiro-Wilk Test auf Normalverteilung überprüft sowie unter Benutzung des Leven-Tests auf Varianzgleichheit untersucht. Zum Vergleich zweier Gruppen mit normalverteilten Daten wurde, bei ähnlicher Varianz, ein Student *t*-Test und anderenfalls ein Welch *t*-Test verwendet. Bei nicht normal verteilten Daten wurde auf den Mann-Whitney U-Test zurückgegriffen. Sollten mehr als zwei Gruppen mit normalverteilten Daten miteinander verglichen werden, erfolgte die Berechnung der Signifikanzen mit Hilfe einer einfaktoriellen Varianzanalyse (One-Way ANOVA) gefolgt von einer Bonferroni-Holm-Korrektur. Im Falle mehrerer Gruppen mit nicht normal verteilten Daten wurde die Analyse mit einem parameterfreien Kruskal-Wallis-Test mit anschließender Bonferroni-Holm-Korrektur durchgeführt. Zur Signifikanzanalyse der abnormal myelinisierten Fasern P0het Tiere (**Abbildung 15D**) wurden die Tiere in zwei Gruppen (>18% abnormal myelinisierte Fasern und <18% abnormale myelinisierte Fasern) eingeteilt und mit dem exakten Test nach Fisher überprüft.

Alle statistischen Analysen wurden mit der Software PASW Statistics 18 (SPSS, IBM) durchgeführt. Die Diagramme wurden mit Microsoft Excel 2011 erstellt.

Die Daten sind, falls nicht anders beschrieben, als Mittelwerte + Standardabweichung angegeben. Signifikante Unterschiede sind mit * oder # gekennzeichnet. Hierbei unterscheidet sich das Signifikanzniveau folgendermaßen : */# entspricht $p < 0,05$; **/## entspricht $p <$

0,01; ***/### entspricht $p < 0,001$. Hervorzuhebende nicht signifikante Unterschiede sind mit der Abkürzung n.s. gekennzeichnet.

3. Ergebnisse

3.1 CSF-1-Rezeptor-Inhibitor Behandlung Cx32 defizienter Mäuse (CMT 1X)

Als CMT 1 Subtyp mit der zweithäufigsten Prävalenz hat CMT 1X eine hohe klinische Relevanz. Zusätzlich konnten in früheren Studien mit Cx32def/CSF-1op Tieren vielversprechende Ergebnisse bei ultrastrukturellen Parametern, wie dem Erhalt der Myelinscheiden, beobachtet werden (Groh et al., 2012). Somit schien die Intervention mit einem CSF1R Inhibitor in diesem Mausmodell besonders vielversprechend.

3.1.1 CSF1RI Behandlung führt zur Reduktion der Makrophagenanzahl im Nervus Quadriceps

Um die Effektivität des CSF1R Inhibitors auf die CSF1 abhängige Proliferation und Differenzierung der Makrophagen zu überprüfen, wurden mit Hilfe des Makrophagenmarkers F4/80 Querschnitte des Nervus Quadriceps gefärbt und ausgewertet.

Wie bereits in früheren Studien beschrieben (Groh et al., 2010; Groh et al., 2012), fiel bei der Betrachtung der Querschnitte der 12 Monate alten, unbehandelten Tiere eine eindeutig erhöhte Anzahl von Makrophagen in den Nerven der Cx32def Mutanten gegenüber den Nerven der Wildtypen auf. Die gemäß präventiver Behandlungsstrategie behandelten Tiere hingegen zeigten nach 9 Monaten Inhibitorfutter eine stark reduzierte Makrophagenpopulation in beiden Genotypen (**Abbildung 3A**). In der Quantifizierung zeigte sich eine hoch signifikante Reduktion der Makrophagenanzahl um ca. 70 % unter CSF1R Inhibitor Behandlung (**Abbildung 3B**). Dieser Effekt ließ sich weiterhin bereits nach 3 Monaten Behandlung bei 6 Monate alten Tieren nachweisen (**Abbildung 3C**). Auch in der nach therapeutischem Ansatz behandelten Gruppe, mit Therapiestart im Alter von 9 Monaten, konnte nach 6 Monaten Behandlung eine effiziente Verringerung der Makrophagenpopulation beobachtet werden (**Abbildung 3D**).

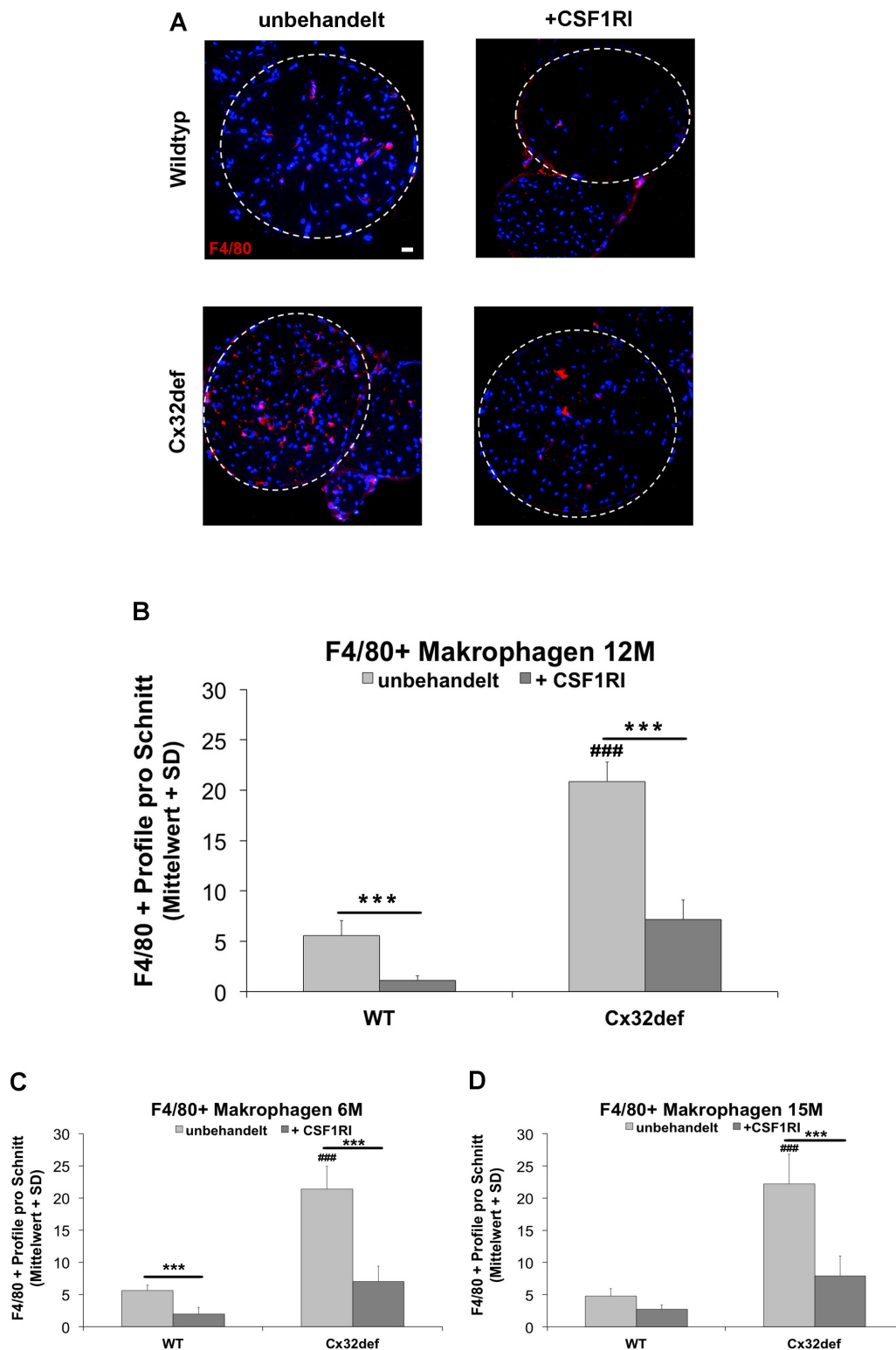


Abbildung 3 Reduktion der Makrophagenanzahl im Nervus Quadriceps von Wildtypen und Cx32def Mutanten nach präventiver (6 und 12 Monate alt) und therapeutischer (15 Monate alt) CSF1RI Behandlung. (A) Repräsentative F4/80 (rot) gefärbte Querschnitte des N. Quadriceps von 12

Monate alten Wildtypen (oben) und Cx32def Mutanten (unten), jeweils ohne (links) und nach (rechts) CSF1R Inhibitor Behandlung. Die gestrichelte Linie markiert den Umriss des Nervs. Zellkerne sind mit DAPI (blau) gefärbt. Maßstab (weiß) = 20 µm. (Modifiziert entnommen aus (Klein et al., 2015b))

(B,C,D) Quantifizierung von F4/80 positiven Makrophagen in Querschnitten des N. Quadriceps von 6 (C), 12 (B) und 15 (D) Monate alten Wildtypen und Cx32def Mutanten ohne und nach CSF1R Inhibitor Behandlung. Die Anzahl der Makrophagen ist in unbehandelten Cx32def Tieren gegenüber gleichaltrigen Wildtypen deutlich erhöht. Unter CSF1R Inhibitor Behandlung kommt es bei beiden Genotypen und allen Altersstufen zu einer signifikanten Reduktion der Makrophagen um ca. 70%. [n = 4-7; # = signifikanter Unterschied zu unbehandelten Wildtypen; * = signifikanter Unterschied zwischen behandelten und unbehandelten Tieren gleichen Genotyps]

3.1.2 Verbesserung ultrastruktureller Veränderungen in behandelten Cx32 defizienten Mutanten

Nachdem eine effektive Reduktion der Makrophagenanzahl unter CSF1R Inhibitor Behandlung nachgewiesen werden konnte, stellte sich die Frage, inwiefern sich die Suppression der Makrophagenpopulation auf die typischen bei CMT-1 Neuropathien auftretenden ultrastrukturellen Veränderungen auswirkte. Hierzu erfolgte eine elektronenmikroskopische Analyse der Quadricepsnerven sowie lumbaler Vorderwurzeln. Im Fokus stand die Ausprägung des Myelinschadens, also die Menge dünn- oder demyelinisierter Axone, sowie periaxonale Vakuolen (Kobsar et al., 2003) und axonale Regenerationsbündel (Kobsar et al., 2002) als typische Merkmale Cx32 defizienter Mutanten.

Zunächst erfolgte die Auswertung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen der Quadricepsnerven 6 Monate alter Cx32def Mutanten nach 3 Monaten CSF1RI Therapie. Hier zeigte sich zum einen ein Trend zu einer reduzierten Anzahl von periaxonalen Vakuolen (**Abbildung 4A**), zum anderen fand sich in den Querschnitten eine signifikant erhöhte Anzahl von axonalen Regenerationsbündeln (**Abbildung 4B**).

Die Anzahl abnormal myelinisierter Fasern hingegen war bei 6 Monate alten mit CSF1RI behandelten Tieren interessanterweise unverändert groß (Daten nicht gezeigt).

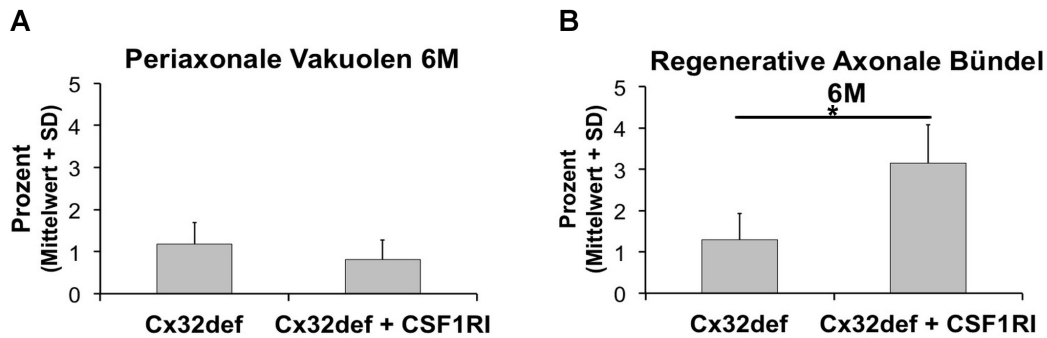


Abbildung 4 Leicht verringerter axonaler Schaden und verstärkte Regeneration im Nervus Quadriceps 6 Monate alter Cx32def Mutanten nach präventiver CSF1RI Behandlung. (A) Quantifizierung periaxonaler Vakuolen in Querschnitten der Quadricepsnerven von 6 Monate alten Cx32def Mutanten, ohne und nach dreimonatiger CSF1RI Inhibitor Behandlung. Keine signifikante Reduktion der Vakuolenanzahl ($p = 0,123$). (B) Quantifizierung axonaler Regenerationsbündel in Querschnitten der Quadricepsnerven von 6 Monate alten Cx32def Mutanten, ohne und nach dreimonatiger CSF1RI Inhibitor Behandlung. Es zeigt sich eine signifikant größere Anzahl Regenerationsbündel ($p = 0,012$). [Cx32def n = 7; Cx32def + CSF1RI n = 4]

Die oben beschriebenen, bereits nach 3 Monaten präventiver Behandlung beobachteten Effekte verstärkten sich deutlich nach 9 Monaten Behandlung in 12 Monate alten Tieren und sind in den repräsentativen elektronenmikroskopischen Aufnahmen des N. Quadriceps in **Abbildung 5A** dargestellt. Während die Wildtypen (behandelt und unbehandelt) weder Vakuolen noch Regenerationsbündel, sowie gleichmäßig myelinisierte Myelinscheiden zeigten, fielen in unbehandelten Mutanten vermehrt Vakuolen (V) als Zeichen axonalen Schadens sowie dünn- und demyelinisierte Axone auf. Behandelte Cx32def Mäuse hingegen zeigten signifikant weniger periaxonale Vakuolen (**Abbildung 5A, C**) und zudem eine signifikant größere Anzahl regenerativer axonaler Bündel (R) (**Abbildung 5A, D**).

Bei genauer Betrachtung der Regenerationsbündel konnte eine weitere interessante Gegebenheit beobachtet werden. Behandelte Tiere unterschieden sich nicht nur in der Anzahl der Bündel, sondern schienen auch in der Anzahl der Axone pro Bündel zu differieren. Tatsächlich zeigten behandelte Tiere signifikant mehr axonale Aussprossungen pro axonalem Bündel (**Abbildung 5E und 6**).

Zusammenfassend sprechen diese Beobachtungen für einen verbesserten Ablauf regenerativer Prozesse. In Übereinstimmung mit den 6 Monate alten Mäusen blieb jedoch auch hier die Anzahl abnormal myelinisierter Fasern unverändert (**Abbildung 5B**).

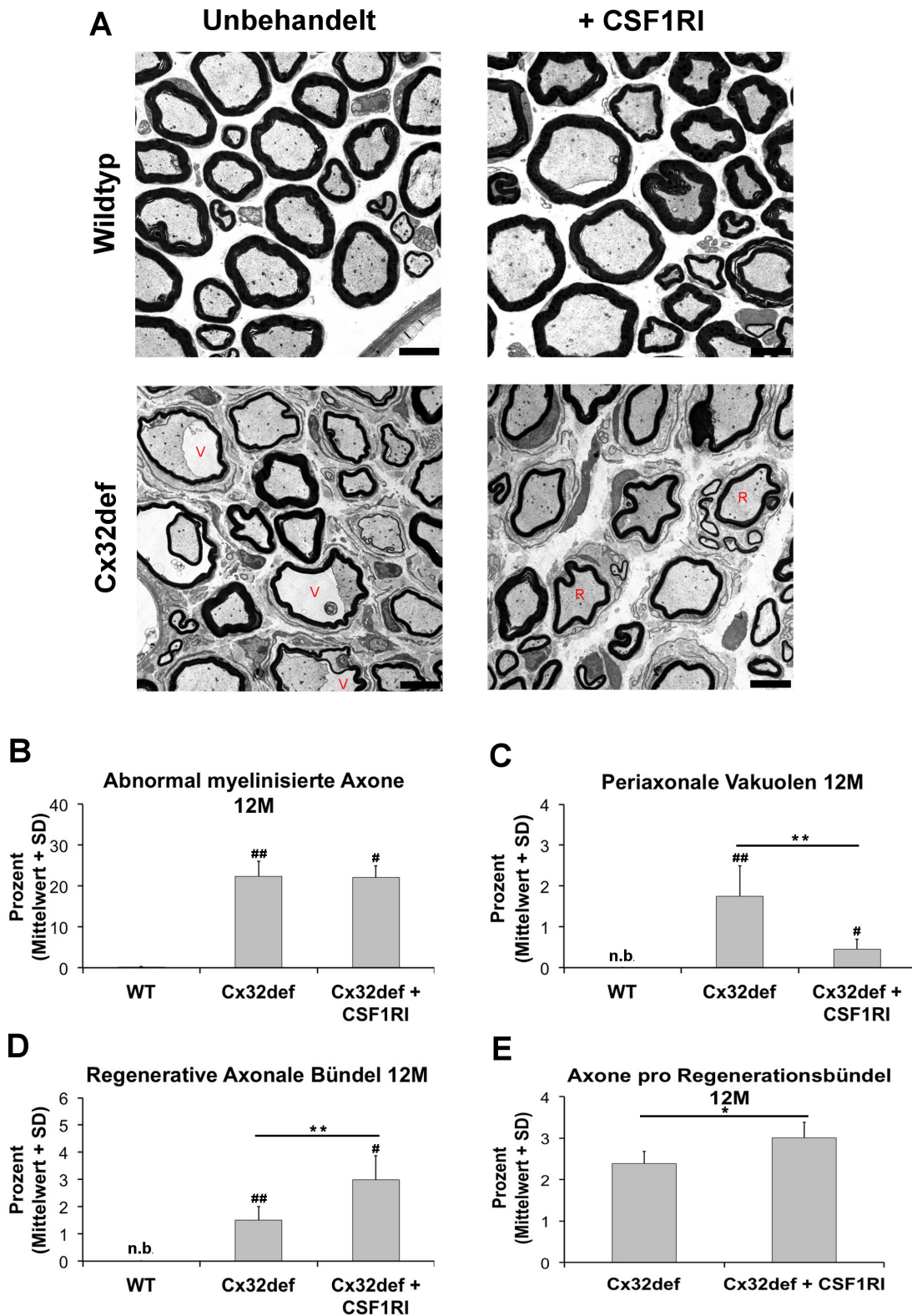


Abbildung 5 Verringerter axonaler Schaden und verstärkte Regeneration im Nervus Quadriceps 12 Monate alter CX32def Mutanten nach präventiver CSF1RI Behandlung. (A) Elektronenmikroskopische Darstellung des N. Quadriceps von 12 Monate alten Wildtypen (oben) und Cx32def Mutanten (unten), jeweils ohne (links) und nach CSF1RI Behandlung (rechts). Die unbehandelten Tiere zeigen vermehrt periaxonale Vakuolen (V). Die Behandlungsgruppe hingegen zeigt deut-

lich weniger periaxonale Vakuolen und eine größere Anzahl regenerativer axonaler Bündel (R). Maßstab = 5µm. (Modifiziert entnommen aus (Klein et al., 2015b)) **(B,C,D,E)** Quantifizierung abnormal myelinisierter Axone (B), periaxonaler Vakuolen (C), regenerativer axonaler Bündel (D) und von Axonen pro Regenerationsbündel (E) in Querschnitten des N. Quadriceps von 12 Monate alten Wildtypen und Cx32def Mutanten, ohne und nach neunmonatiger CSF1RI Behandlung. **(B)** Es zeigt sich eine signifikant erhöhte Anzahl abnormal myelinisierter Axone in den Mutanten im Vergleich zu Wildtypen. Die Behandlung mit CSF1RI zeigt keinen Effekt auf die Anzahl abnormal myelinisierter Fasern. **(C)** Cx32def Mutanten zeigen eine deutlich größere Anzahl periaxonaler Vakuolen im Vergleich zu Wildtypen (n.b. = nicht beobachtet). Unter CSF1RI Behandlung findet sich eine signifikante Abnahme periaxonaler Vakuolen. **(D)** Die Anzahl regenerativer axonaler Bündel in Cx32def Mutanten ist im Vergleich zu Wildtypen erhöht und zeigt unter CSF1RI Behandlung einen deutlich signifikanten Anstieg. **(E)** Die Anzahl der Axone pro Regenerationsbündel ist in behandelten Mutanten signifikant größer als in Unbehandelten. [Wildtyp n = 4; Cx32def n = 7; Cx32def + CSF1RI n = 4; # = signifikanter Unterschied zu unbehandelten Wildtypen; * = signifikanter Unterschied zwischen behandelten und unbehandelten Tieren gleichen Genotyps]

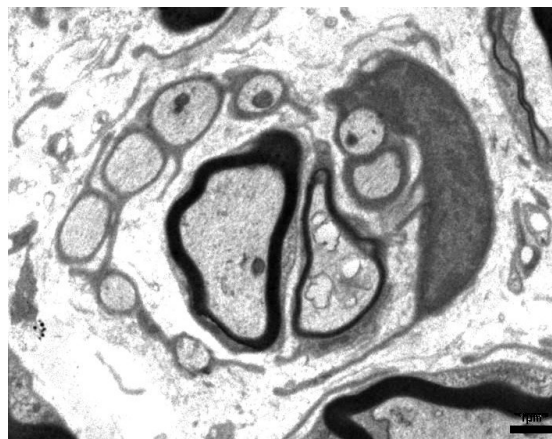


Abbildung 6 Repräsentatives regeneratives Bündel eines 12 Monate alten behandelten Tieres mit 10 axonalen Aussprossungen. Maßstab = 1µm. (Modifiziert entnommen aus (Klein et al., 2015b))

Neben den oben beschriebenen Ergebnissen in Quadricepsnerven, konnten auch Effekte in spinalen Vorderwurzeln nachgewiesen werden. Hier fiel, ähnlich zu peripheren Nerven, ebenfalls eine Verringerung des axonalen Schadens auf, repräsentiert durch eine signifikante Reduktion der periaxonalen Vakuolen (**Abbildung 7B**). Zusätzlich zeigte sich eine verringerte Anzahl phagozytischer Makrophagen (**Abbildung 7A**). Im Unterschied zu den Quadricepsnerven konnte jedoch eine Verbesserung der Demyelinisierung in den Vorderwurzeln beobachtet werden. Die Anzahl abnormal myelinisierter Nervenfasern war in behandelten Mutanten signifikant verringert (**Abbildung 7C**).

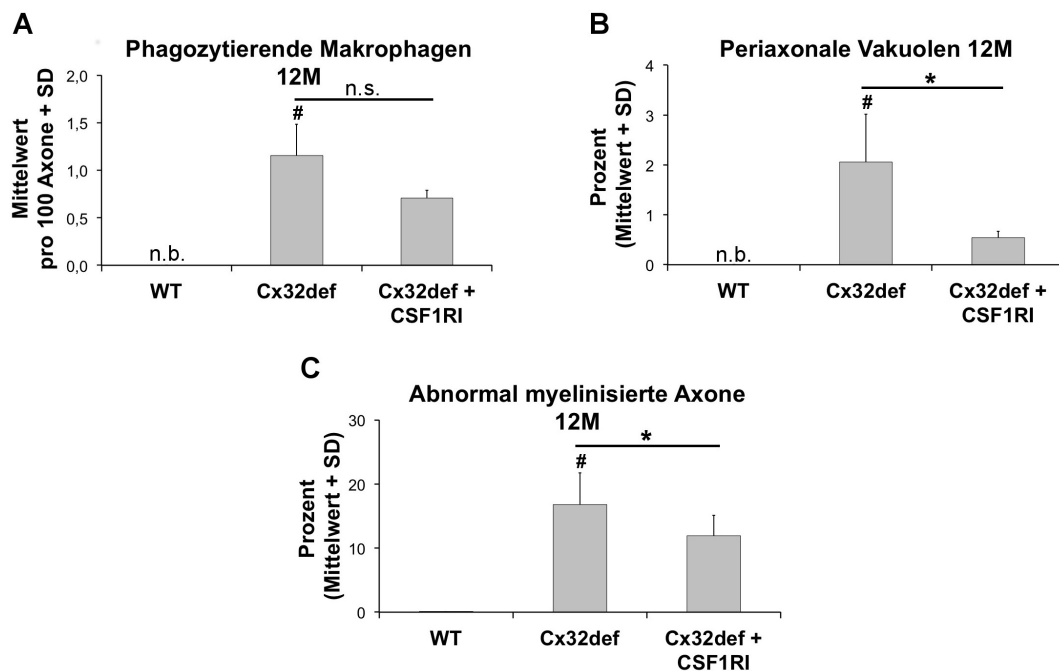


Abbildung 7 Verringerter axonaler Schaden und verbesserte Myelinintegrität in lumbalen Vorderwurzeln 12 Monate alter Cx32def Mutanten nach präventiver CSF1RI Behandlung. (A,B,C) Quantifizierung phagozytierender Makrophagen (A), periaxonaler Vakuolen (B) und abnormal myelinisierter Axone (C) in Querschnitten ventraler Spinalwurzeln von 12 Monate alten Wildtypen und Cx32def Mutanten, ohne und nach neunmonatiger CSF1RI Behandlung. (A) Die Anzahl phagozytierender Makrophagen ist gegenüber Wildtypen deutlich erhöht. Behandelte Tiere hingegen zeigen eine tendenziell geringere Anzahl. (B) Periaxonale Vakuolen können in Cx32def Tieren im Vergleich zu Wildtypen deutlich häufiger beobachtet werden. Behandelte Mutanten hingegen zeigen signifikant weniger periaxonale Vakuolen (C) Die Menge abnormal myelinisierter Fasern ist in Cx32def Tieren im Vergleich zu Wildtypen stark erhöht. Dieser Anteil ist nach neunmonatiger CSF1RI Behandlung signifikant verringert. [Cx32def n = 4; Cx32def + CSF1RI n = 3; # = signifikanter Unterschied zu unbehandelten Wildtypen; * = signifikanter Unterschied zwischen behandelten und unbehandelten Tieren gleichen Genotyps]

Anschließend erfolgte die Untersuchung der gemäß therapeutischem Therapieansatz behandelten Mäuse. Da die Erkrankung zum Zeitpunkt des Therapiestarts im Alter von 9 Monaten bereits weit fortgeschritten ist, stand hier die Frage im Mittelpunkt, ob durch die Therapie auch ein Effekt auf den bereits entstandenen Schaden erzielt werden kann, oder ob diese lediglich die Progression der Erkrankung verlangsamt bzw. aufhält.

Zwar konnte hier ebenfalls eine Reduktion der Makrophagenpopulation um ca 70 % erreicht werden (**Abbildung 3D**), eine Verbesserung der ultrastrukturellen Veränderungen in den

Quadricepsnerven therapeutisch-behandelter Mäuse konnte jedoch, im Gegensatz zu präventiv behandelten Mäusen, nicht bzw. nur in geringerem Ausmaß nachgewiesen werden. Während der axonale Schaden einen deutlichen aber nicht signifikanten Trend zur Verbesserung zeigte (**Abbildung 8A**), hatte die therapeutische CSF1RI Behandlung keinen Effekt auf die Anzahl regenerativer axonaler Bündel (**Abbildung 8B**).

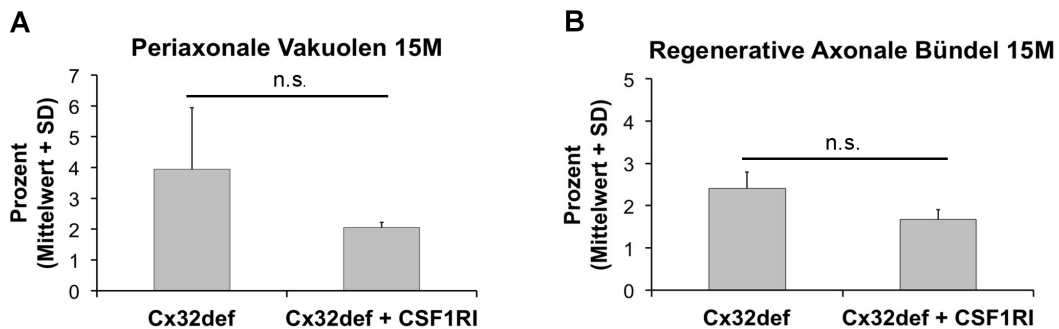


Abbildung 8 Keine Verbesserung des axonalen Schadens und der regenerativen Parameter im Nervus Quadriceps 15 Monate alter C32def Mutanten nach therapeutischer CSF1RI Behandlung. (A,B) Quantifizierung periaxonaler Vakuolen (A) und regenerativer axonaler Bündel (B) in Querschnitten des N. Quadriceps von 15 Monate alten Cx32def Mutanten, mit und ohne 6 monatiger CSF1RI Behandlung. Die Behandlung zeigt weder einen signifikanten Effekt auf die Anzahl periaxonaler Vakuolen noch auf die Anzahl regenerativer axonaler Bündel [Cx32def n = 4; Cx32def + CSF1RI n = 3]

3.1.3 Erhalt der neuromuskulären Innervation unter CSF1RI Behandlung

Ein weiteres Merkmal Cx32 defizienter Tiere ist der Verlust der neuromuskulären Innervation, entstehend durch den oben beschrieben axonalen Schaden und dem damit einhergehenden Verlust von Axonen. Cx32def Tiere zeigen im Vergleich zu Wildtypen eine größere Anzahl denervierter und partiell denervierter Synapsen an den neuromuskulären Endplatten (Groh et al., 2010; Groh et al., 2012). Von besonderem Interesse war somit, ob die durch die CSF1RI Behandlung beobachtete Reduktion des axonalen Schadens sowie das vermehrte Vorkommen regenerativer axonaler Bündel zu einem Erhalt der neuromuskulären Innervation führte.

Hierfür wurden sowohl Prä- wie auch Postsynapsen auf Querschnitten des Musculus flexor digitorum brevis angefärbt und die Anzahl denervierter (**Abbildung 9A.1**) und partiell denervierter (**Abbildung 9A.2**) neuromuskulärer Synapsen (NMS) quantifiziert.

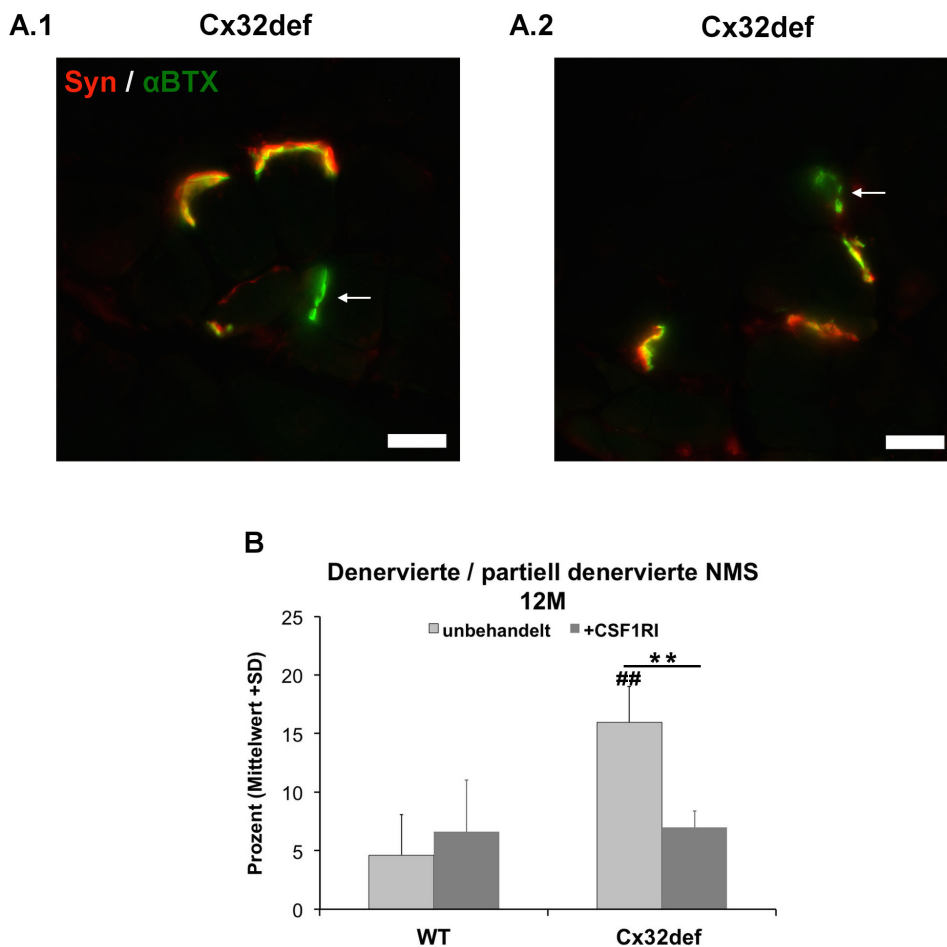


Abbildung 9 Verringerter Verlust der neuromuskulären Innervation in Fußmuskeln 12 Monate alter Cx32def Mutanten nach präventiver CSF1RI Behandlung. (A) Immunhistochemische Doppelfärbung der Präsynapsen mit Synaptophysin (rot) sowie der Postsynapsen mit α -Bungarotoxin (grün) auf Querschnitten des Musculus flexor digitorum brevis (FDB) von 12 Monaten alten Cx32def Mutanten ohne CSF1RI Behandlung. Die Pfeile markieren eine vollständig denervierte (A.1) bzw. eine partiell denervierte (A.2) neuromuskuläre Synapse (NMS). Maßstab = 20 μ m. (Modifiziert entnommen aus (Klein et al., 2015b)) (B) Quantifizierung denervierter und partiell denervierter NMS auf FDB Querschnitten von 12 Monate alten Wildtypen und Cx32def Mutanten, ohne und nach CSF1RI Behandlung. Starker Verlust der neuromuskulären Innervation in Cx32def Tieren gegenüber Wildtypen. Dieser wird durch CSF1RI Behandlung signifikant verringert. [unbehandelt: Wildtyp n = 7; Cx32def n = 8; behandelt: Wildtyp n = 6; Cx32def n = 4; # = signifikanter Unterschied zu unbehandelten Wildtypen; * = signifikanter Unterschied zwischen behandelten und unbehandelten Tieren gleichen Genotyps]

In Übereinstimmung mit oben genannten früheren Studien (Groh et al., 2010; Groh et al., 2012), zeigten die Cx32def Mutanten mit im Mittel 15% denervierten und partiell denervierten Synapsen ein deutlich größeres Ausmaß an neuromuskulärer Denervation gegenüber

gleichaltrigen Wildtypen. Durch CSF1RI Behandlung ließ sich die Anzahl denervierter und partiell denervierter Synapsen in Cx32def Mutanten jedoch auf Wildtyp-Niveau senken (**Abbildung 9B**). Dies steht in Einklang mit den Ergebnissen der ultrastrukturellen Untersuchungen aus 3.1.2. Der verringerte axonale Schaden sowie das vermehrte Aussprossen der einzelnen Neurone könnten zum Erhalt der neuromuskulären Innervation führen.

3.1.4 Verbesserung funktioneller Parameter Cx32 defizienter Mutanten unter CSF1RI Behandlung

Die bisherigen Ergebnisse zeigten eine durch die CSF1RI Behandlung reduzierte Zahl endoneuraler Makrophagen sowie eine schwächere Ausprägung der üblicherweise bei Cx32def Mutanten beobachteten charakteristischen ultrastrukturellen Veränderungen. Um nun die Relevanz dieser Ergebnisse für die Funktion des Nervs sowie für das klinische Ergebnis beurteilen zu können, wurde im nächsten Schritt der Blick auf funktionelle Parameter gerichtet.

Zur Überprüfung der Nervenfunktion wurden elektrophysiologische Messungen des Nervus Ischiadicus mit Ableitung der Aktionspotentiale an den Fußmuskeln durchgeführt. Frühere Studien haben gezeigt, dass Cx32 defiziente Tiere im Alter von 6 und 12 Monaten deutliche Defizite in der Nervenleitgeschwindigkeit sowie in den Muskelaktionssummenpotentialen (im Folgenden auch als CMAP = compound muscle action potential abgekürzt) gegenüber gleichaltrigen Wildtypen aufweisen (Groh et al., 2010). Diese neurophysiologischen Charakteristika sind typischerweise auch bei CMT 1X Patienten nachzuweisen (Pareyson et al., 2006; Groh et al., 2010).

In Übereinstimmung mit den bereits beschriebenen Ergebnissen zeigten die 6 Monate alten Cx32def Mutanten reduzierte distale und proximale CMAPs (**Abbildung 9A,B**). Ebenso konnten bei Mutanten im Vergleich zu Wildtypen langsamere Nervenleitgeschwindigkeiten beobachtet werden (**Abbildung 9C**). Nach dreimonatiger CSF1RI Behandlung hingegen zeigte sich eine deutliche Verbesserung der drei genannten Parameter. Sowohl distale als auch proximale Summenpotentiale erreichten nach CSF1RI Behandlung Wildtyp-Niveau (**Abbildung 9A,B**). Ebenso war die Nervenleitgeschwindigkeit gegenüber unbehandelten Mutanten signifikant verbessert (**Abbildung 9C**).

Weiterhin ist zu beachten, dass die Behandlung keinen negativen Effekt auf die nervale Funktion der Wildtypen hatte.

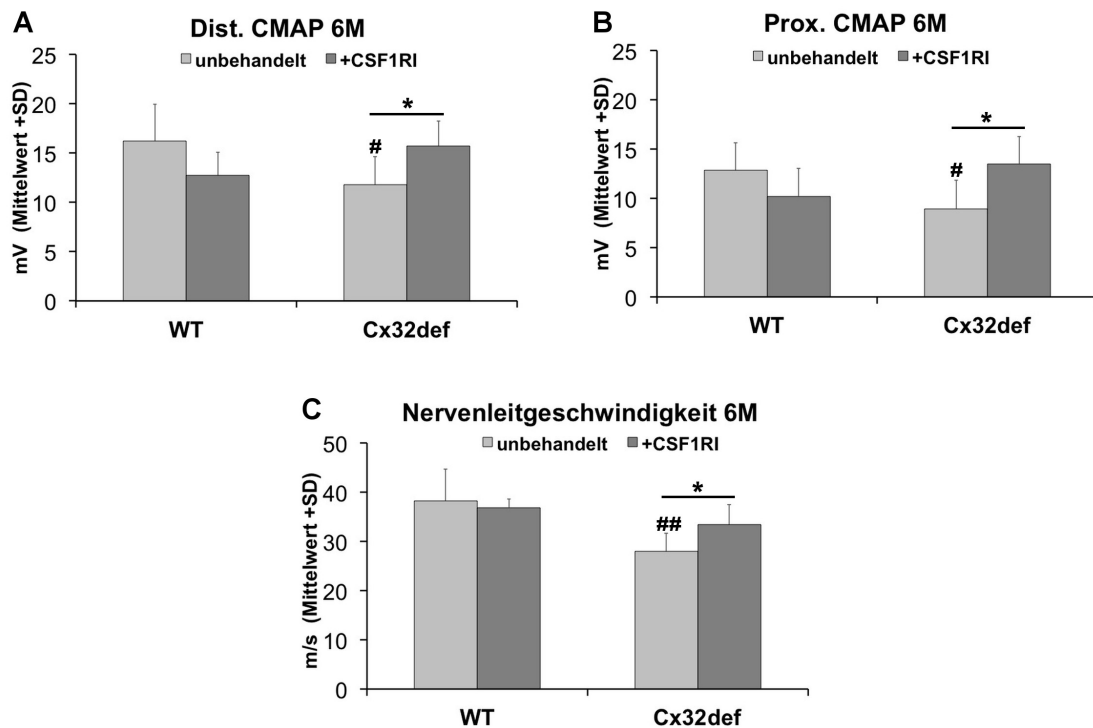


Abbildung 10 Verbesserte Amplituden der CMAPs und Nervenleitgeschwindigkeiten in 6 Monate alten CX32def Mutanten nach präventiver CSF1RI Behandlung. (A,B) Ableitung von Muskelsummenaktionspotentialen an den Fußmuskeln nach distaler (A) und proximaler (B) supramaximaler Stimulation des Nervus Ischiadicus bei 6 Monate alten Wildtypen und Cx32def Mutanten, jeweils ohne und nach drei monatiger CSF1RI Behandlung. Cx32def Tiere zeigen deutlich verringerte Amplituden gegenüber Wildtypen. Die Amplituden behandelter Mutanten sind signifikant größer im Vergleich zu unbehandelten Tieren. (C) Errechnung der Nervenleitgeschwindigkeit des Nervus Ischiadicus nach supramaximaler proximaler und distaler Stimulation. Unbehandelte Mutanten weisen signifikant reduzierte Nervenleitgeschwindigkeiten im Vergleich zu Wildtypen auf. Dieser Effekt kann durch die dreimonatige CSF1RI Behandlung verhindert werden. [unbehandelt: Wildtyp n = 6; Cx32def n = 6; behandelt: Wildtyp n = 5; Cx32def n = 5; # = signifikanter Unterschied zu unbehandelten Wildtypen; * = signifikanter Unterschied zwischen behandelten und unbehandelten Tieren gleichen Genotyps]

Im nächsten Schritt folgte die neurophysiologische Analyse der 12 Monate alten Tiere nach neun Monate langer CSF1RI Behandlung. Hier war einerseits von Interesse, ob die oben beschriebenen nach drei Monaten Behandlung erzielten funktionellen Verbesserungen auch langfristig erhalten werden konnten. Andererseits stand die Auswirkung einer dauerhaften CSF1RI Therapie auf die neuronale Funktion gesunder Tiere im Fokus.

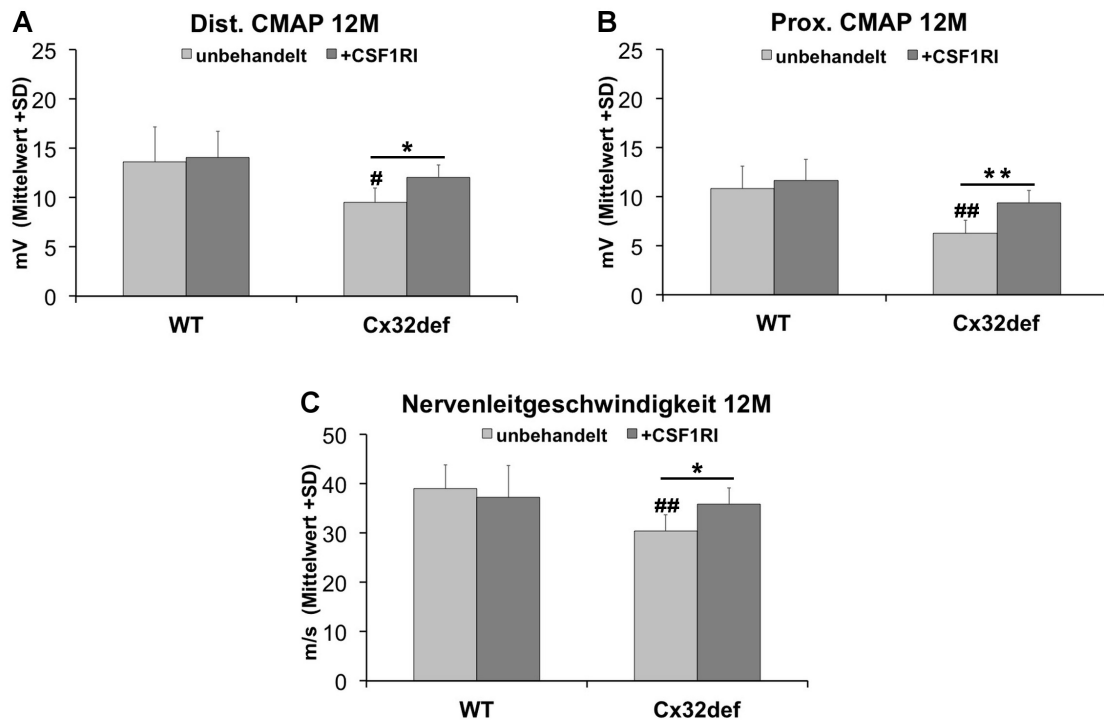


Abbildung 11 Verbesserte Amplituden der CMAPs und Nervenleitgeschwindigkeiten in 12 Monate alten Cx32def Mutanten nach präventiver CSF1RI Behandlung (A,B) Ableitung von Muskelsummenaktionspotentialen an den Fußmuskeln nach distaler (A) und proximaler (B) supramaximaler Stimulation des Nervus Ischiadicus bei 12 Monate alten Wildtypen und Cx32def Mutanten, jeweils ohne und nach neunmonatiger CSF1RI Behandlung. Behandelte Wildtypen zeigen keine Beeinträchtigung der Muskelsummenaktionspotentiale. Die deutliche Reduktion der Amplituden in Cx32def Tieren gegenüber Wildtypen ist in behandelten Mutanten signifikant geringer ausgeprägt. (C) Errechnung der Nervenleitgeschwindigkeit des Nervus Ischiadicus nach supramaximaler proximaler und distaler Stimulation. Behandelte Mutanten zeigen signifikant höhere Nervenleitgeschwindigkeiten im Vergleich zu unbehandelten. [unbehandelt: Wildtyp n = 9; Cx32def n = 7; behandelt: Wildtyp n = 6; Cx32def n = 4; # = signifikanter Unterschied zu unbehandelten Wildtypen; * = signifikanter Unterschied zwischen behandelten und unbehandelten Tieren gleichen Genotyps]

Bei Betrachtung der CMAPs der unbehandelten sowie der mit CSF1RI behandelten Wildtypen konnte kein Unterschied festgestellt werden (**Abbildung 11A,B**).

Weiterhin konnten die bereits bei 6 Monate alten Tieren beobachteten positiven Effekte der CSF1RI Behandlung bestätigt werden. Während die Amplituden 12 Monate alter Cx32 defizienter Tiere im Vergleich zu gleichaltrigen Wildtypen signifikant verringert waren, zeigten die CSF1RI behandelten Mutanten Werte, die fast dem Wildtyp-Niveau entsprachen (**Abbildung 11A,B**). Ebenso konnte in Übereinstimmung mit den Ergebnissen in 6 Monate alten

Tieren die Nervenleitgeschwindigkeit in den Mutanten durch die Behandlung erhalten werden (**Abbildung 11C**).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der in den ultrastrukturellen Untersuchungen beobachtete reduzierte axonale Schaden sowie die vermehrte regenerative Aktivität sich in einer robusten Verbesserung der neurophysiologischen Funktion äußerten.

Die oben beschriebenen Beobachtungen sprechen für einen positiven Effekt der Behandlung mit frühem Therapiestart. Beurteilt wurde dies bisher jedoch vor allem an Parametern, welche keine genaue Aussage über einen Effekt auf die klinische Ausprägung der Erkrankung zulassen. Für die Patienten ist jedoch gerade dies der vermutlich wichtigste Aussagewert, ob von der Therapie profitiert werden kann oder nicht. Um den bei CMT 1 Patienten typischerweise als Leitsymptom dominierenden Kraftverlust abschätzen zu können, wurden spezielle Halteversuche durchgeführt. Hierbei wurde die Greifkraft der Hinterbeine von Wildtypen sowie von Cx32def Tieren im Alter von 12 Monaten ohne und nach neunmonatiger Behandlung gemessen.

Erwartungsgemäß zeigten 12 Monate alte Cx32def Tiere einen deutlichen Kraftverlust im Vergleich zu gleichaltrigen Wildtypen (**Abbildung 12**). Die Gruppe behandelter Mutanten jedoch erreichte Kraftwerte auf Wildtyp-Niveau und zeigte somit eine signifikant verbesserte Greifkraft im Vergleich zu unbehandelten Cx32def Tieren (**Abbildung 12**).

Bei Wildtypen hatte die Behandlung keinen Effekt auf die Greifkraft (Daten nicht gezeigt).

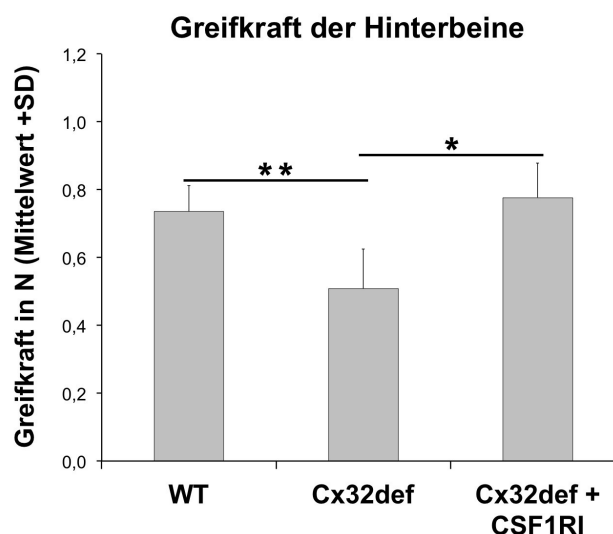


Abbildung 12 Präventive CSF1RI Behandlung führt zu verbesserter Greifkraft von 12 Monate alten Cx32def Mutanten. Messung der Greifkraft der Hinterbeine von 12 Monate Cx32def Tieren,

jeweils ohne und nach CSF1RI Behandlung im Vergleich zu unbehandelten Wildtypen. Cx32def Tiere zeigen im Alter von 12 Monaten eine signifikante Verringerung der Greifkraft im Vergleich zu gleichaltrigen Wildtypen während bei behandelten Mutanten kein Kraftverlust nachweisbar ist. [unbehandelt: Wildtyp n = 5; Cx32def n = 6; behandelt: Cx32def n = 3]

Zuletzt erfolgte die funktionelle Untersuchung der gemäß therapeutischem Ansatz behandelten, 15 Monate alten Tiere. Nach dem nur schwachen Effekt der Behandlung in den ultrastrukturellen Untersuchungen (**Abbildung 8**) interessierte nun, ob sich dies auch in den neurophysiologischen Parametern widerspiegelte.

Wie erwartet konnte auch hier kein signifikanter Effekt durch die Behandlung nachgewiesen werden.

Sowohl CMAPs (proximale und distale) wie auch Nervenleitgeschwindigkeiten waren in unbehandelten Cx32def Tieren signifikant gegenüber gleichaltrigen Wildtypen verringert (**Abbildung 13A,B,C**). Bei Betrachtung der behandelten Cx32def Mutanten zeigte sich keine Verbesserung der Amplituden der CMAPs (proximale und distale) oder der Nervenleitgeschwindigkeiten (**Abbildung 13A,B,C**).

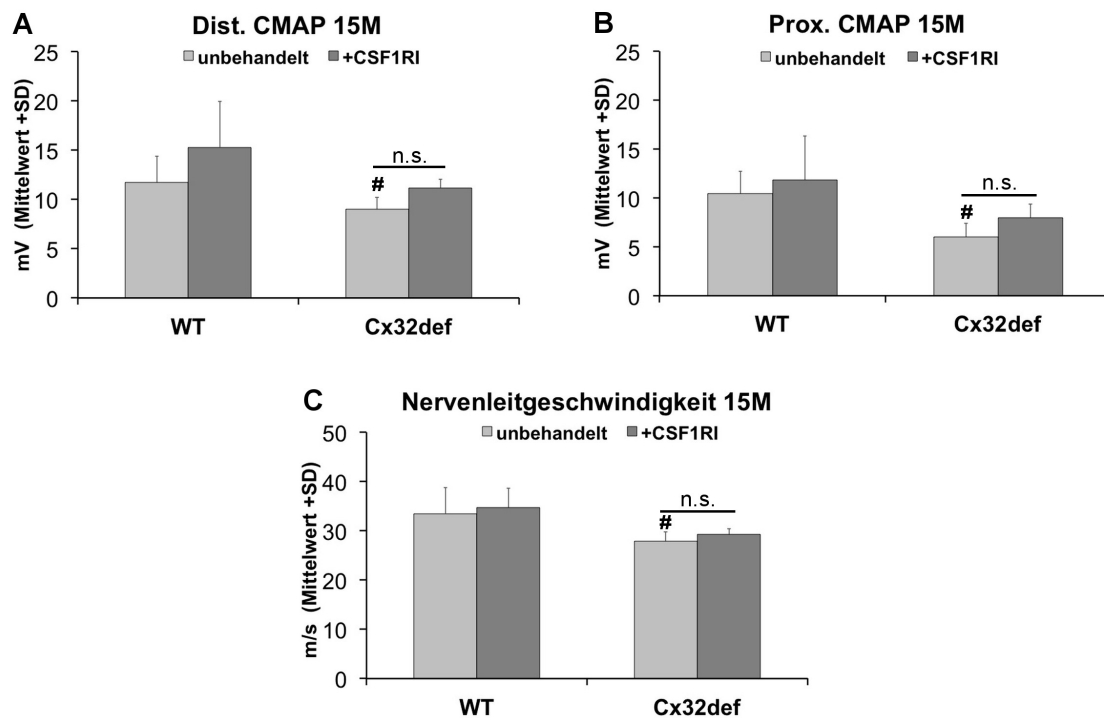


Abbildung 13 Keine Verbesserung neurophysiologischer Parameter in 15 Monate alten Cx32def Mutanten nach therapeutischer CSF1RI Behandlung. (A,B) Ableitung von Muskelsummenaktionspotentialen an den Fußmuskeln nach distaler (A) und proximaler (B) supramaximaler Stimulation

des Nervus Ischiadicus bei 15 Monate alten Wildtypen und Cx32def Mutanten, jeweils ohne und nach sechsmonatiger CSF1RI Behandlung. Die Amplituden unbehandelter Tiere sind signifikant kleiner im Vergleich zu gleichaltrigen Wildtypen. Durch sechsmonatige CSF1RI Behandlung der Mutanten konnte keine Verbesserung der Werte erzielt werden. (C) Errechnung der Nervenleitgeschwindigkeit des Nervus Ischiadicus nach supramaximaler proximaler und distaler Stimulation. Unbehandelte Mutanten zeigen gegenüber gleichaltrigen Wildtypen eine signifikant langsamere durchschnittliche Nervenleitgeschwindigkeit. Auch hier zeigt sich kein Unterschied zwischen behandelten und unbehandelten Cx32def Mutanten. [unbehandelt: Wildtyp n = 5; Cx32def n = 5; behandelt: Wildtyp n = 6; Cx32def n = 7; # = signifikanter Unterschied zu unbehandelten Wildtypen]

3.2 CSF-1-Rezeptor-Inhibitor Behandlung P0 heterozygoter Mäuse (CMT 1B)

Nach den positiven Resultaten der präventiven neunmonatigen Behandlung Cx32 defizienter Mutanten stellte sich die Frage, ob die Therapie auch in anderen Tiermodellen der Charcot-Marie-Tooth 1 Neuropathien eine ähnliche Effektivität zeigt. Untersucht wurden hierfür P0 heterozygote sowie PMP22 transgene Mäuse (siehe 3.3), welche Modelle für CMT 1B (P0het) sowie für CMT 1A (PMP2tg) darstellen.

Besonders P0het Mäuse zeigten bereits vielversprechende Ergebnisse bei der Kreuzung mit osteopetrotischen Mäusen, welche nicht zur CSF-1 Synthese in der Lage sind. Der typische Myelinschaden in Form abnormal myelinisierter Fasern konnte hier fast vollständig verhindert werden (Carenini et al., 2001).

Da lediglich der präventive Behandlungsansatz bei Cx32def Mutanten einen signifikanten Effekt zeigte, konzentrierte sich die Therapie der P0het und PMP22tg Tiere auf die Behandlung im Alter von drei bis zwölf Monaten.

3.2.1 CSF1RI Behandlung führt zu Reduktion der Makrophagenanzahl im Nervus Quadriceps

Zur Überprüfung der Effektivität des CSF1-Rezeptor-Inhibitors in Hinsicht auf die Reduktion der Makrophagenpopulation erfolgte eine Färbung von Querschnitten des Nervus Quadriceps mit Hilfe des Makrophagenmarkers F4/80.

Wie zu erwarten konnte in Quadriceps Nerven un behandelter P0het Mutanten eine deutlich größere Anzahl Makrophagen im Vergleich zu un behandelten Wildtypen nachgewiesen werden (**Abbildung 14B**). Bei Betrachtung der repräsentativen Querschnitte fiel eine deutlich verringerte Makrophagenpopulation im Nervus Quadriceps behandelter P0het Tiere auf (**Abbildung 14A**). In der Quantifizierung zeigte sich eine hoch signifikant reduzierte Anzahl F4/80 positiver Makrophagen nach CSF1RI Behandlung, sowohl in Wildtypen als auch in P0het Mutanten.

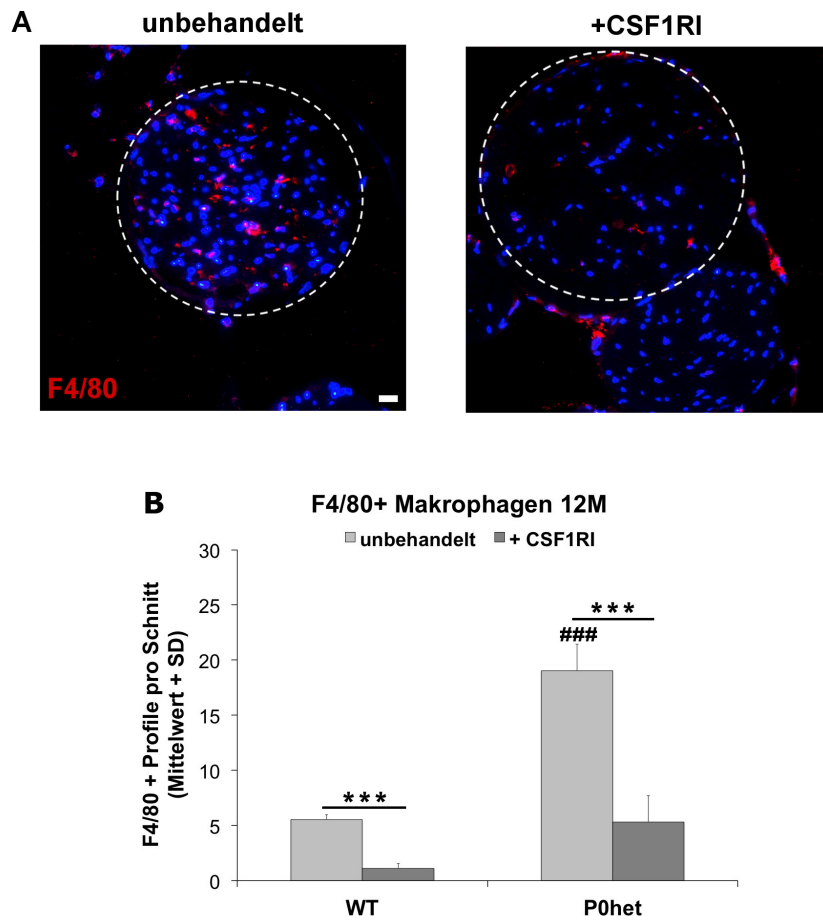


Abbildung 14 Reduktion der Makrophagenanzahl im Nervus Quadriceps 12 Monate alter P0het Mutanten nach CSF1RI Behandlung. (A) Repräsentative F4/80 (rot) gefärbte Querschnitte des N. Quadriceps von 12 Monate alten P0het Mutanten, jeweils ohne (links) und nach (rechts) CSF1RI Behandlung. Die gestrichelte Linie markiert den Umriss des Nervs. Zellkerne sind mit DAPI (blau) gefärbt. Maßstab (weiß) = 20 μ m. (Modifiziert entnommen aus (Klein et al., 2015b)) (B) Quantifizierung F4/80 positiver Makrophagen in Querschnitten des N. Quadriceps 12 Monate alter Wildtypen und P0het Mutanten ohne und nach CSF1R Inhibitor Behandlung. Die Anzahl der Makrophagen ist in unbehandelten P0het Tieren gegenüber gleichaltrigen Wildtypen deutlich erhöht. Unter CSF1R Inhibitor Behandlung kommt es bei beiden Genotypen zu einer signifikanten Reduktion der Makrophagen um ca. 70%. [unbehandelt: Wildtyp n = 5; P0het n = 5; behandelt: Wildtyp n = 6; P0het n = 6; # = signifikanter Unterschied zu unbehandelten Wildtypen; * = signifikanter Unterschied zwischen behandelten und unbehandelten Tieren gleichen Genotyps]

3.2.2 Verbesserter Erhalt der Myelinintegrität nach CSF1RI Behandlung

P0het Tiere zeigen typische ultrastrukturelle pathologische Veränderungen. Charakteristisch für Mutanten im Alter von 12 Monaten sind deutliche Anzeichen von De- und Remyelinisierung sowohl in lumbalen Vorderwurzeln wie auch im Nervus Quadriceps (Martini et al., 1995; Shy et al., 1997). Da Verkreuzungsstudien von P0het Tieren mit CSF-1 defizienten osteopetrotischen Mäusen eine robuste Verbesserung der Myelinintegrität zeigten (Carenini et al., 2001), interessierte nun vor allem, ob ein positiver Effekt auf die Myelinscheiden auch unter CSF1RI Behandlung beobachtet werden kann.

Bei Betrachtung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen P0 heterozygoter Tiere ohne und nach neunmonatiger CSF1RI Behandlung (**Abbildung 15A**) schien ein Trend zu einem verringerten Myelinverlust erkennbar. Nach Quantifizierung des Anteils abnormal myelinisierter Axone (**Abbildung 15B**) konnte jedoch interessanterweise kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Dies lag vor allem an der enorm variablen Ausprägung des Phänotyps P0 heterozygoter Tiere, welche einen Anteil abnormal myelinisierter Fasern mit einer Streuweite von 6 bis 40% zeigten (**Abbildung 15C**) und sich durch die dadurch bedingte große Standardabweichung nicht signifikant von behandelten Tieren unterschieden. Jedoch fiel auf, dass unter CSF1RI Therapie diese stark ausgeprägte Streuung der Werte nicht mehr zu beobachten war. Der Anteil abnormal myelinisierter Axone lag nun stabil um einen Mittelwert von 12% (**Abbildung 15C**). Vor allem stark betroffene Mutanten mit einer abnormen Myelinisierung >18% konnten nach CSF1RI Behandlung nicht mehr identifiziert werden (**Abbildung 15D**). Dieser protektive Effekt bei besonders stark betroffenen Mutanten erwies sich nach Überprüfung mittels des exakten Tests nach Fisher als signifikant ($p = 0,044$).

Die für Cx32def Mutanten charakteristischen periaxonalen Vakuolen und regenerativen axonalen Bündel konnten zwar auch in P0het Tieren nachgewiesen werden, jedoch traten sie hier deutlich seltener auf und stellen somit kein typisches Merkmal dieses Genotyps dar. Entsprechend zeigte sich in P0het Mutanten auch kein Effekt der CSF1RI Behandlung auf diese Parameter (**Abbildung 15E,F**).

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse ein verringertes Ausmaß der Demyelinisierung nach neunmonatiger CSF1RI Behandlung.

Ähnliche Beobachtungen konnten auch in ultrastrukturellen Untersuchungen lumbaler Vorderwurzeln P0 heterozygoter Tiere gemacht werden. Zwar war der Effekt der Myelinprotektion in den Vorderwurzeln (**Abbildung 16B**) insgesamt schwächer ausgeprägt als in Quadri-

cepsnerven (**Abbildung 15B**), jedoch schien hier, ähnlich wie in den peripheren Nerven, die Therapie vor allem bei besonders stark betroffenen Mutanten anzusprechen.

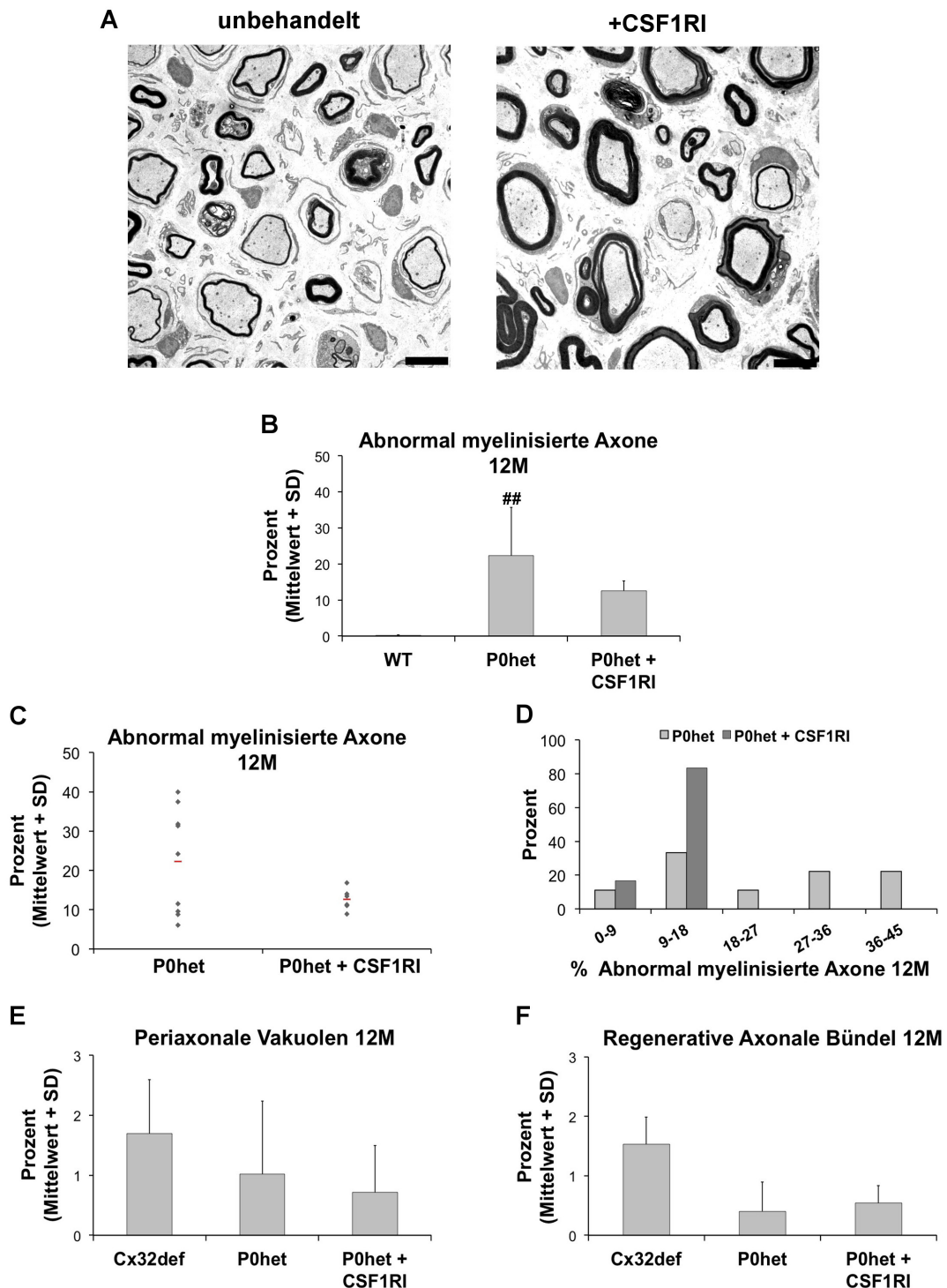


Abbildung 15 Verbesserter Erhalt der Myelinintegrität im Nervus Quadriceps 12 Monate alter **P0het** Mutanten nach **CSF1RI** Behandlung. (A) Elektronenmikroskopische Darstellung des N. Quadriceps 12 Monate alter P0het Mutanten, ohne (links) und nach (rechts) neunmonatiger CSF1RI Behandlung. Behandelte P0het Tiere zeigen einen besseren Erhalt der Myelinintegrität im Vergleich

zu gleichaltrigen unbehandelten Mutanten. Maßstab = 5µm. (Modifiziert entnommen aus (Klein et al., 2015b)) **(B,C,D)** Quantifizierung abnormal myelinisierter Axone in Querschnitten des N. Quadriceps von 12 Monate alten Wildtypen (B) und P0het Tieren (B,C,D) ohne und nach neunmonatiger CSF1RI Behandlung. **(B)** P0het Tiere weisen im Unterschied zu Wildtypen im Mittel >20% abnormal myelinisierte Fasern auf, während Tiere nach CSF1RI Behandlung einen Trend zur verbesserten Myelinintegrität zeigen. **(C)** Die enorme variable Ausprägung des Phänotyps P0het Tiere wird nach CSF1RI Behandlung nicht mehr beobachtet. **(D)** Mutanten mit besonders starkem Verlust der Myelinintegrität (>18% abnormal myelinisierte Axone) sind nach CSF1RI Behandlung nicht mehr nachweisbar identifizierbar. **(E, F)** Quantifizierung periaxonaler Vakuolen (E) und regenerativer axonaler Bündel (F) in Querschnitten des N. Quadriceps 12 Monate alter Cx32def Tiere sowie P0het Mutanten ohne und nach neunmonatiger CSF1RI Behandlung. Sowohl periaxonale Vakuolen wie auch regenerative axonale Bündel treten in P0het Tieren deutlich seltener auf als in Cx32def Mutanten. Eine neunmonatige CSF1RI Behandlung zeigt keinen Effekt. [unbehandelt: Wildtyp n = 4; P0het n = 9; Cx32def n = 7; behandelt: Wildtyp n = 6; P0het n = 6; # = signifikanter Unterschied zu unbehandelten Wildtypen]

Beim Vergleich repräsentativer Semidünnschnitte von den am stärksten mit denen von am schwächsten betroffenen Individuen behandelter und unbehandelter Tiere gab es zwar in beiden Behandlungsgruppen Tiere mit gutem Myelinerhalt, besonders stark betroffene Tiere mit >50% abnormal myelinisierten Axonen traten hingegen nur in der Gruppe der unbehandelten Mutanten auf (**Abbildung 16A**).

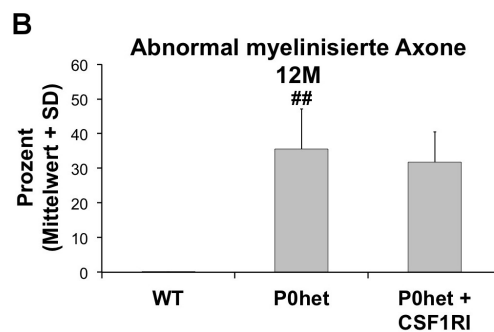
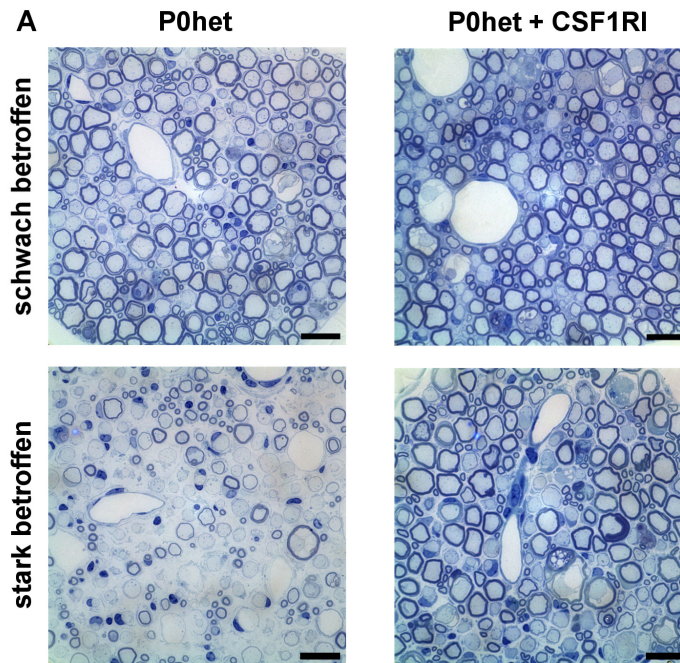


Abbildung 16 Weniger variable Ausprägung des Myelinverlustes in lumbalen Vorderwurzeln 12 Monate alter P0het Mutanten nach CSF1RI Behandlung. (A) Lichtmikroskopische Darstellung von Semidünnschnitten lumbaler Vorderwurzeln 12 Monate alter P0 heterozygoter Tiere, ohne (links) und nach (rechts) neunmonatiger CSF1RI Behandlung. Dargestellt ist jeweils eines der am stärksten (unten) und eines der am schwächsten (oben) betroffenen Individuen. Maßstab = 10µm. (B) Quantifizierung abnormal myelinisierter Axone in elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Querschnitten lumbaler Vorderwurzeln 12 Monate alter Wildtypen und P0het Tieren ohne und nach neunmonatiger CSF1RI Behandlung. Während in Wildtypen fast keine abnormal myelinisierten Fasern nachweisbar sind, sind bei P0het Tieren im Mittel 35% der Fasern betroffen. Mutanten nach CSF1RI Behandlung zeigen einen Trend zu verbessertem Myelinerhalt. [unbehandelt: Wildtyp n = 4; P0het n = 4; behandelt: P0het n = 6; # = signifikanter Unterschied zu unbehandelten Wildtypen]

3.2.3 Trend zu verbesserter neuromuskulärer Innervation unter CSF1RI Behandlung

Da Demyelinisierung final zu axonalem Schaden bzw. zu axonalem Verlust führt (Nave, 2010) und sich in den ultrastrukturellen Untersuchungen ein Myelinerhalt bei besonders stark betroffenen P0het Mutanten zeigte, stellte sich nun die Frage, ob auch hier durch einen indirekten axonalen Erhalt eine positive Auswirkung auf die neuromuskuläre Innervation beobachtet werden konnte.

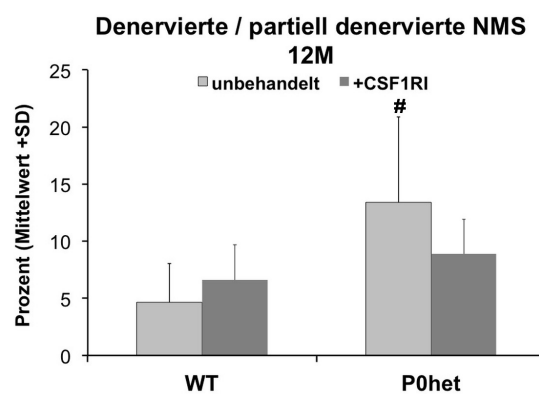


Abbildung 17 Trend zu verbesserter neuromuskulärer Innervation in Fußmuskeln 12 Monate alter P0het Mutanten nach CSF1RI Behandlung. Quantifizierung denervierter und partiell denervierter neuromuskulärer Synapsen (NMS) auf Musculus flexor digitorum brevis Querschnitten von 12 Monate alten Wildtypen und P0het Mutanten, ohne und nach CSF1RI Behandlung. Starker Verlust der neuromuskulären Innervation in P0hetTieren gegenüber Wildtypen. Nicht signifikante Reduktion neuromuskulärer Innervation nach neunmonatiger CSF1RI Behandlung. [unbehandelt: Wildtyp n = 7; P0het n = 8; behandelt: Wildtyp n = 6; P0het n = 6; # = signifikanter Unterschied zu unbehandelten Wildtypen]

Die Quantifizierung denervierter und partiell denervierter neuromuskulärer Synapsen (**Abbildung 17**) zeigte eine deutlich reduzierte neuromuskuläre Innervation in P0het Mutanten gegenüber gleichaltrigen Wildtypen. Nach neunmonatiger CSF1RI Behandlung konnte ein Trend zur verbesserten Innervation beobachtet werden, welcher jedoch erneut durch die Variabilität des Phänotyps P0 heterozygoter Tiere nicht signifikant war. Besonders stark betroffene Individuen waren erneut nicht mehr identifizierbar.

3.2.4 Verbesserung funktioneller Parameter P0 heterozygoter Mäuse unter CSF1RI Behandlung

Die bisher gezeigten Daten legen einen protektiven Effekt der CSF1RI Behandlung auf die Ausprägung des Myelinschadens sowie auf die neuromuskuläre Innervation nahe. Um die Auswirkung dieser ultrastrukturellen und immunhistologischen Beobachtungen auf das klinische Bild beurteilen zu können, wurden funktionelle Parameter untersucht. Dies erfolgte erneut durch neurophysiologische Messungen sowie durch die Quantifizierung der Greifkraft der Tiere.

Im Focus der neurophysiologischen Messungen standen Nervenleitgeschwindigkeit, die Amplituden der proximalen und distalen Muskelsummenaktionspotentiale, sowie die bei P0het Mutanten typischerweise verlängerte F-Wellen-Latenz, welche im Unterschied zu Cx32def Mutanten den im Vordergrund stehenden Myelinverlust in diesem Mausmodell widerspiegelt (Martini et al., 1995; Shy et al., 1997).

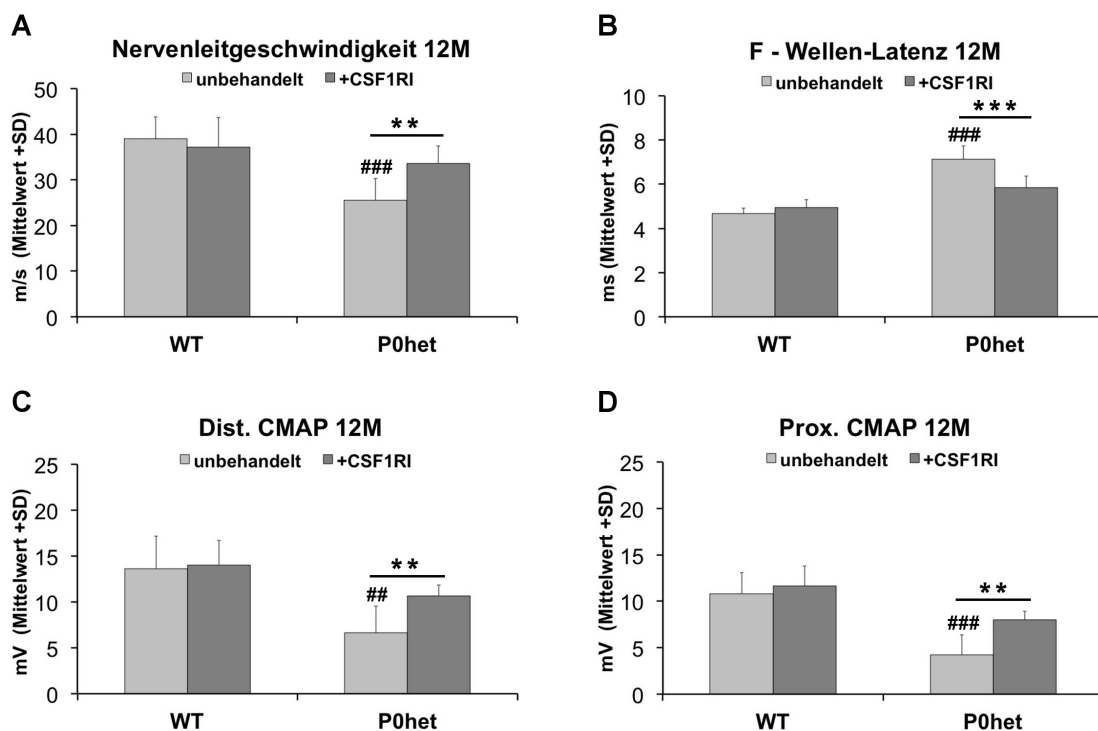


Abbildung 18 Verbesserte neurophysiologische Parameter in 12 Monate alten P0het Mutanten nach CSF1RI Behandlung. (A) Errechnung der Nervenleitgeschwindigkeit des Nervus Ischiadicus nach supramaximaler proximaler und distaler Stimulation von Wildtypen und P0het Mutanten, jeweils ohne und nach neunmonatiger CSF1RI Behandlung. Die Nervenleitgeschwindigkeit in P0het Tieren ist im Vergleich zu Wildtypen deutlich verringert. Behandelte Mutanten zeigen gegenüber Unbehand-

delten eine signifikante Verbesserung der Nervenleitgeschwindigkeit (**B**) Ableitung der F-Wellen-Latenz des Nervus Ischiadicus von Wildtypen und P0het Mutanten, jeweils ohne und nach neunmonatiger CSF1RI Behandlung. Während die F-Wellen-Latenzen in P0het Tieren gegenüber Wildtypen verlängert ist, kommt es nach CSF1RI Behandlung zu signifikant kürzeren Latenzen in P0het Mutanten. (**C, D**) Ableitung von Muskelsummenaktionspotentialen an den Fußmuskeln nach distaler (**C**) und proximaler (**D**) supramaximaler Stimulation des Nervus Ischiadicus bei 12 Monate alten Wildtypen und P0het Mutanten, jeweils ohne und nach neunmonatiger CSF1RI Behandlung. P0het Tiere zeigen deutlich verringerte Amplituden gegenüber Wildtypen. Die Amplituden behandelter Mutanten sind signifikant größer im Vergleich zu unbehandelten Tieren. [unbehandelt: Wildtyp n = 6; P0het n = 6; behandelt: Wildtyp n = 5; P0het n = 6; # = signifikanter Unterschied zu unbehandelten Wildtypen; * = signifikanter Unterschied zwischen behandelten und unbehandelten Tieren gleichen Genotyps]

In Übereinstimmung mit früheren Untersuchungen konnten bei P0het Mutanten deutlich verringerte Amplituden der distalen und proximalen CMAPs (**Abbildung 18C, D**), langsamere Nervenleitgeschwindigkeiten (**Abbildung 18A**) sowie eine verlängerte F-Wellen-Latenz nachgewiesen werden (**Abbildung 18B**).

Passend zu den oben gezeigten Ergebnissen, fielen in P0het Tieren nach neunmonatiger CSF1RI Behandlung signifikant schnellere Nervenleitgeschwindigkeiten (**Abbildung 18A**), sowie signifikant kürzere F-Wellen-Latenzen auf. (**Abbildung 18B**). Weiterhin zeigten sich signifikant größere distale und proximale Muskelsummenaktionspotentiale (**Abbildung 18C,D**).

Anschließend erfolgte eine Messung der Greifkraft der Hinterbeine von Wildtypen sowie von P0het Mutanten im Alter von 12 Monaten ohne und nach CSF1RI Behandlung.

Hierbei ließ sich bei unbehandelten Tieren ein deutlicher Kraftverlust gegenüber gleichaltrigen Wildtypen nachweisen. Die bisherigen Ergebnisse unterstützend, zeigte sich nach CSF1RI Behandlung ein Trend zu verstärkter Greifkraft (**Abbildung 19**).

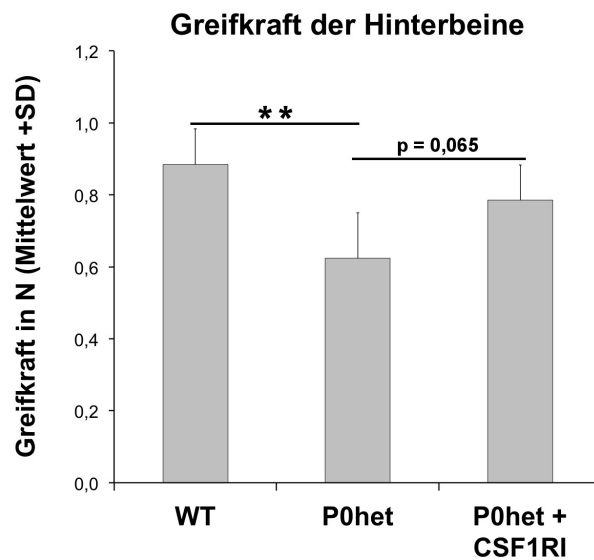


Abbildung 19 Trend zu verbesserter Greifkraft von 12 Monate alten P0het Mutanten nach CSF1RI Behandlung. Messung der Greifkraft der Hinterbeine von 12 Monate P0het Tieren, jeweils ohne und nach CSF1RI Behandlung im Vergleich zu unbehandelten Wildtypen. P0het Tiere zeigen im Alter von 12 Monaten eine signifikante Verringerung der Greifkraft im Vergleich zu gleichaltrigen Wildtypen. Behandelte Tieren zeigen einen Trend zu verbesserter Greifkraft [unbehandelt: Wildtyp n = 5; P0het n = 6; behandelt: P0het n = 5]

3.3 CSF-1-Rezeptor-Inhibitor Behandlung PMP22 transgener Mäuse (CMT 1A)

Das dritte in dieser Studie untersuchte Mausmodell repräsentiert den Subtyp Charcot-Marie-Tooth 1A. CMT 1A ist die am häufigsten auftretende CMT 1 Form (Fridman et al., 2015) und hat somit eine besondere klinische Relevanz.

3.3.1 CSF1RI Behandlung führt zur Reduktion der Makrophagenanzahl im Nervus Quadriceps

Auch hier erfolgte im ersten Schritt eine F4/80 Immunfluoreszenzfärbung auf Nervus Quadriceps Querschnitten zur Untersuchung der Wirkung des Inhibitors auf die endoneurale Makrophagenpopulation.

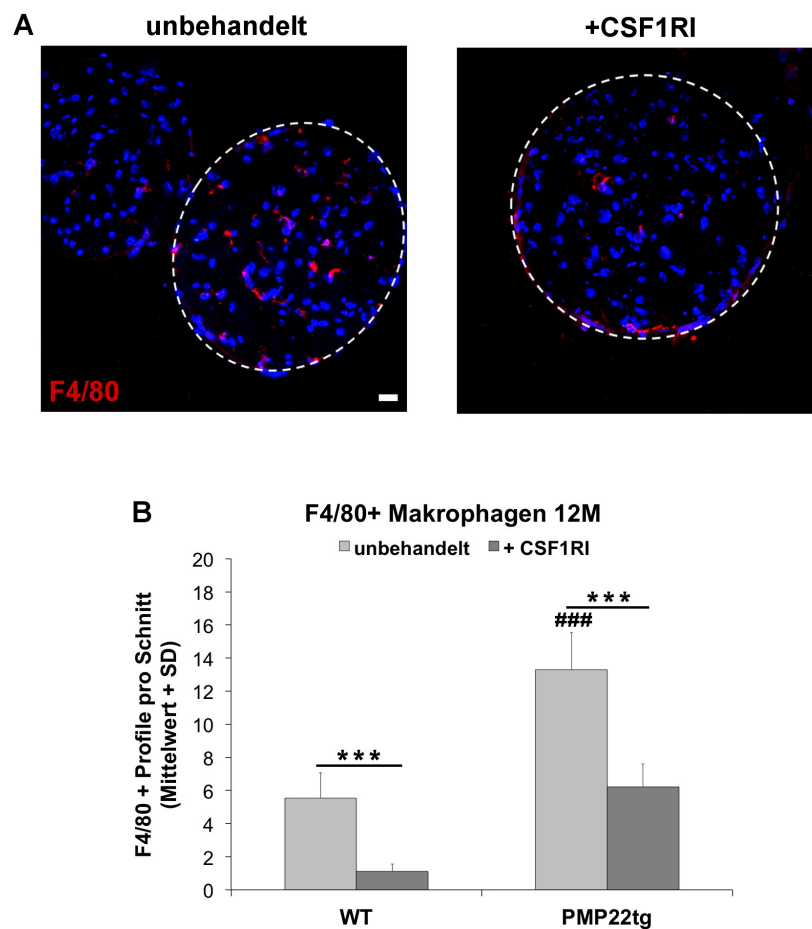


Abbildung 20 Reduktion der Makrophagenanzahl im Nervus Quadriceps 12 Monate alter PMP22tg Mutanten nach CSF1RI Behandlung. (A) Repräsentative F4/80 (rot) gefärbte Querschnitt-

te des N. Quadriceps von 12 Monate alten PMP22tg Mutanten, jeweils ohne (links) und nach (rechts) CSF1RI Behandlung. Die gestrichelte Linie markiert den Umriss des Nervs. Zellkerne sind mit DAPI (blau) gefärbt. Maßstab (weiß) = 20 µm. (Modifiziert entnommen aus (Klein et al., 2015b)) **(B)** Quantifizierung F4/80 positiver Makrophagen in Querschnitten des N. Quadriceps 12 Monate alter Wildtypen und PMP22tg Mutanten ohne und nach CSF1R Inhibitor Behandlung. Die Anzahl der Makrophagen ist in unbehandelten PMP22tg Tieren gegenüber gleichaltrigen Wildtypen deutlich erhöht. Unter CSF1R Inhibitor Behandlung kommt es bei beiden Genotypen zu einer signifikanten Reduktion der Makrophagenpopulation. [unbehandelt: Wildtyp n = 5; PMP22tg n = 7; behandelt: Wildtyp n = 6; PMP22tg n = 5; # = signifikanter Unterschied zu unbehandelten Wildtypen; * = signifikanter Unterschied zwischen behandelten und unbehandelten Tieren gleichen Genotyps]

Im Alter von 12 Monaten zeigten PMP22tg Tiere eine mehr als doppelt so große Anzahl an Makrophagen im Endoneurium im Vergleich zu gleichaltrigen Wildtypen. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen in Cx32def und P0het Tieren kam es auch in PMP22tg Mutanten nach neunmonatiger CSF1RI Behandlung zu einer signifikanten Reduktion der Makrophagenpopulation (**Abbildung 20B**).

3.3.2 Ultrastrukturelle Untersuchungen zeigen keinen Effekt der CSF1RI Behandlung

PMP22tg Tiere zeigen bereits im Alter von 2 Monaten charakteristische Veränderungen in ultrastrukturellen Untersuchungen, welche bis zum Alter von 12 Monaten deutlich zunahmten. Dies sind vor allem abnormal myelinisierte Axone (de-/ dünn- und hypermyelinisierte Axone) sowie Zwiebelschalenbildung (Huxley et al., 1998; Kobsar et al., 2005).

Im Gegensatz zu den anderen beiden beschriebenen Genotypen konnte in PMP22tg Mutanten überraschenderweise kein positiver Effekt nach CSF1RI Behandlung in elektronenmikroskopischen Analysen beobachtet werden (**Abbildung 21A**), da nach Quantifizierung der abnormal myelinisierten Axone kein Unterschied zu gleichaltrigen unbehandelten Mutanten nachweisbar war (**Abbildung 21B**).

Periaxonale Vakuolen und regenerative axonale Bündel fanden sich nur bei weit weniger als 1% der untersuchten Axone (Daten nicht gezeigt) und sind kein typisches Merkmal dieses Genotyps.

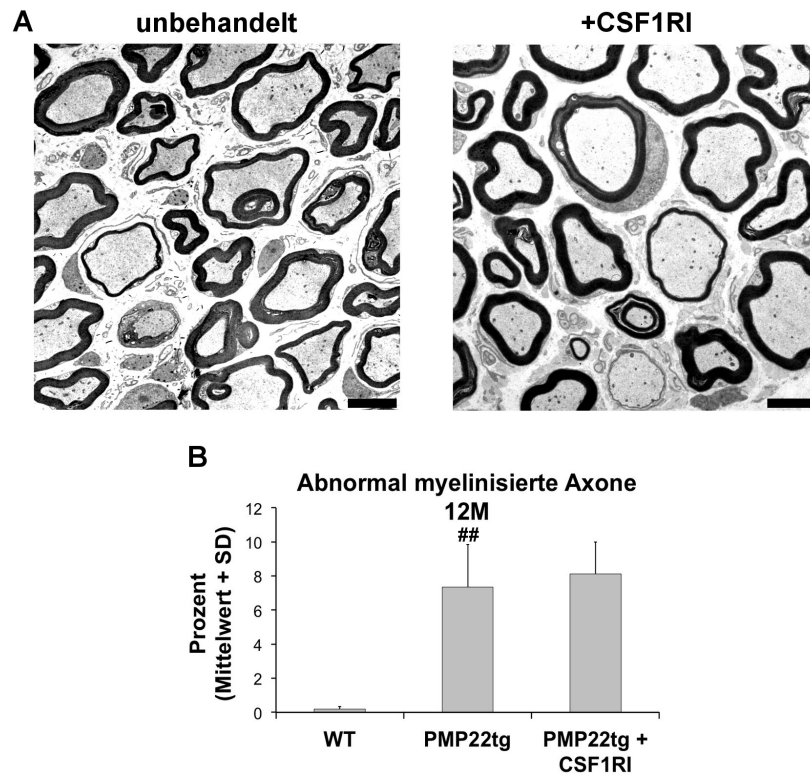


Abbildung 21 Keine verringerte Demyelinisierung im Nervus Quadriceps 12 Monate alter PMP22tg Mutanten nach CSF1RI Behandlung. (A) Elektronenmikroskopische Darstellung des N. Quadriceps 12 Monate alter PMP22tg Mutanten, ohne (links) und nach (rechts) neunmonatiger CSF1RI Behandlung. Maßstab = 5µm. (Modifiziert entnommen aus (Klein et al., 2015b)) (B) Quantifizierung abnormal myelinisierter Axone in Querschnitten des N. Quadriceps von 12 Monate alten Wildtypen und P0het Tieren ohne und nach neunmonatiger CSF1RI Behandlung. Der Anteil de- und dünnmyelinisierter Fasern ist in PMP22tg gegenüber Wildtypen deutlich erhöht. Es kann kein Effekt der CSF1RI Behandlung auf die Anzahl abnormal myelinisierter Axone in 12 Monate alten PMP22tg Mutanten beobachtet werden. [unbehandelt: Wildtyp n = 4; PMP22tg n = 4; behandelt: PMP22tg n = 4; # = signifikanter Unterschied zu unbehandelten Wildtypen]

Auch die Auswertung lumbaler Vorderwurzeln bestätigte die in den peripheren Nerven gemachten Beobachtungen. Repräsentative Semidünnschnitte der Vorderwurzeln von CSF1RI behandelten PMP22tg Mutanten unterschieden sich nicht von denen unbehandelter Tiere (**Abbildung 22A**). Auch nach Quantifizierung der abnormal myelinisierten Fasern in elektronenmikroskopischen Aufnahmen konnte kein Effekt beobachtet werden (**Abbildung 22B**).

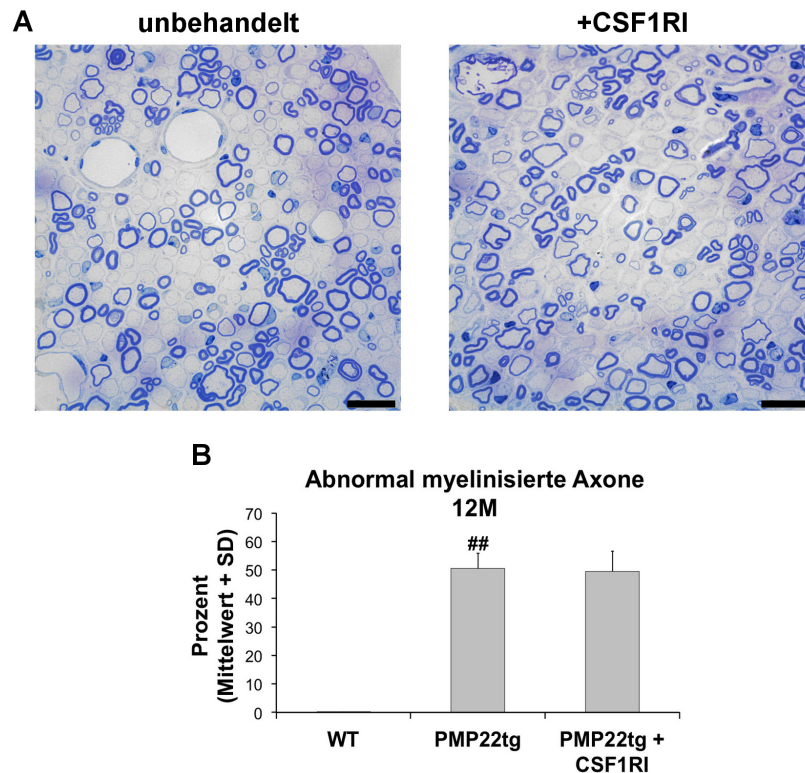


Abbildung 22 Keine verringerte Demyelinisierung in lumbalen Vorderwurzeln 12 Monate alter PMP22tg Mutanten nach CSF1RI Behandlung. (A) Lichtmikroskopische Darstellung von Semi-dünnschnitten lumbaler Vorderwurzeln 12 Monate alter PMP22tg Tiere, ohne (links) und nach (rechts) neunmonatiger CSF1RI Behandlung. Maßstab = 10µm. (B) Quantifizierung abnormal myelinisierter Axone in elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Querschnitten lumbaler Vorderwurzeln 12 Monate alter Wildtypen und PMP22tg Tieren ohne und nach neunmonatiger CSF1RI Behandlung. Der Anteil de- und dünnmyelinisierter Fasern ist in PMP22tg gegenüber Wildtypen deutlich erhöht. Nach neunmonatiger CSF1RI Behandlung zeigt sich die Anzahl abnormal myelinisierter Fasern im Vergleich zu unbehandelten Tieren unverändert groß. [unbehandelt: Wildtyp n = 4; PMP22tg n = 4; behandelt: PMP22tg n = 4; # = signifikanter Unterschied zu unbehandelten Wildtypen]

3.3.3 Keine Verbesserung funktioneller Parameter nach CSF1RI Behandlung

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der ultrastrukturellen Untersuchungen konnte auch in den elektrophysiologischen Messungen kein Effekt der CSF1RI Behandlung in PMP22tg Mutanten nachgewiesen werden.

Die in 12 Monate alten PMP22tg Mutanten gegenüber gleichaltrigen Wildtypen verringerten Amplituden der Muskelsummenaktionspotentiale sowie die deutlich langsameren Nervenleit-

geschwindigkeiten und verlängerten F-Wellen-Latenzen blieben auch nach neunmonatiger CSF1RI Behandlung unverändert schlecht (**Abbildung 23 A,B,C,D**).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass im Gegensatz zu Cx32def und P0het Tieren, trotz robuster Makrophagenreduktion, kein Effekt der CSF1RI Behandlung auf ultrastrukturelle oder funktionelle Parameter in PMP22tg Mutanten beobachtet werden konnte.

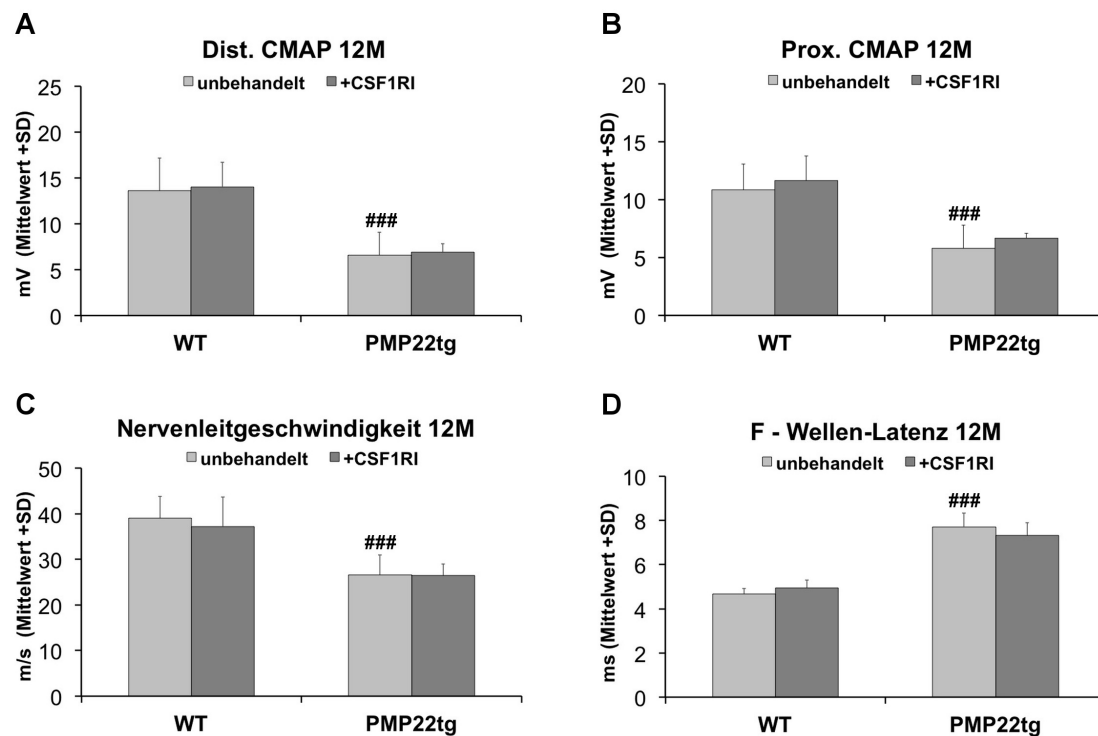


Abbildung 23 Keine verbesserten neurophysiologischen Parameter in 12 Monate alten PMP22tg Mutanten nach CSF1RI Behandlung. (A,B) Ableitung von Muskelsummenaktionspotentialen an den Fußmuskeln nach distaler (A) und proximaler (B) supramaximaler Stimulation des Nervus Ischiadicus bei 12 Monate alten Wildtypen und PMP22tg Mutanten, jeweils ohne und nach neunmonatiger CSF1RI Behandlung. PMP22tg Tiere zeigen deutlich verringerte Amplituden gegenüber Wildtypen. Behandelte und unbehandelte Mutanten sind hierbei nicht voneinander zu unterscheiden. (C) Errechnung der Nervenleitgeschwindigkeit des Nervus Ischiadicus nach supramaximaler proximaler und distaler Stimulation von Wildtypen und PMP22tg Mutanten, jeweils ohne und nach neunmonatiger CSF1RI Behandlung. Die Nervenleitgeschwindigkeit in PMP22tg Tieren ist im Vergleich zu Wildtypen deutlich verringert. Die CSF1RI Behandlung zeigt keinen Effekt auf die Nervenleitgeschwindigkeit. (D) Ableitung der F-Wellen-Latenz des Nervus Ischiadicus von Wildtypen und PMP22tg Mutanten, jeweils ohne und nach neunmonatiger CSF1RI Behandlung. Die F-Wellen-Latenzen ist in PMP22tg Tieren gegenüber Wildtypen verlängert und bleibt auch nach CSF1RI Behandlung unverändert. [unbehandelt: Wildtyp n = 6; PMP22tg n = 7; behandelt: Wildtyp n = 5; PMP22tg n = 5; # = signifikanter Unterschied zu unbehandelten Wildtypen]

4. Diskussion

4.1 Reduktion der sekundären Entzündungsreaktion unter CSF1RI Behandlung

In allen drei in dieser Studie untersuchten CMT 1 Mausmodellen (Cx32def, P0het, PMP22tg) sowie in Wildtypen konnte unter CSF1RI Behandlung eine effektive Reduktion der endoneuralen Makrophagenanzahl um ca. 70% nachgewiesen werden. Diese zeigte sich sowohl bei frühem Therapiestart im Alter von 3 Monaten, als auch bei spätem Start im Alter von 9 Monaten. Ursächlich scheinen hier am ehesten, neben einer verminderten Proliferation, vermehrt ablaufende Apoptosevorgänge zu sein, da in immunhistochemischen Färbungen von Quadricepsnerven behandelter Mäuse eine erhöhte Anzahl F4/80 positiver Zellfragmente auffiel (Daten nicht gezeigt). Dies steht im Einklang mit Beobachtungen aus Studien, welche den Effekt eines CSF1RI (PLX3397) auf Mikroglia untersuchten. Hier konnte in behandelten Mäusen neben einer deutlichen Reduktion der Mikroglia eine Hochregulation des Apoptosemarkers Caspase 3 nachgewiesen werden (Elmore et al., 2014).

Weiterhin zeigte sich unter CSF1RI Behandlung interessanterweise eine stärkere Reduktion der Makrophagenanzahl als in osteopetrotischen Mäusen, welche durch eine spontane Nullmutation im *Csf-1* Gen das Zytokin nicht exprimieren können (Yoshida et al., 1990). Bei diesen osteopetrotischen Mäusen sowie in mit den oben verwendeten CMT 1 Modellen gekreuzten Doppelmutanten bleibt trotz CSF-1 Defizienz immer eine geringe Anzahl endoneuraler Makrophagen erhalten (Carenini et al., 2001; Groh et al., 2012). Während bei osteopetrotischen Mäusen die fehlende Stimulation durch CSF-1 lediglich zu einer verminderten Proliferation und Aktivierung der Makrophagen führt (Muller et al., 2007), scheinen unter CSF1RI Behandlung die oben genannten Apoptosevorgänge zusätzlich zur Depletion der Makrophagenpopulation beizutragen. Ausschlaggebend ist hier vermutlich die komplette Blockierung des CSF-1-Rezeptors bei Mäusen unter CSF1RI Behandlung, während bei osteopetrotischen Tieren der Rezeptor von anderen Liganden weiterhin besetzt werden kann. Hier könnte vor allem Interleukin-34 (IL-34) eine wichtige Rolle spielen, da es als alternativer Ligand des CSF-1-Rezeptors in Abwesenheit von CSF-1 nachweislich zu Proliferation und Überleben von Makrophagen beitragen kann (Wei et al., 2010; Wang and Colonna, 2014).

4.2 CMT 1X: Verbesserung histopathologischer und funktioneller Parameter in Cx32def Mäusen unter CSF1RI Behandlung

Der deutlichste Effekt der CSF1RI Behandlung konnte in Cx32def Mutanten nach präventiver Therapie beobachtet werden. Bereits nach 3 Monaten Inhibitortherapie zeigte sich histologisch, wie auch bei funktionellen Parametern, ein signifikanter Effekt, welcher sich nach 9 Monaten Therapie sogar noch verstärkte. Neben der in allen Genotypen deutlich reduzierten Makrophagenpopulation unter CSF1RI Behandlung, fiel bei Cx32def Mäusen vor allem eine Verringerung des axonalen Schadens sowie eine verbesserte nervale Regeneration auf. Dies äußerte sich elektronenmikroskopisch in einer geringeren Anzahl periaxonaler Vakuolen, einer größeren Anzahl regenerativer axonaler Bündel sowie einer vermehrten Anzahl an Axonen pro Regenerationsbündel. Elektrophysiologisch zeigten sich verbesserte CMAPs. Diese axonale Protektion spiegelte sich auch im Erhalt der neuromuskulären Innervation sowie in einer gesteigerten Greifkraft wieder, welche als klinischer Parameter eine besondere Relevanz für betroffene Patienten besitzt.

Bezüglich des Myelinerhalts können keine eindeutigen Schlussfolgerungen gezogen werden. Zwar zeigten sich die Nervenleitgeschwindigkeiten der behandelten Mutanten verbessert, jedoch konnte in den untersuchten Querschnitten peripherer Nerven kein passendes Korrelat gefunden werden. Die Anzahl de- und dünnmyelinisierter Axone war unter CSF1RI Behandlung unverändert groß. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass Veränderungen proximal oder distal der untersuchten Abschnitte für diese Beobachtungen verantwortlich sind. Weiterhin könnten auch andere Parameter, welche in dieser Studie nicht untersucht wurden, eine Rolle spielen. Frühere Studien zeigten beispielsweise, dass Cx32def Mutanten eine abnorme Verteilung juxtapanodaler spannungsgesteuerter Kaliumkanäle aufweisen, welche in osteopetroischen Cx32def Mutanten deutlich geringer ausgeprägt ist (Groh et al., 2012).

Generell ist der starke Myelinverlust unter oraler CSF1RI Behandlung eine überraschende Beobachtung, da dieser in osteopetroischen Cx32def Doppelmutanten durch die genetische CSF-1 Defizienz nahezu verhindert wird (Groh et al., 2012). Die orale CSF1RI Therapie hingegen wirkt, wie oben beschrieben, eher hinsichtlich eines verringerten axonalen Schadens und einer verbesserten Regeneration mittels axonaler Aussprossungen. Dies ist möglicherweise auf einen zu späten Therapiestart zurückzuführen. Cx32def Mutanten zeigen bereits im

Alter von 3 Monaten einen deutlichen Verlust der Myelinintegrität und Zeichen der Dedifferenzierung mit einer für diesen Genotyp typischen c-Jun Aktivierung in den Schwann-Zellen und erhöhter GDNF Expression (Klein et al., 2014). Die CSF1RI bedingte Reduktion der Makrophagen kommt somit möglicherweise zu spät, um die bereits induzierte Demyelinisierung zu verhindern, wirkt sich jedoch positiv auf die für diesen Mutanten typische Fähigkeit zur Bildung regenerativer axonaler Bündel aus und reduziert den axonalen Schaden.

Mit einem zu späten Therapiestart ist somit vermutlich auch der fehlende Effekt bei dem therapeutischen Therapieansatz zu erklären. Bei einem Behandlungsstart im Alter von 9 Monaten sind die typischen Pathologien schon vollständig ausgeprägt (Anzini et al., 1997; Martini, 1997)

Zusammenfassend konnte durch die präventive CSF1RI Behandlung eine effektive Reduktion der endoneuralen Makrophagen in Cx32def Mutanten erreicht werden mit darauffolgender Verringerung des axonalen Schadens und Verbesserung der regenerativen Fähigkeiten. Dies führte zu einem Erhalt funktioneller Parameter wie der Greifkraft, welche besonders hervorzuheben ist, da der klinische Effekt letztendlich die größte Relevanz für betroffene Patienten hat.

4.3 CMT 1B: Teilweise Verbesserung histopathologischer und funktioneller Parameter in P0het Mäusen unter CSF1RI Behandlung

Auch in P0het Tieren konnte ein Effekt bezüglich struktureller und funktioneller Parameter nach neunmonatiger CSF1RI Behandlung beobachtet werden, wenngleich sich dieser deutlich von den Ergebnissen in Cx32def Mutanten unterscheidet. Während es im Modell für CMT 1X unter CSF1RI Therapie vor allem zu einer Prävention des axonalen Schadens und einer Verstärkung der Regenerationsfähigkeit kam, zeigte sich im Tiermodell für CMT 1B hauptsächlich ein Erhalt der Myelinscheiden. Ultrastrukturell fiel in Quadricepsnerven wie auch in Spinalwurzeln eine verringerte Anzahl de- und dünnmyelinisierter Axone auf. Axonale Vakuolen und Regenerationsbündel hingegen waren nur in sehr geringer Menge vorhanden und zeigten kein Ansprechen auf CSF1RI Behandlung. Dies spiegelte sich auch in den elektrophysiologischen Untersuchungen wider. Die in P0het Mutanten typischerweise betroffenen Parameter wie F-Wellen-Latenz und Nervenleitgeschwindigkeit (Shy et al., 1997) zeigten sich signifikant verbessert, ebenso wie die Muskelsummenaktionspotentiale. Letztendlich führte der ge-

ringere Myelinverlust ebenfalls zu einem Erhalt der neuromuskulären Innervation und einer verbesserten Greifkraft.

Generell fiel bei der Auswertung der P0het Mutanten eine enorme phänotypische Variabilität auf. Die ultrastrukturellen Untersuchungen der Quadricepsnerven zeigten einen Anteil abnormal myelinisierter Axone zwischen 6% und 40%. Eine damit übereinstimmende Streuung der Werte konnte ebenfalls bei der neuromuskulären Innervation sowie in den Tests der Greifkraft beobachtet werden. Hierdurch konnten zwar Trends zur Verbesserung unter CSF1RI Behandlung beobachtet werden, signifikante Ergebnisse wurden aber durch die Streuung der Werte verhindert.

Bei genauer Betrachtung fiel jedoch auf, dass sowohl in der Gruppe der behandelten wie auch der unbehandelten Mutanten eine konstante Population nur sehr gering betroffener Tiere vorhanden war, die besonders stark betroffenen Individuen allerdings nach CSF1RI Behandlung nicht mehr nachweisbar waren. Die Therapie schien somit vor allem die besonders schweren Verlaufsformen positiv zu beeinflussen.

Die Effektivität der Therapie in diesen zwei genetisch unterschiedlichen als auch durch verschiedene histologische Charakteristika geprägten Mausmodellen unterstreicht weiterhin deutlich die Relevanz der sekundären Entzündungsreaktion als gemeinsamen Pathomechanismus verschiedener CMT 1 Formen (Martini and Willison, 2016).

4.4 CMT 1A: Keine Verbesserung der pathologischen Charakteristika in PMP22tg Mäusen unter CSF1RI Behandlung

Im Unterschied zu den Untersuchungen mit Cx32def und P0het Mutanten konnte bei PMP22tg Mutanten kein Effekt der CSF1RI Behandlung nachgewiesen werden. Trotz einer effektiven Reduktion der Makrophagenpopulation, zeigte sich in elektronenmikroskopischen Untersuchungen von Quadricepsnerven und Spinalwurzeln kein Unterschied bezüglich des Myelinverlusts zwischen behandelten und unbehandelten Mutanten. In Übereinstimmung mit diesen Beobachtungen konnte auch in elektrophysiologischen Messungen keine Verbesserung der NLG's oder CMAPs beobachtet werden. Diese Ergebnisse überraschen, bedenkt man, dass in PMP22tg Mutanten mit verringerter MCP-1 Produktion und konsekutiv verringerter Makrophagenpopulation ein Erhalt der Myelinscheiden sowie verbesserte funktionelle Parameter nachgewiesen werden konnten (Kohl et al., 2010). Weiterhin zeigten sich auch in oste-

opetrotischen PMP22tg Doppelmutanten ähnliche histopathologische Verbesserungen in den Spinalwurzeln (Groh, Klein und Martini, unpublizierte Daten).

Dieses fehlende Ansprechen auf die CSF1RI Behandlung ist möglicherweise durch den Zeitpunkt des Behandlungsbeginns zu erklären. Schwann-Zellen PMP22tg Mutanten zeigen bereits im Alter von einem Monat eine deutliche Hochregulierung des Dedifferenzierungsmarkers NCAM (Neurales Zelladhäsionsmolekül) (Klein et al., 2014). Weiterhin können schon bei zwei Monate alten Mutanten deutlich vermehrt de- und dünnmyelinisierte Axone sowie eine vergrößerte Anzahl endoneuraler Makrophagen nachgewiesen werden (Kobsar et al., 2005). Dies steht im Unterschied zu P0het und Cx32def Mutanten, welche eine erst mit dem Alter zunehmende Makrophagenanzahl zeigen und Zeichen der Myelinschädigung teilweise erst deutlich später detektierbar sind (Martini et al., 1995; Anzini et al., 1997; Carenini et al., 2001; Groh et al., 2010). Der Therapiestart im Alter von 3 Monaten ist für PMP22tg Mutanten somit womöglich bereits zu spät, um effektiv in den Pathogeneseprozess einzugreifen. Diese Annahme wird durch Beobachtungen bei PMP22tg Mutanten unterstützt, welche bereits ab der Geburt eine CSF1RI Behandlung über die säugende Mutter erhielten. Hier konnten sowohl funktionelle wie auch strukturelle Verbesserungen nachgewiesen werden (Klein und Martini, unpublizierte Daten). Auch Behandlungsstudien mit Neuregulin an einem Rattenmodell für CMT 1A unterstreichen diese These. Die Therapie zeigte lediglich Effekte, wenn vor dem postnatalen Tag 18 begonnen wurde oder eine genetische Überexpression des Proteins vorlag (Fledrich et al., 2014).

Interessanterweise verstärkt Neuregulin die Schwannzellendifferenzierung durch Aktivierung des PI3K-Akt Signalwegs und Hemmung der MEK/ERK Signalkaskade. Der MEK/ERK Signalweg ist hierbei, wie oben beschrieben, verantwortlich für die MCP-1 assoziierte Makrophagenmigration und Rekrutierung. Weiterhin konnte bei Hemmung desselbigen ein positives Ansprechen struktureller und funktioneller Parameter in PMP22tg Mutanten beobachtet werden (Fischer et al., 2008b; Fischer et al., 2008a; Groh et al., 2010; Kohl et al., 2010). Inwiefern Neuregulin durch die Hemmung des MEK/ERK Signalweges Einfluss auf die sekundäre Entzündungsreaktion nimmt und wie relevant dieser Effekt für die Wirkung der Neuregulintherapie ist, sind somit interessante Fragestellungen, deren Beantwortung noch aussteht. Neue Studien konnten jedoch bereits Makrophagen als wichtige Mediatoren der Dedifferenzierung im Cx32def Mausmodell identifizieren (Groh et al., 2015).

4.5 CSF1RI als mögliches Therapeutikum für CMT 1 Neuropathien

Charcot-Marie-Tooth Neuropathien sind mit einer Prävalenz von 1:2500 die häufigsten hereditären Erkrankungen des peripheren Nervensystems (Skre, 1974; Emery, 1991). Trotz intensiver Fortschritte in den letzten Jahren bezüglich des Verständnisses der Pathogenese und einer Vielzahl an suffizienten Tiermodellen, gibt es bis heute keine effektive Therapie. Diese beschränkt sich häufig auf Physiotherapie und rehabilitative Maßnahmen, oft jedoch ohne ausreichende klinische Evidenz (Schenone et al., 2011). Insbesondere die enorme genetische Heterogenität der einzelnen Subtypen (Timmerman et al., 2014) scheint einen übergreifenden Behandlungsansatz zu erschweren.

Unterschiedliche spezifische Therapien mit Ascorbinsäure (Passage et al., 2004), Progesteronrezeptorantagonisten (Sereda et al., 2003), Neutrophin-3 (Sahenk et al., 2005; Sahenk et al., 2014), Cucurmin (Khajavi et al., 2007; Patzko et al., 2012) und intermittierendem Fasten (Madorsky et al., 2009) zeigten zwar teilweise positive Effekte in Tiermodellen (Fledrich et al., 2012), konnten in klinischen Studien jedoch nicht bestätigt werden, oder sind aufgrund großer Nebenwirkungen nicht für diese geeignet (Pleasure and Chance, 2005; Burns et al., 2009; Micallef et al., 2009; Verhamme et al., 2009; Pareyson et al., 2011).

Umso bedeutender scheint somit die sekundäre Entzündungsreaktion, speziell die Rolle der Makrophagen, zu sein, welche für verschiedene Subtypen, trotz unterschiedlicher genetischer Ursache, gleichermaßen als wichtiger Mediator des neuralen Schadens identifiziert werden konnte (Martini and Willison, 2016) und somit einen subtypübergreifenden Angriffspunkt ermöglicht.

In dieser Studie konnten wir in Mausmodellen für die Subtypen CMT 1X und CMT 1B durch eine CSF1RI vermittelte Reduktion der endoneuralen Makrophagenanzahl positive Effekte sowohl in strukturellen als auch in funktionellen Parametern nachweisen. Essentiell scheint hierbei ein möglichst früher Therapiestart zu sein. Cx32def Tiere zeigten lediglich bei einem Therapiestart im Alter von drei Monaten Verbesserungen, nicht jedoch bei einem Therapiestart im Alter von neun Monaten. Zudem konnten bei PMP22tg Mutanten keine Effekte unter den in dieser Arbeit verwendeten Therapieprotokollen beobachtet werden. Jedoch zeigten bereits ab der Geburt behandelte Tiere Verbesserungen in strukturellen und funktionellen Parametern (Klein und Martini, unpubliziert).

Weiterhin deuten Beobachtungen darauf hin, dass für einen effektiven Nervenerhalt eine dauerhafte Therapie notwendig ist. Erste Ergebnisse von Cx32def Mutanten, welche im Alter von

drei bis sechs Monaten behandelt wurden, unterschieden sich im Alter von 12 Monaten bezüglich der Anzahl endoneuraler Makrophagen und der funktionellen Ergebnisse nicht von unbehandelten Mutanten (Klein und Ostertag und Martini, unpublizierte Daten). Auch konnte nach Absetzen der Therapie in Wildtypen ein Wiederanstieg der endoneuralen Makrophagenanzahl auf Werte unbehandelter Wildtypen innerhalb von 14 Tagen beobachtet werden (Klein und Martini, unpublizierte Daten).

In Bezug auf die klinische Anwendung müssen somit insbesondere die Nebenwirkungen einer in der frühen Kindheit beginnenden und möglicherweise lebenslang andauernden Behandlung den Folgen einer unbehandelten CMT 1 Neuropathie gegenübergestellt werden, welche zwar zu einer Einschränkung der Lebensqualität, nicht jedoch zu einer Verkürzung der Lebenserwartung führen.

Während wir keine offensichtlichen Nebenwirkungen bezüglich Gewicht und Fellqualität beobachten konnten, zeigte sich in Übereinstimmung mit Elmore et al. (2014) eine Reduktion der Mikroglia um ca. 50% (Klein und Schreiber und Martini, unpublizierte Daten) unter CSF1RI Behandlung. Dies muss besonders kritisch betrachtet werden, da in Studien eine wichtige Funktion der Mikroglia sowohl in der Entwicklung des ZNS wie auch in der Aufrechterhaltung der Homöostase im adulten ZNS nachgewiesen werden konnte (Hagemeyer et al., 2017; Kierdorf and Prinz, 2017). Ebenso zeigen CSF-1-Rezeptor defiziente Mäuse neben einer Reduktion der Mikroglia um ca. 94% eine Atrophie des Bulbus olfactorius, eine Erweiterung der Seitenventrikel sowie eine Ausdünnung des Neokortexes (Chitu et al., 2016).

Weiterhin wurden verschiedene Effekte außerhalb des ZNS bei Blockade der CSF-1/CSF1R Achse beschrieben. Dabei scheint insbesondere eine Störung der CSF-1/CSF1R Achse während der Entwicklung kritisch und kann im Mausmodell unter anderem zu Wachstumsstörungen, Unfruchtbarkeit, verringerter Lebergröße sowie zu Depletion von Kupffer-Zellen, Paneth-Zellen und Osteoklasten führen (Sweet and Hume, 2003; Chitu and Stanley, 2006; Pollard, 2009; Sauter et al., 2014). Die Blockade des CSF1R ist hingegen bereits Teil diverser klinischer Studien in der Krebstherapie, wie zum Beispiel bei Patienten mit malignem Melanom und verschiedenen Weichteiltumoren. In Phase 1 und 2 Studien wurde die Blockade der CSF-1/CSF1R Achse durch kleinmolekulare Inhibitoren gut toleriert (Cannarile et al., 2017).

Um Nebenwirkungen zu minimieren, wäre somit die Verwendung eines Inhibitors, welcher nicht in der Lage ist die Blut-Hirn-Schranke zu durchdringen, essentiell. Weiterhin könnte spezifischer in den CSF-1/CSF1R Signalweg eingegriffen werden. Studien haben gezeigt, dass insbesondere die von Fibroblasten sezernierte lösliche CSF-1 Isoform (spCSF-1) für die Aktivierung der Makrophagen und den assoziierten neuralen Schaden verantwortlich ist. Die

von Makrophagen exprimierte und an die Zelloberfläche gebundene CSF-1 Isoform (csCSF-1) hingegen scheint eher eine protektive Funktion zu haben (Groh et al., 2016). Mit einem gegen die lösliche Isoform gerichteten Antikörper könnte somit beispielsweise die ausschlaggebende Isoform neutralisiert werden, ohne die Interaktion des CSF-1-Rezeptors mit anderen Liganden wie IL-34 oder csCSF-1 zu beeinflussen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die CSF1RI Behandlung einen möglichen effektiven subtypübergreifenden Behandlungsansatz bietet, aufgrund des nötigen sehr frühen Therapiestarts und der wahrscheinlich lebenslangen Therapie muss jedoch eine hohe klinische Sicherheit des Inhibitors gewährleistet sein, bevor ein klinischer Einsatz in Erwägung gezogen werden kann.

5. Zusammenfassung

Charcot-Marie-Tooth Neuropathien sind die häufigsten hereditären Erkrankungen des peripheren Nervensystems und dennoch bis heute nicht therapierbar. Die Lebensqualität der Patienten ist durch motorische und sensorische Defizite der Extremitäten häufig stark eingeschränkt. Ursache können unter anderem Mutationen in Schwann-Zellen sein, die zu dem typischen Bild von Demyelinisierung und axonalem Schaden führen. In den letzten Jahren konnte in Mausmodellen das Immunsystem als wichtiger Mediator in der Pathogenese der CMT 1 Subtypen A, B und X identifiziert werden. Insbesondere Makrophagen spielen eine tragende Rolle bei dem Verlust der axonalen Integrität, bei der Schädigung der Myelinscheiden, sowie bei der Dedifferenzierung von Schwann-Zellen. Entscheidender Faktor für Proliferation und Aktivierung der Makrophagen ist hierbei das Zytokin CSF-1, dessen korrespondierender Rezeptor auf Makrophagen exprimiert wird. Der CSF-1/CSF1R Signalweg bietet somit einen vielversprechenden Angriffspunkt.

In der vorliegenden Arbeit wurden Mausmodelle der CMT 1 Subtypen A, B und X mit einem niedermolekularen CSF-1-Rezeptor Inhibitor behandelt. Anschließend erfolgte eine funktionelle und strukturelle Auswertung der peripheren Nerven.

Das beste Ansprechen auf die Therapie zeigten Cx32def Mutanten. Strukturell fielen ein verringertes axonales Schaden und eine verbesserte axonale Regenerationsfähigkeit sowie erhaltene neuromuskuläre Synapsen auf. Funktionell äußerte sich dies in verbesserten elektrophysiologischen Parametern und einem Krafterhalt, welcher als klinischer Parameter die größte Relevanz für betroffene Patienten hat und somit besonders hervorzuheben ist.

Auch P0het Mutanten zeigten Verbesserungen nach der CSF1RI Behandlung. Anders als bei Cx32def Tieren zeigte sich hier jedoch vor allem ein Erhalt der Myelinintegrität. Weiterhin wirkte sich die Therapie positiv auf elektrophysiologische Parameter und Krafttests aus. Vor allem besonders stark betroffene Individuen schienen hierbei von der CSF1RI Behandlung zu profitieren.

Bei PMP22tg Mutanten hingegen konnten keine positiven Effekte der CSF1RI Behandlung nachgewiesen werden. Strukturelle und funktionelle Parameter behandelter Tiere unterschieden sich nicht von unbehandelten.

Diese Ergebnisse unterstreichen die Relevanz der sekundären Entzündungsreaktion in CMT 1 Neuropathien als wichtigen Mediator in der Pathogenese. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine Intervention im CSF-1/CSF1R Signalweg einen vielversprechenden möglichen Ansatz für die Therapie der bisher nicht behandelbaren CMT 1 Subtypen X und B darstellt. Un-

ausweichlich ist hierbei ein möglichst früher Therapiestart vor Ausprägung der ersten molekularen und histologischen Veränderungen. Im Hinblick auf die nicht die Lebenserwartung reduzierende Erkrankung muss ferner eine Minimierung der Nebenwirkungen der Therapie gewährleistet sein. Besonders hervorzuheben ist hier die Verwendung eines Inhibitors, welcher nicht in das zentrale Nervensystem vordringen kann und somit die Funktion der Mikroglia nicht beeinträchtigt.

6. Anhang

6.1 Materialien

6.1.1 Technisches Equipment

Cryostat CM3050S	Leica (Wetzlar, Deutschland)
Deckgläschen	R. Langenbrinck (Emendingen, Deutschland)
Elektronenmikroskop Zeiss Leo 906E	Zeiss (Oberkochen, Deutschland)
Elektromyograph Neurosoft-Evidence	Schreiber & Tholen Medizintechnik (Stade, Deutschland)
Filterspitzen	Saarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Gelkammer	Peqlab (Erlangen, Deutschland)
Grip Strength Meter	Columbus Instruments (Columbus, USA)
Kamera ProScan Slow Scan CCD	ProScan (Lagerlechfeld, Deutschland)
Mikroskop Axiophot 2	Zeiss (Oberkochen, Deutschland)
Mikrotom Ultracut E	Reichert und Jung (Nussloch, Deutschland)
Objektträger Superfrost® Plus	R. Langenbrinck (Emendingen, Deutschland)
PapPen	SCI Science Services (München, Deutschland)
Pasteurpipette	Saarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
PCR-Reaktionsgefäße	Saarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Perfusionspumpe Reglo	Ismatec (Glattbrugg, Schweiz)
Pipetten	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Pipettenspitzen	Saarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Reaktionsgefäße	Saarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Software	
Evidence	Schreiber & Tholen Medizintechnik (Stade, Deutschland)
GNU Image Manipulation Programm	The Gimp Team
Image J	NIH (Bethesda, USA)
iTEM	Olympus (Hamburg, Deutschland)

MetaVue	Molecular Devecos (Sunnyvale, USA)
Office 2011	Microsoft (Redmond, USA)
PASW Statistics 18 SPSS	IBM (Ehningen, Deutschland)
SPOT	Diagnostics Instruments (Sterling Heights, USA)
Thermocycler	
Mastercycler Gradient	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Primus96 advanced	Peqlab (Erlangen, Deutschland)
Transformator PowerPac™ HC	Bio-RAD (München, Deutschland)
Trimmer EM Trim	Leica (Wetzlar, Deutschland)
Vortex-Mischer L46	Labinco (Breda, Niederlade)
Zentrifuge	
Biofuge 15R	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Biofuge Pico	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Centrifuge 5424	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)

6.1.2 Reagenzien

Aceton	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
Agarose	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
α -Bungarotoxin AlexaFluor 488 Konjugat	Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)
AmpliTaq DNA Polymerase und Puffer	Applied Biosystems (Darmstadt, Deutschland)
Aqua-Poly/Mount®	Polysciences (Eppelheim, Deutschland)
Avidin-Biotin-Block Kit	Vector Laboratories (Burlingame, USA)
Azur	Applied Biosystems (Darmstadt, Deutschland)
Bleizitrat ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Borsäure	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Bovines Serum-Albumin 96% (BSA)	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
Dimethylethanolamin (DMAE)	Serva Electrophoresis (Heidelberg, Deutschland)
Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
dNTPs	Amersham Bioscience (Piscataway, USA)
Ethanol	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)

Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Formol	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Gel Star DNA-Dye	Lonza (Basel, Schweiz)
Glutaraldehyd	Serva Electrophoresis (Heidelberg, Deutschland)
Heparin	Rationpharm (Ulm, Deutschland)
Kaliumchlorid (KCL)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Ketamin	Pfizer (Berlin, Deutschland)
Methylbutan	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Methylenblau	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Natriumchlorid (NaCl)	Braun (Melsungen, Deutschland)
Nonenyl Succinyl Anhydrid (NSA)	Serva Electrophoresis (Heidelberg, Deutschland)
Osmiumtetroxid	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
Paraformaldehyd (PFA)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Primer	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
Saccharose	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Streptavidin Cy3 (CLCSA 1010)	Biozol (Eching, Deutschland)
Tissue-Tek® O.C.T. Compound	Sakura (Alphan aan den Rijn, Niederlande)
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
TritonX-100	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Vinyl/ERL4221D	Serva Electrophoresis (Heidelberg, Deutschland)
Vitro-Clud®	R. Langenbrinck (Emmendingen, Deutschland)
Xylamin	CP-Pharma (Burgdorf, Deutschland)

6.1.3 Puffer und Lösungen

Anästhetikum	1,2% Ketamin 0,08% Xylamin in 0,9% NaCl-Lösung
Methylenblau	1% Methylenblau 1% Azur 40% Saccharose

	pH 9,2
PBS (1x)	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 1,5 mM KH ₂ PO ₄ 8,1 mM Na ₂ HPO ₄ pH 7,4
PBS/Heparin	0,4% Heparin in 1x PBS
4%PFA / 2%GA / CaCo	4% Paraformaldehyd 2% Glutaraldehyd in 0,1 M CaCo
Spurr's Medium	10g Vinyl/ERL 6g DER 736 26g NSA 0,4g DMAE
TBE	89 mM Tris 89 mM Borat 2mM EDTA pH 0,8

Sofern nicht anders angegeben, wurde destilliertes Wasser als Lösungsmittel verwendet und die Puffer und Lösungen bei Raumtemperatur gelagert.

6.1.4 Primer Sequenzen

Cx32def

CxS 5'-CCA TAA GTC AGG TGT AAA GGA GC -3'

CxAs 5'-AGA TAA GCT GCA GGG ACC ATA GG -3'

CxNEO 5'-ATC ATG CGA AAC GAT CCT CAT CC -3'

P0het

S 1295 5'-TCA GTT CCT TGT CCC CCG CTC TC-3'

AS 1772 5'-ACT TGT CTC TTC TGG GTA ATC AA-3'

AS 1606 5'-GGC TGC AGG GTC GCT CGG TGT TC-3'

PMP22tg

MBA1 5'-AACCGTGAAAAGATGACCC-3'

MBA2 5'-TCG TTG CCA ATA GTG ATG ACC-3'

2F 5'-TCA GGA TAT CTA TCT GAT TCTC-3'

2R 5'-AAG CTCA TGG AGC ACA AAA CC-3'

6.1.5 Antikörper

Primärantikörper

Angriffspunkt	Spezies	Katalognummer	Firma	Verdünnung
CD34	Ratte Anti-Maus	14-0341-85	eBioscience	1:1000
F4/80 (biotinyliert)	Ratte Anti-Maus	MCA497B	Serotec	1:300
Synaptophysin	Meerscheinchchen Anti-Maus	101004	Synaptic Systems	1:500

Sekundärantikörper

Angriffspunkt	Spezies	Katalognummer	Firma	Verdünnung	konjugierter Farbstoff
Ratten IgG	Ziege Anti-Ratte	A11006	Invitrogen	1:300	Alexa Fluor® 488
Meerschweinchchen IgG	Esel Anti-Merschweinchchen	706-165-148	Dianova	1:300	Cy3

6.2 Literaturverzeichnis

- Abrams CK, Oh S, Ri Y, Bargiello TA (2000) Mutations in connexin 32: the molecular and biophysical bases for the X-linked form of Charcot-Marie-Tooth disease. *Brain Res Brain Res Rev* 32:203-214.
- Adlkofer K, Martini R, Aguzzi A, Zielasek J, Toyka KV, Suter U (1995) Hypermyelination and demyelinating peripheral neuropathy in Pmp22-deficient mice. *Nat Genet* 11:274-280.
- Anzini P, Neuberg DH, Schachner M, Nelles E, Willecke K, Zielasek J, Toyka KV, Suter U, Martini R (1997) Structural abnormalities and deficient maintenance of peripheral nerve myelin in mice lacking the gap junction protein connexin 32. *J Neurosci* 17:4545-4551.
- Balice-Gordon RJ, Bone LJ, Scherer SS (1998) Functional gap junctions in the schwann cell myelin sheath. *J Cell Biol* 142:1095-1104.
- Bergoffen J, Scherer SS, Wang S, Scott MO, Bone LJ, Paul DL, Chen K, Lensch MW, Chance PF, Fischbeck KH (1993) Connexin mutations in X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *Science* 262:2039-2042.
- Brennan KM, Bai Y, Shy ME (2015) Demyelinating CMT--what's known, what's new and what's in store? *Neurosci Lett* 596:14-26.
- Burns J, Ouvrier RA, Yiu EM, Joseph PD, Kornberg AJ, Fahey MC, Ryan MM (2009) Ascorbic acid for Charcot-Marie-Tooth disease type 1A in children: a randomised, double-blind, placebo-controlled, safety and efficacy trial. *Lancet Neurol* 8:537-544.
- Cannarile MA, Weisser M, Jacob W, Jegg AM, Ries CH, Ruttinger D (2017) Colony-stimulating factor 1 receptor (CSF1R) inhibitors in cancer therapy. *J Immunother Cancer* 5:53.
- Carenini S, Maurer M, Werner A, Blazyca H, Toyka KV, Schmid CD, Raivich G, Martini R (2001) The role of macrophages in demyelinating peripheral nervous system of mice heterozygously deficient in p0. *J Cell Biol* 152:301-308.
- Chitu V, Stanley ER (2006) Colony-stimulating factor-1 in immunity and inflammation. *Curr Opin Immunol* 18:39-48.
- Chitu V, Gokhan S, Nandi S, Mehler MF, Stanley ER (2016) Emerging Roles for CSF-1 Receptor and its Ligands in the Nervous System. *Trends Neurosci* 39:378-393.

- Dyck PJ (1982) Current concepts in neurology. The causes, classification, and treatment of peripheral neuropathy. *N Engl J Med* 307:283-286.
- Dyck PJ, Lambert EH (1968a) Lower motor and primary sensory neuron diseases with peroneal muscular atrophy. I. Neurologic, genetic, and electrophysiologic findings in hereditary polyneuropathies. *Arch Neurol* 18:603-618.
- Dyck PJ, Lambert EH (1968b) Lower motor and primary sensory neuron diseases with peroneal muscular atrophy. II. Neurologic, genetic, and electrophysiologic findings in various neuronal degenerations. *Arch Neurol* 18:619-625.
- Elmore MR, Najafi AR, Koike MA, Dagher NN, Spangenberg EE, Rice RA, Kitazawa M, Matusow B, Nguyen H, West BL, Green KN (2014) Colony-stimulating factor 1 receptor signaling is necessary for microglia viability, unmasking a microglia progenitor cell in the adult brain. *Neuron* 82:380-397.
- Emery AE (1991) Population frequencies of inherited neuromuscular diseases--a world survey. *Neuromuscul Disord* 1:19-29.
- Fabbretti E, Edomi P, Brancolini C, Schneider C (1995) Apoptotic phenotype induced by overexpression of wild-type *gas3/PMP22*: its relation to the demyelinating peripheral neuropathy CMT1A. *Genes Dev* 9:1846-1856.
- Fischer S, Weishaupt A, Troppmair J, Martini R (2008a) Increase of MCP-1 (CCL2) in myelin mutant Schwann cells is mediated by MEK-ERK signaling pathway. *Glia* 56:836-843.
- Fischer S, Kleinschnitz C, Muller M, Kobsar I, Ip CW, Rollins B, Martini R (2008b) Monocyte chemoattractant protein-1 is a pathogenic component in a model for a hereditary peripheral neuropathy. *Mol Cell Neurosci* 37:359-366.
- Fledrich R, Stassart RM, Sereda MW (2012) Murine therapeutic models for Charcot-Marie-Tooth (CMT) disease. *Br Med Bull* 102:89-113.
- Fledrich R, Stassart RM, Klink A, Rasch LM, Prukop T, Haag L, Czesnik D, Kungl T, Abdelaal TA, Keric N, Stadelmann C, Bruck W, Nave KA, Sereda MW (2014) Soluble neuregulin-1 modulates disease pathogenesis in rodent models of Charcot-Marie-Tooth disease 1A. *Nat Med* 20:1055-1061.
- Fridman V 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.
- Gabreels-Festen AA, Hoogendijk JE, Meijerink PH, Gabreels FJ, Bolhuis PA, van Beersum S, Kulkens T, Nelis E, Jennekens FG, de Visser M, van Engelen BG, Van

- Broeckhoven C, Mariman EC (1996) Two divergent types of nerve pathology in patients with different P0 mutations in Charcot-Marie-Tooth disease. *Neurology* 47:761-765.
- Giambonini-Brugnoli G, Buchstaller J, Sommer L, Suter U, Mantei N (2005) Distinct disease mechanisms in peripheral neuropathies due to altered peripheral myelin protein 22 gene dosage or a Pmp22 point mutation. *Neurobiol Dis* 18:656-668.
- Giese KP, Martini R, Lemke G, Soriano P, Schachner M (1992) Mouse P0 gene disruption leads to hypomyelination, abnormal expression of recognition molecules, and degeneration of myelin and axons. *Cell* 71:565-576.
- Groh J, Basu R, Stanley ER, Martini R (2016) Cell-Surface and Secreted Isoforms of CSF-1 Exert Opposing Roles in Macrophage-Mediated Neural Damage in Cx32-Deficient Mice. *J Neurosci* 36:1890-1901.
- Groh J, Weis J, Zieger H, Stanley ER, Heuer H, Martini R (2012) Colony-stimulating factor-1 mediates macrophage-related neural damage in a model for Charcot-Marie-Tooth disease type 1X. *Brain* 135:88-104.
- Groh J, Klein I, Hollmann C, Wettmarshausen J, Klein D, Martini R (2015) CSF-1-activated macrophages are target-directed and essential mediators of Schwann cell dedifferentiation and dysfunction in Cx32-deficient mice. *Glia* 63:977-986.
- Groh J, Heidl K, Kohl B, Wessig C, Greeske J, Fischer S, Martini R (2010) Attenuation of MCP-1/CCL2 expression ameliorates neuropathy in a mouse model for Charcot-Marie-Tooth 1X. *Hum Mol Genet* 19:3530-3543.
- Guenard V, Montag D, Schachner M, Martini R (1996) Onion bulb cells in mice deficient for myelin genes share molecular properties with immature, differentiated non-myelinating, and denervated Schwann cells. *Glia* 18:27-38.
- Gutmann L, Shy M (2015) Update on Charcot-Marie-Tooth disease. *Curr Opin Neurol*.
- Hagemeyer N, Hanft KM, Akriditou MA, Unger N, Park ES, Stanley ER, Staszewski O, Dimou L, Prinz M (2017) Microglia contribute to normal myelinogenesis and to oligodendrocyte progenitor maintenance during adulthood. *Acta Neuropathol* 134:441-458.
- Hahn AF, Ainsworth PJ, Naus CC, Mao J, Bolton CF (2000) Clinical and pathological observations in men lacking the gap junction protein connexin 32. *Muscle Nerve Suppl* 9:S39-48.
- Harding AE, Thomas PK (1980) The clinical features of hereditary motor and sensory neuropathy types I and II. *Brain* 103:259-280.

- Hayasaka K, Himoro M, Sato W, Takada G, Uyemura K, Shimizu N, Bird TD, Conneally PM, Chance PF (1993) Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 1B is associated with mutations of the myelin P0 gene. *Nat Genet* 5:31-34.
- Huxley C, Passage E, Robertson AM, Youl B, Huston S, Manson A, Saberan-Djoniedi D, Figarella-Branger D, Pellissier JF, Thomas PK, Fontes M (1998) Correlation between varying levels of PMP22 expression and the degree of demyelination and reduction in nerve conduction velocity in transgenic mice. *Hum Mol Genet* 7:449-458.
- Ip C, Kroner A, Fischer S, Berghoff M, Kobsar I, Maurer M, Martini R (2006) Role of immune cells in animal models for inherited peripheral neuropathies. *Neuromolecular Med* 8:175-190.
- Jerath NU, Shy ME (2015) Hereditary motor and sensory neuropathies: Understanding molecular pathogenesis could lead to future treatment strategies. *Biochim Biophys Acta* 1852:667-678.
- Khajavi M, Shiga K, Wiszniewski W, He F, Shaw CA, Yan J, Wensel TG, Snipes GJ, Lupski JR (2007) Oral curcumin mitigates the clinical and neuropathologic phenotype of the Trembler-J mouse: a potential therapy for inherited neuropathy. *Am J Hum Genet* 81:438-453.
- Kierdorf K, Prinz M (2017) Microglia in steady state. *J Clin Invest* 127:3201-3209.
- Klein D, Martini R (2016) Myelin and macrophages in the PNS: An intimate relationship in trauma and disease. *Brain Res* 1641:130-138.
- Klein D, Groh J, Wettmarshausen J, Martini R (2014) Nonuniform molecular features of myelinating Schwann cells in models for CMT1: distinct disease patterns are associated with NCAM and c-Jun upregulation. *Glia* 62:736-750.
- Klein D, Groh J, Weishaupt A, Martini R (2015a) Endogenous antibodies contribute to macrophage-mediated demyelination in a mouse model for CMT1B. *J Neuroinflammation* 12:49.
- Klein D, Patzko A, Schreiber D, van Hauwermeiren A, Baier M, Groh J, West BL, Martini R (2015b) Targeting the colony stimulating factor 1 receptor alleviates two forms of Charcot-Marie-Tooth disease in mice. *Brain*.
- Kobsar I, Maurer M, Ott T, Martini R (2002) Macrophage-related demyelination in peripheral nerves of mice deficient in the gap junction protein connexin 32. *Neurosci Lett* 320:17-20.

- Kobsar I, Hasenpusch-Theil K, Wessig C, Muller HW, Martini R (2005) Evidence for macrophage-mediated myelin disruption in an animal model for Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 1A. *J Neurosci Res* 81:857-864.
- Kobsar I, Berghoff M, Samsam M, Wessig C, Maurer M, Toyka KV, Martini R (2003) Preserved myelin integrity and reduced axonopathy in connexin32-deficient mice lacking the recombination activating gene-1. *Brain* 126:804-813.
- Kohl B, Fischer S, Groh J, Wessig C, Martini R (2010) MCP-1/CCL2 modifies axon properties in a PMP22-overexpressing mouse model for Charcot-Marie-tooth 1A neuropathy. *Am J Pathol* 176:1390-1399.
- Lupski JR, de Oca-Luna RM, Slaugenhaupt S, Pentao L, Guzzetta V, Trask BJ, Saucedo-Cardenas O, Barker DF, Killian JM, Garcia CA, Chakravarti A, Patel PI (1991) DNA duplication associated with Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Cell* 66:219-232.
- Madorsky I, Opalach K, Waber A, Verrier JD, Solmo C, Foster T, Dunn WA, Jr., Notterpek L (2009) Intermittent fasting alleviates the neuropathic phenotype in a mouse model of Charcot-Marie-Tooth disease. *Neurobiol Dis* 34:146-154.
- Martini R (1997) Animal models for inherited peripheral neuropathies. *J Anat* 191 (Pt 3):321-336.
- Martini R, Willison H (2016) Neuroinflammation in the peripheral nerve: Cause, modulator, or bystander in peripheral neuropathies? *Glia* 64:475-486.
- Martini R, Zielasek J, Toyka KV, Giese KP, Schachner M (1995) Protein zero (P0)-deficient mice show myelin degeneration in peripheral nerves characteristic of inherited human neuropathies. *Nat Genet* 11:281-286.
- 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*.
- Micallef J et al. (2009) Effect of ascorbic acid in patients with Charcot-Marie-Tooth disease type 1A: a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Neurol* 8:1103-1110.
- Muller M, Berghoff M, Kobsar I, Kiefer R, Martini R (2007) Macrophage colony stimulating factor is a crucial factor for the intrinsic macrophage response in mice heterozygously deficient for the myelin protein P0. *Exp Neurol* 203:55-62.
- Murphy SM, Laura M, Fawcett K, Pandraud A, Liu YT, Davidson GL, Rossor AM, Polke JM, Castleman V, Manji H, Lunn MP, Bull K, Ramdharry G, Davis M, Blake JC, Houlden H, Reilly MM (2012) Charcot-Marie-Tooth disease: frequency of genetic

- subtypes and guidelines for genetic testing. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 83:706-710.
- Nave KA (2010) Myelination and the trophic support of long axons. *Nat Rev Neurosci* 11:275-283.
- Nelles E, Butzler C, Jung D, Temme A, Gabriel HD, Dahl U, Traub O, Stumpel F, Jungermann K, Zielasek J, Toyka KV, Dermietzel R, Willecke K (1996) Defective propagation of signals generated by sympathetic nerve stimulation in the liver of connexin32-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:9565-9570.
- Niemann A, Berger P, Suter U (2006) Pathomechanisms of mutant proteins in Charcot-Marie-Tooth disease. *Neuromolecular Med* 8:217-242.
- Nolano M, Manganelli F, Provitera V, Pisciotta C, Stancanelli A, Caporaso G, Iodice R, Shy ME, Santoro L (2015) Small nerve fiber involvement in CMT1A. *Neurology* 84:407-414.
- Pareyson D, Scaioli V, Laura M (2006) Clinical and electrophysiological aspects of Charcot-Marie-Tooth disease. *Neuromolecular Med* 8:3-22.
- Pareyson D, Reilly MM, Schenone A, Fabrizi GM, Cavallaro T, Santoro L, Vita G, Quattrone A, Padua L, Gemignani F, Visioli F, Laura M, Radice D, Calabrese D, Hughes RA, Solari A, Cmt T, groups C-T (2011) Ascorbic acid in Charcot-Marie-Tooth disease type 1A (CMT-TRIAAL and CMT-TRAUK): a double-blind randomised trial. *Lancet Neurol* 10:320-328.
- Passage E, Norreel JC, Noack-Fraissignes P, Sanguedolce V, Pizant J, Thirion X, Robaglia-Schlupp A, Pellissier JF, Fontes M (2004) Ascorbic acid treatment corrects the phenotype of a mouse model of Charcot-Marie-Tooth disease. *Nat Med* 10:396-401.
- Patzko A, Shy ME (2011) Update on Charcot-Marie-Tooth disease. *Curr Neurol Neurosci Rep* 11:78-88.
- Patzko A, Bai Y, Saporta MA, Katona I, Wu X, Vizzuso D, Feltri ML, Wang S, Dillon LM, Kamholz J, Kirschner D, Sarkar FH, Wrabetz L, Shy ME (2012) Curcumin derivatives promote Schwann cell differentiation and improve neuropathy in R98C CMT1B mice. *Brain* 135:3551-3566.
- Pleasure DE, Chance PF (2005) Neurotrophin-3 therapy for Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Neurology* 65:662-663.
- Pollard JW (2009) Trophic macrophages in development and disease. *Nat Rev Immunol* 9:259-270.

- Raeymaekers P, Timmerman V, Nelis E, De Jonghe P, Hoogendijk JE, Baas F, Barker DF, Martin JJ, De Visser M, Bolhuis PA, et al. (1991) Duplication in chromosome 17p11.2 in Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 1a (CMT 1a). The HMSN Collaborative Research Group. *Neuromuscul Disord* 1:93-97.
- Reilly MM, Shy ME (2009) Diagnosis and new treatments in genetic neuropathies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 80:1304-1314.
- Sahenk Z, Nagaraja HN, McCracken BS, King WM, Freimer ML, Cedarbaum JM, Mendell JR (2005) NT-3 promotes nerve regeneration and sensory improvement in CMT1A mouse models and in patients. *Neurology* 65:681-689.
- Sahenk Z, Galloway G, Clark KR, Malik V, Rodino-Klapac LR, Kaspar BK, Chen L, Braganza C, Montgomery C, Mendell JR (2014) AAV1.NT-3 gene therapy for charcot-marie-tooth neuropathy. *Mol Ther* 22:511-521.
- 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.
- Sauter KA, Pridans C, Sehgal A, Tsai YT, Bradford BM, Raza S, Moffat L, Gow DJ, Beard PM, Mabbott NA, Smith LB, Hume DA (2014) Pleiotropic effects of extended blockade of CSF1R signaling in adult mice. *J Leukoc Biol* 96:265-274.
- Schenone A, Nobbio L, Monti Bragadin M, Ursino G, Grandis M (2011) Inherited neuropathies. *Curr Treat Options Neurol* 13:160-179.
- Scherer SS, Deschenes SM, Xu YT, Grinspan JB, Fischbeck KH, Paul DL (1995) Connexin32 is a myelin-related protein in the PNS and CNS. *J Neurosci* 15:8281-8294.
- Schmid CD, Stienekemeier M, Oehen S, Bootz F, Zielasek J, Gold R, Toyka KV, Schachner M, Martini R (2000) Immune deficiency in mouse models for inherited peripheral neuropathies leads to improved myelin maintenance. *J Neurosci* 20:729-735.
- Sereda MW, Meyer zu Horste G, Suter U, Uzma N, Nave KA (2003) Therapeutic administration of progesterone antagonist in a model of Charcot-Marie-Tooth disease (CMT-1A). *Nat Med* 9:1533-1537.
- Shy ME (2004) Charcot-Marie-Tooth disease: an update. *Curr Opin Neurol* 17:579-585.
- Shy ME (2006) Peripheral neuropathies caused by mutations in the myelin protein zero. *J Neurol Sci* 242:55-66.
- Shy ME, Arroyo E, Sladky J, Menichella D, Jiang H, Xu W, Kamholz J, Scherer SS (1997) Heterozygous P0 knockout mice develop a peripheral neuropathy that resembles

- chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy (CIDP). *J Neuropathol Exp Neurol* 56:811-821.
- Shy ME, Siskind C, Swan ER, Krajewski KM, Doherty T, Fuerst DR, Ainsworth PJ, Lewis RA, Scherer SS, Hahn AF (2007) CMT1X phenotypes represent loss of GJB1 gene function. *Neurology* 68:849-855.
- Skre H (1974) Genetic and clinical aspects of Charcot-Marie-Tooth's disease. *Clin Genet* 6:98-118.
- Suter U, Scherer SS (2003) Disease mechanisms in inherited neuropathies. *Nat Rev Neurosci* 4:714-726.
- Sweet MJ, Hume DA (2003) CSF-1 as a regulator of macrophage activation and immune responses. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 51:169-177.
- Szigeti K, Lupski JR (2009) Charcot-Marie-Tooth disease. *Eur J Hum Genet* 17:703-710.
- Thomas PK, Calne DB, Stewart G (1974) Hereditary motor and sensory polyneuropathy (peroneal muscular atrophy). *Ann Hum Genet* 38:111-153.
- Timmerman V, Strickland AV, Zuchner S (2014) Genetics of Charcot-Marie-Tooth (CMT) Disease within the Frame of the Human Genome Project Success. *Genes (Basel)* 5:13-32.
- Verhamme C, de Haan RJ, Vermeulen M, Baas F, de Visser M, van Schaik IN (2009) Oral high dose ascorbic acid treatment for one year in young CMT1A patients: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase II trial. *BMC Med* 7:70.
- Wang Y, Colonna M (2014) Interleukin-34, a cytokine crucial for the differentiation and maintenance of tissue resident macrophages and Langerhans cells. *Eur J Immunol* 44:1575-1581.
- Wei S, Nandi S, Chitu V, Yeung YG, Yu W, Huang M, Williams LT, Lin H, Stanley ER (2010) Functional overlap but differential expression of CSF-1 and IL-34 in their CSF-1 receptor-mediated regulation of myeloid cells. *J Leukoc Biol* 88:495-505.
- Willecke K, Eiberger J, Degen J, Eckardt D, Romualdi A, Guldenagel M, Deutsch U, Sohl G (2002) Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome. *Biol Chem* 383:725-737.
- Williams LL, Shannon BT, O'Dougherty M, Wright FS (1987) Activated T cells in type I Charcot-Marie-Tooth disease: evidence for immunologic heterogeneity. *J Neuroimmunol* 16:317-330.

- Wrabetz L, Feltri ML, Quattrini A, Imperiale D, Previtali S, D'Antonio M, Martini R, Yin X, Trapp BD, Zhou L, Chiu SY, Messing A (2000) P(0) glycoprotein overexpression causes congenital hypomyelination of peripheral nerves. *J Cell Biol* 148:1021-1034.
- Yin X, Kidd GJ, Wrabetz L, Feltri ML, Messing A, Trapp BD (2000) Schwann cell myelination requires timely and precise targeting of P(0) protein. *J Cell Biol* 148:1009-1020.
- Yoshida H, Hayashi S, Kunisada T, Ogawa M, Nishikawa S, Okamura H, Sudo T, Shultz LD, Nishikawa S (1990) The murine mutation osteopetrosis is in the coding region of the macrophage colony stimulating factor gene. *Nature* 345:442-444.
- Zhou L, Griffin JW (2003) Demyelinating neuropathies. *Curr Opin Neurol* 16:307-313.
- Zielasek J, Martini R, Toyka KV (1996) Functional abnormalities in P0-deficient mice resemble human hereditary neuropathies linked to P0 gene mutations. *Muscle Nerve* 19:946-952.

6.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Typische klinische Ausprägung von CMT Neuropathien.....	1
Abbildung 2	Pathogenesemodell der CMT 1 Neuropathien.....	9
Abbildung 3	Reduktion der Makrophagenanzahl im Nervus Quadriceps nach präventiver (6 und 12 Monate alt) und therapeutischer (15 Monate alt) CSF1RI Behandlung.....	19
Abbildung 4	Leicht verringerter axonaler Schaden und verstärkte Regeneration im Nervus Quadriceps 6 Monate alter Cx32def Mutanten nach präventiver CSF1RI Behandlung.....	21
Abbildung 5	Verringerter axonaler Schaden und verstärkte Regeneration im Nervus Quadriceps 12 Monate alter CX32def Mutanten nach präventiver CSF1RI Behandlung.....	22
Abbildung 6	Repräsentatives regeneratives Bündel eines 12 Monate alten behandelten Tieres mit 10 axonalen Aussprossungen.....	23
Abbildung 7	Verringerter axonaler Schaden und verbesserte Myelinintegrität in lumbalen Vorderwurzeln 12 Monate alter Cx32def Mutanten nach präventiver CSF1RI Behandlung...24	24
Abbildung 8	Keine Verbesserung des axonalen Schadens und der regenerativen Parameter im Nervus Quadriceps 15 Monate alter C32def Mutanten nach therapeutischer CSF1RI Behandlung.....	25
Abbildung 9	Verringerter Verlust der neuromuskulären Innervation in Fußmuskeln 12 Monate alter Cx32def Mutanten nach präventiver CSF1RI Behandlung.....	26
Abbildung 10	Verbesserte Amplituden der CMAPs und Nervenleitgeschwindigkeiten in 6 Monate alten CX32def Mutanten nach präventiver CSF1RI Behandlung.....	28
Abbildung 11	Verbesserte Amplituden der CMAPs und Nervenleitgeschwindigkeiten in 12 Monate alten Cx32def Mutanten nach präventiver CSF1RI Behandlung.....	29

Abbildung 12 Präventive CSF1RI Behandlung führt zu verbesserter Greifkraft von 12 Monate alten Cx32def Mutanten.....	30
Abbildung 13 Keine Verbesserung neurophysiologischer Parameter in 15 Monate alten Cx32def Mutanten nach CSF1RI Behandlung.....	31
Abbildung 14 Reduktion der Makrophagenanzahl im Nervus Quadriceps 12 Monate alter P0het Mutanten nach CSF1RI Behandlung.....	34
Abbildung 15 Verbesserter Erhalt der Myelinintegrität im Nervus Quadriceps 12 Monate alter P0het Mutanten nach CSF1RI Behandlung.....	36
Abbildung 16 Weniger variable Ausprägung des Myelinverlustes in lumbalen Vorderwurzeln 12 Monate alter P0het Mutanten nach CSF1RI Behandlung.....	38
Abbildung 17 Trend zu verbesserter neuromuskulärer Innervation in Fußmuskeln 12 Monate alter P0het Mutanten nach CSF1RI Behandlung.....	39
Abbildung 18 Verbesserte neurophysiologische Parameter in 12 Monate alten P0het Mutanten nach CSF1RI Behandlung.....	40
Abbildung 19 Trend zu verbesserter Greifkraft von 12 Monate alten P0het Mutanten nach CSF1RI Behandlung.....	42
Abbildung 20 Reduktion der Makrophagenanzahl im Nervus Quadriceps 12 Monate alter PMP22tg Mutanten nach CSF1RI Behandlung.....	43
Abbildung 21 Keine verringerte Demyelinisierung im Nervus Quadriceps 12 Monate alter PMP22tg Mutanten nach CSF1RI Behandlung.....	45
Abbildung 22 Keine verringerte Demyelinisierung in lumbalen Vorderwurzeln 12 Monate alter PMP22tg Mutanten nach CSF1RI Behandlung.....	46

Abbildung 23 Keine verbesserten neurophysiologischen Parameter in 12 Monate alten PMP22tg Mutanten nach CSF1RI Behandlung47

6.4 Abkürzungsverzeichnis

AF	Alexa Fluor
Akt/PKB	Proteinkinase B
BSA	Bovines Serumalbumin
α -Btx	Alpha-Bungarotoxin
°C	Grad Celsius
CD	Cluster of differentiation
CMAP	Compound muscle action potential
CMT	Charcot-Marie-Tooth
csCSF-1	Cell surface CSF-1
CSF-1/M-CSF	Monozytenkolonien-stimulierender Faktor
CSF1R	CSF-1-Rezeptor
CSF1RI	CSF-1-Rezeptor Inhibitor
CX32/GJB1	Connexin 32 / Gap junction Protein beta 1
Cy	Cyanine
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
Dist.	Distal
DNA	Desoxyribonucleinsäure
ERK	Extracellular-signal regulated kinase
FDB	Flexor digitorum brevis
GDNF	Glia cell-derived neurotrophic factor
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GIMP	GNU Image Manipulation Programm
het	Heterozygot
HMSN	Hereditäre motorisch-sensible Neuropathie
IL-34	Interleukin 34
JHD -/-	J _H -Region defizient
kDA	Kilodalton
kg	Kilogramm
M	Monate
M.	Musculus
Mb	Megabasenpaare
MCP-1/CCL2	Monocyte chemotactic Protein / CC-Chemokinligand 2

MEK	Mitogen-activated protein kinase kinase
MFN2	Mitofusin 2
mg	Milligramm
min	Minuten
µl	Mikroliter
MPZ/P0	Myelin protein zero
m/s	Meter pro Sekunde
N.	Nervus
n.b.	nicht beobachtet
NCAM	Neural cell adhesion molecule
NLG	Nervenleitgeschwindigkeit
NMS	Neuromuskuläre Synapse
n.s.	nicht signifikant
OCT	Optimal cutting temperature
op/op	osteopetrotisch
OsO ₄	Osmiumteroxid
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PFA	Paraformaldehyd
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PMP22	Peripheres Myelinprotein 22
PNS	Peripheres Nervensystem
Prox.	Proximal
RAG	Recombination activating gene
SD	Standard deviation / Standardabweichung
spCSF-1	Secreted proteoglycan CSF-1
tg	Transgen
WT	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem

Danksagung

Mein Dank gilt zunächst Herrn Prof. Dr. Rudolf Martini für die Überlassung des Promotions-themas, die mir gebotenen Arbeitsmöglichkeiten sowie für die stetige wissenschaftliche Un-terstützung, welche sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. Dennis Klein für die hervorragende Betreuung. Die me-thodische Einarbeitung, seine Unterstützung bei der Präparation der Tiere und den elektro-physiologischen Messungen, aber auch seine unzähligen Ratschläge, Ideen und die vielen kritischen Diskussionen haben mir bei der Erstellung dieser Arbeit sehr geholfen.

Weiterhin möchte ich mich bei Heinrich Blazyca, Silke Loserth und Bettina Meyer für die exzellente technische Unterstützung bei der Durchführung meiner Experimente bedanken.

Auch danke ich meinen Kollegen und ehemaligen Kollegen der Arbeitsgruppe Dr. Janos Groh, David Stadler, Xidi Yuan, Susanne Kerscher, Kristina Heintl und Anne Quatraccioni für die immer angenehme Arbeitsatmosphäre.

Für die hervorragende Pflege und Organisation der Tiere danke ich Helga Brünner, Anja Weidner, Jaqueline Schreiber und Jennifer Bauer.

Der Firma Plexxikon danke ich für die Bereitstellung des CSF-1-Rezeptor Inhibitors.

Lebenslauf

Name David Lukas Schreiber

Werdegang

seit 08/2018 Krankenhaus der Augustinerinnen Köln
Klinik für Orthopädie, spezielle orthopädische Chirurgie und Sport-
medizin
Assistenzarzt

11/2017 – 08/2018 Julius-Maximilians-Universität Würzburg
Promotionsstudent

05/2011 – 11/2017 Julius-Maximilians-Universität Würzburg
Staatsexamen
Humanmedizin

07/2010 – 12/2010 Chirurgisches Zentrum der Universitätskliniken Bonn
Anästhesiologische Intensivstation
Zivildienst

2001 – 2010 Ernst-Moritz-Arndt-Gymnasium Bonn
Allgemeine Hochschulreife

Köln, 28.12.2018

David Schreiber