



**Aus der Neurologischen Klinik und Poliklinik  
der Universität Würzburg  
Direktor: Professor Dr. med. Jens Volkmann**

**Präventive und therapeutische Behandlung mit einem CSF-1-  
Rezeptorinhibitor bei verschiedenen Charcot-Marie-Tooth Mausmodellen**

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

vorgelegt von

**Viktoria Charlotte Caroline Ostertag**  
aus Hamburg

**Würzburg, Januar 2021**

**Referent bzw. Referentin:** Prof. Dr. rer. nat. Rudolf Martini  
**Korreferent bzw. Korreferentin:** Prof. Dr. med. Anna Leena Sirén  
**Dekan:** Prof. Dr. Matthias Frosch

**Tag der mündlichen Prüfung:** 25.01.2023

**Die Promovendin ist Ärztin**

**Widmung**

**Meinen Eltern**

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| <b>1</b> | <b>Einleitung .....</b>   | <b>1</b>  |
| 1.1      | Histologie des peripheren Nervensystems.....  | 1         |
| 1.2      | Überblick über das Krankheitsbild Charcot-Marie-Tooth .....   | 2         |
| 1.3      | Pathologien und Mausmodelle der CMT1-Neuropathie .....  | 5         |
| 1.4      | Die Rolle des Immunsystems bei CMT1-Modellen .....  | 7         |
| 1.5      | Ziel dieser Arbeit .....  | 12        |
| <b>2</b> | <b>Material und Methoden.....</b>   | <b>14</b> |
| 2.1      | Technische Geräte, Puffer, Antikörper.....  | 14        |
| 2.2      | Mausmodell und Genotypisierung.....   | 14        |
| 2.3      | CSF-1-Rezeptor-Inhibitor-Behandlung.....  | 15        |
| 2.4      | Gewebepräparation und -fixierung.....   | 16        |
| 2.5      | Immunhistochemische F4/80 Färbung.....  | 17        |
| 2.6      | Immunhistochemische Färbung neuromuskulärer Endplatten.....   | 17        |
| 2.7      | Elektronenmikroskopie.....  | 18        |
| 2.8      | Greiffest.....  | 18        |
| 2.9      | Elektrophysiologische Messungen.....  | 19        |
| 2.10     | Statistische Auswertung.....  | 20        |
| <b>3</b> | <b>Ergebnisse .....</b>   | <b>21</b> |
| 3.1      | Behandlung von P0het Mäusen mit dem CSF-1-Rezeptor-Inhibitor ...  | 21        |
| 3.1.1    | CSF-1-RI-Behandlung führt zu einer Reduktion der Makrophagen im Nervus Quadriceps .....                         | 21        |
| 3.1.2    | Verbesserung ultrastruktureller Parameter nach präventiver Gabe des CSF-1-RI.....                               | 25        |
| 3.1.3    | Verbesserte neuromuskuläre Innervation im Rebound Therapieschema sowie nach präventiver Gabe des CSF-1-RI ..... | 30        |
| 3.1.4    | CSF-1-RI-Behandlung erbringt keine signifikante Verbesserung der elektrophysiologischen Parameter.....          | 32        |



|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| 3.1.5    | Positiver Effekt der CSF-1-RI-Therapie auf die Greifkraft im präventiven sowie im Rebound-Behandlungszweig .....                                 | 35        |
| 3.2      | Behandlung von Cx32def Mäusen mit dem CSF-1-Rezeptor-Inhibitor .....   | 37        |
| 3.2.1    | CSF-1-RI-Behandlung führt zu einer Reduktion von Makrophagen im Nervus Quadriceps .....  | 37        |
| 3.2.2    | Verbesserte neuromuskuläre Innervation nach präventiver Gabe des CSF-1-RI.....   | 40        |
| 3.2.3    | CSF-1-RI-Behandlung erbringt keine signifikante Verbesserung der elektrophysiologischen Parameter.....   | 41        |
| 3.2.4    | Positiver Effekt der CSF-1-RI-Therapie auf die Greifkraft im präventiven sowie im Rebound-Behandlungszweig .....                                 | 44        |
| <b>4</b> | <b>Diskussion.....</b>   | <b>46</b> |
| 4.1      | Die Behandlung von P0het Mäusen mit einem CSF-1-Rezeptorinhibitor führt zu verbesserten histopathologischen und funktionellen Parametern .....   | 46        |
| 4.2      | Die Behandlung von Cx32def Mäusen mit einem CSF-1-Rezeptorinhibitor führt zu verbesserten histopathologischen und funktionellen Parametern ..... | 52        |
| 4.3      | Möglichkeit der translationalen Ansätze der CSF-1-RI-Therapie .....  | 55        |
| <b>5</b> | <b>Zusammenfassung .....</b>   | <b>59</b> |
| <b>6</b> | <b>Anhang .....</b>  | <b>61</b> |
| 6.1      | Materialien.....   | 61        |
| 6.1.1    | Technische Ausrüstung .....  | 61        |
| 6.1.2    | Reagenzien.....  | 62        |
| 6.1.3    | Puffer und Lösungen .....  | 63        |
| 6.1.4    | Antikörper .....   | 64        |
| 6.2      | Literaturverzeichnis .....   | 66        |
| 6.3      | Abbildungsverzeichnis .....  | 71        |
| 6.4      | Abkürzungsverzeichnis .....  | 73        |

|          |                               |                                    |
|----------|-------------------------------|------------------------------------|
| <b>7</b> | <b>Curriculum vitae</b> ..... | Fehler! Textmarke nicht definiert. |
| <b>8</b> | <b>Danksagung</b> .....       | <b>75</b>                          |

# 1 Einleitung

## 1.1 Histologie des peripheren Nervensystems

Neurone im peripheren Nervensystem bestehen aus einem proximal gelegenen im Rückenmark lokalisierten Zellkörper (Perikaryon) und Dendriten sowie einem in die Peripherie führenden Axon. Dieses leitet die elektrische Erregung eines Nervenimpulses weiter und ist abhängig vom Durchmesser des Axons nicht-myelinisiert oder myelinisiert. Die Myelinscheide ist Teil einer Schwann-Zelle, mehrfach um das Axon gewickelt und in regelmäßigen Abständen durch kleine Einschnürungen, den sogenannten Ranvier'schen Schnürringen, unterbrochen. Der Bereich zwischen den Schnürringen wird als Internodium bezeichnet. Das Myelin, welches zu 70% aus Lipiden (Phospholipide, Glykolipide, Cholesterin) und zu 30% aus Proteinen (u.a. PMP22, P0 und Cx32) besteht, sorgt für die elektrische Isolation des Neurons, sodass der elektrische Impuls ungestört weitergeleitet werden kann. Die Erregungsausbreitung an myelinisierten Nervenfasern findet nur an den Ranvier'schen Schnürringen statt und springt bei der Weiterleitung des Impulses von Schnürring zu Schnürring (saltatorische Erregungsleitung). Hierdurch ist es möglich, dass elektrische Impulse in myelinisierten Neuronen bei vergleichbarem axonalen Durchmesser wesentlich schneller (bis zu 120 m/s) weitergeleitet werden können, als in unmyelinisierten Neuronen (max. 2 m/s).

Im Laufe der Entwicklung einer Schwannzelle verringert sich der Zytoplasmagehalt und die Plasmamembranen treten miteinander in direkten Kontakt. Nun findet die Kompaktierung des Myelins statt: Myelin-spezifische Proteine verbinden die einzelnen Schichten der Plasmamembranen und führen so zu einer Verdichtung des Myelins (Lüllmann-Rauch, 2009). Myelin Protein Zero (MPZ oder P0), welches den Hauptproteinanteil des kompakten Myelins ausmacht, ist sowohl an der Bildung, als auch an der Stabilisierung der

Myelinscheide beteiligt (Martini and Schachner, 1997) (Niemann et al., 2006). Ebenso im kompakten Myelin zu finden ist das Periphere Myelinprotein 22 (PMP22). PMP22 ist vermutlich an der Stabilisierung, aber auch an der Differenzierung von Schwann-Zellen beteiligt (Martini and Schachner, 1997; Muller et al., 1997). Des Weiteren bildet das Myelin Basic Protein (MBP) einen Teil des kompakten Myelins. Dieses Protein ist ebenfalls an der Stabilisierung der Myelinscheiden beteiligt (Arroyo and Scherer, 2000).

An manchen Stellen ist weiterhin Zytoplasma vorhanden: an den paranodalen Zungen, die sich in unmittelbarer Umgebung zum Internodium befinden, an den sogenannten Schmidt-Lanterman-Inzisuren (SLI), sowie an der inneren und äußeren Zytoplasmazone. Die paranodalen Zungen und die SLI fungieren als intrazelluläre Verbindungen zwischen der äußeren und inneren Zytoplasmazone. Gap Junctions, die sich jeweils im Bereich der paranodalen Zungen sowie bei den SLI zwischen den Membranen befinden, sind Abkürzungen, die den intrazellulären Zellstoffwechsel erleichtern und so sehr wahrscheinlich eine wichtige Rolle für den Metabolismus der Schwannzelle einnehmen.

## 1.2 Überblick über das Krankheitsbild Charcot-Marie-Tooth

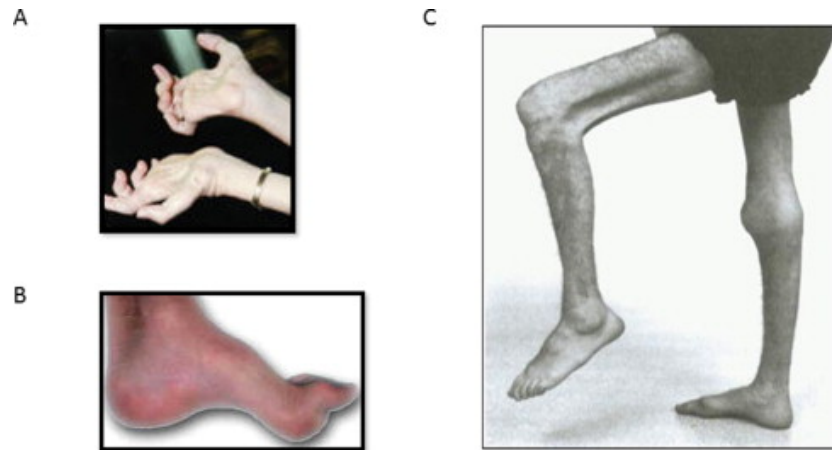
Charcot-Marie-Tooth (CMT), auch unter dem Namen Hereditäre Motorische und Sensible Neuropathie (HMSN) bekannt, umfasst genetisch bedingte Erkrankungen des peripheren Nervensystems mit einer kumulativen Häufigkeit von bis zu 1:2.500 (Pareyson and Marchesi (2009).

Die nach ihren Entdeckern Jean-Martin Charcot, Pierre Marie und Howard Henry Tooth benannten Neuropathien, welche im Jahr 1886 erstmalig beschrieben wurden, umfassen eine heterogene Gruppe von unter anderem demyelinisierenden Erkrankungen, die wiederum in verschiedene Subgruppen unterteilt werden können: die autosomal-dominant demyelinisierende Form (CMT1), die autosomal-rezessiv demyelinisierende Form (CMT 4) und die autosomal-dominant axonale Form (CMT2), sowie weitere intermediäre Formen (Patzko and Shy, 2011). Ein sehr wichtiges klinisches Unterscheidungsmerkmal

ist die Nervenleitgeschwindigkeit (NCV). Eine Nervenleitgeschwindigkeit von 38 m/s im N. ulnaris oder N. medianus ist typisch für eine CMT1, Werte darüber sprechen für eine CMT2. Eine NCV zwischen 25-45 m/s ist bei intermediären Formen der CMT zu beobachten (Patzko and Shy, 2011)

Die weitere Klassifikation der CMT ist sehr komplex und einem steten Wandel unterlegen (Magy et al., 2018). Übergreifend kann man die große Gruppe der CMT-Neuropathien anhand der betroffenen Gene sowie der jeweilig gestörten Proteinfunktion unterteilen (Jerath and Shy, 2015).

Klinisch präsentieren sich an CMT erkrankte Patienten mit variablen Symptomen, die meistens während der zweiten bis dritten Lebensdekade zum ersten Mal auftreten (Pareyson et al., 2006). Besonders häufig zeigt sich eine fortschreitende Muskelatrophie, die bevorzugt die Extremitäten betrifft, an den unteren Extremitäten beginnt und im Laufe der Krankheit auch auf die Arme übergreift. Hinzu kommen ein herabgesetztes Vibrations-, Schmerz- und Temperaturempfinden und abgeschwächte Muskeleigenreflexe, sowie Fußdeformitäten; hier ist vor allem der Hohlfuß zu nennen. Die Symptome führen oft zu Gangbeschwerden und dem für das Krankheitsbild typischen Steppergang, im Extremfall sogar zu Rollstuhlpflichtigkeit (Szigeti and Lupski, 2009) (Pareyson et al., 2006), (Brennan et al., 2015) (**Abbildung 1**). Häufig ist für die Patienten der Verlust der Muskelkraft der zentrale Faktor in der Minderung ihrer Lebensqualität (Johnson et al., 2014). Aktuell ist noch keine spezifische Therapie vorhanden, deswegen sind die Patienten von einer rein symptomatischen Behandlung abhängig. Diese beinhaltet orthopädische und chirurgische Eingriffe, Physiotherapie und Schmerztherapie (Reilly and Shy, 2009; Schenone et al., 2011).



### Abbildung 1      Symptomatik der CMT-Neuropathie

(A) Muskelatrophie der Hände in „main-en-griffe“-Stellung (B) Hohlfuß mit Hammerzehen (C) distale und proximale Muskelatrophie der unteren Extremität mit Spitzfußstellung aufgrund einer Peroneus-Lähmung (Bild adaptiert von (Brennan et al., 2015), **permanente Druckerlaubnis eingeholt**)

Auf molekularer Ebene beruht CMT auf Mutationen verschiedenster Gene, wobei die jeweilig betroffenen Gene unterschiedliche Formen der CMT-Erkrankung hervorrufen. Mittlerweile sind über 80 Gene identifiziert worden, die mit CMT in Verbindung gebracht werden können (Timmerman et al., 2014; Stojkovic, 2016). Jedoch sind vor allem vier Gene an der Entstehung der Krankheit beteiligt: das *Peripheral Myelin Protein 22*-Gen (*PMP 22*), das *gap junction  $\beta$ -1*-Gen (*GJB1*), das *Myelin Protein Zero*-Gen (*MPZ* oder auch *P0*) und das *Mitofusin 2*-Gen (*MFN 2*). Ist eines dieser Gene mutiert, mündet dies in jeweils unterschiedlichen Formen der CMT-Neuropathie. Insgesamt beruhen über 90 % der CMT-Erkrankungen auf Mutationen dieser Gene (Jerath and Shy, 2015).

Die Form CMT1A, die mit 70% die häufigste CMT-Untergruppe darstellt, resultiert aus einer 1.4Mb großen Duplikation auf dem Chromosom 17, welches unter anderem das *PMP22*-Gen enthält. Die zweithäufigste Form, CMT1X, entsteht durch Mutationen im *GJB1*-Gen, das für das Protein Connexin-32 (Cx32) encodiert. Ist das *MPZ*-Gen betroffen, resultiert dies in der Form CMT1B, die 10% der CMT1-Erkrankungen ausmachen. Mutationen im *MFN2*-Gen haben die

axonale Form CMT2A zur Folge (Patzko and Shy, 2011). Auf die genauen molekularen Vorgänge wird in Kapitel 1.3 detaillierter eingegangen.

### 1.3 Pathologien und Mausmodelle der CMT1-Neuropathie

In den vergangenen Jahren konnten mehr und mehr Mausmodelle für CMT1 generiert werden (Martini, 1997) (Fledrich et al., 2012). Diese Modelle machen es möglich, die Pathogenese der hereditären Neuropathie weiter zu verstehen und so mögliche Therapieoptionen für die bis dato nur symptomatisch behandelbare Erkrankung zu finden. Für die drei häufigsten Unterformen der CMT, die CMT1A, CMT1X und CMT1B, sind mittlerweile etablierte und gut erforschte Modelle verfügbar: Mäuse mit einer Modifikation im *PMP22*-Gen, *GJB1*-Gen oder aber im *P0*-Gen (Fledrich et al., 2012) (Juneja et al., 2018).

#### **CMT1A**

Das *PMP22*-Gen, welches bei der Unterform CMT1A betroffen ist, codiert für ein transmembranäres Protein, das bis zu 5% der Myelinproteine im gesamten peripheren Nervensystem ausmacht (Fledrich et al., 2012) (Jerath and Shy, 2015). Es wird durch Schwannzellen produziert und kommt im kompakten Myelin vor, seine genaue Funktion ist noch nicht vollständig bekannt. Studien deuten jedoch darauf hin, dass es in die Apoptose und Proliferation von Schwannzellen involviert ist sowie in die Regulierung von Myelindicke und –stabilität (Adlkofer et al., 1995) (Fabbretti et al., 1995) (Giambonini-Brugnoli et al., 2005). Wenn aus einer Mutation auf dem Chromosom 17 die Duplikation des *PMP22*-Proteins resultiert, aggregiert dieses Protein im Endoplasmatischen Retikulum der Schwannzellen und führt so zu der Unfolded Protein Response (UPR). Diese UPR kann dann eine umfassende Abnahme der Myelinisierung peripherer Nerven verursachen (Jerath and Shy, 2015).

Rattenmodelle für CMT1A zeigen typische histopathologische Merkmale, die auch bei an CMT1A erkrankten Patienten erkennbar sind (Niemann et al., 1999). Hierzu zählen De- und Remyelinisierung der peripheren Nerven, Hypermyelinisierung und die typischen Zwiebelschalen-Formationen, die am

ehesten überzählige Schwannzellen darstellen und ein Resultat aus sich wiederholenden Episoden von De- und Remyelinisierung sind (Weis et al., 2017). Eine weitere, durch ein Mausmodell gewonnene Erkenntnis ist, dass die Schwere der Erkrankung abhängig von der Anzahl der Kopien des *PMP22*-Gens ist. Mäuse mit sieben Kopien zeigen einen stark demyelinisierenden Phänotyp, wohingegen heterozygote Artgenossen der Linie C61 mit nur vier Kopien mildere histopathologische Merkmale aufweisen (Huxley et al., 1998) (Huxley et al., 1996).

### **CMT1X**

Das Protein Connexin 32 (Cx32) befindet sich überwiegend in den Gap Junctions im Bereich der paranodalen Zungen und der SLI. Mutationen des Gens für Cx32 führen zu einer Beeinträchtigung der Proteinfunktion. Es wird angenommen, dass das Cx32 unter anderem eine Rolle im Kaliumhaushalt der Schwannzelle einnimmt. Ebenso ergeben sich Hinweise auf eine Involvierung in den Myelinisierungsprozess über eine Beteiligung an Calcium-assoziierten Signalwegen (Bortolozzi, 2018). Liegt eine Mutation des Gens für Cx32 vor, kann so unter anderem ein schneller und effizienter Stoffwechsel innerhalb der Schwannzelle nicht mehr gewährleistet werden. Diese Prozesse führen zu einer Demyelinisierung der peripheren Nerven und so zu dem Krankheitsbild der CMT1X (Jerath and Shy, 2015) Es ist auffällig, dass es zwar eine Vielzahl an unterschiedlichen Mutationen gibt, diese jedoch meistens in einem ähnlichen Phänotyp mit entsprechender Symptomatik münden (Jerath and Shy, 2015). Im Mausmodell zeigen sich hier ähnliche Merkmale wie bei an CMT1X erkrankten Patienten: Auf mikroskopischer Ebene sind vermehrt endoneurale Makrophagen und abnormal innervierte Synapsen zu beobachten. In elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigen sich ungewöhnlich dünn myelinisierte Axone, eine Abnahme des durchschnittlichen Axondurchmessers, periaxonale Vakuolen als typisches Merkmal axonalen Schadens, auffällig dicke periaxonale Akkumulationen des Cytoplasmas, Regenerationsbündel und Zwiebschalen-Formationen (Kobsar et al., 2003). Zudem sind funktionelle



Parameter wie das Muskelsummenaktionspotential und die Nervenleitgeschwindigkeit verringert. (Anzini et al., 1997).

### **CMT1B**

Das bei der CMT1B-Form betroffene transmembranäre Protein P0 stellt den Großteil des peripheren Myelinproteins dar und ist im kompakten Myelin zu finden. Wenn das P0-Gen mutiert, akkumuliert das Protein im endoplasmatischen Retikulum der Zelle, anstatt zur Zellmembran transportiert zu werden. Seine eigentliche Funktion dort wäre, als Adhäsionsmolekül benachbarte Myelinlamellen zu verbinden und so die Myelinschicht zu kompaktieren. Dies ist mit der mutierten Form nicht mehr gewährleistet (Niemann et al., 2006).

Eine Funktionsbeeinträchtigung des P0 Proteins kann zusätzlich durch ein gestörtes Mengenverhältnis verursacht werden. Sowohl eine Überexpression als auch eine verminderte Expression kann zu Myelinschäden führen (Martini et al., 1995) (Yin et al., 2000) (Wrabetz et al., 2000). Das in dieser Arbeit verwendete Mausmodell für die CMT-Unterform CMT1B, welches P0 heterozygot ist, zeigt große Ähnlichkeiten in den pathologischen Merkmalen im Vergleich zu an dem demyelinisierendem CMT1B-Typ erkrankten Patienten. Es kommt zu einer verhältnismäßig milden, jedoch stetig fortschreitenden Neuropathie (beginnend ab dem 2. Lebensmonat der Mäuse). Auch hier ist eine Demyelinisierung der peripheren Neurone zu beobachten sowie eine leicht herabgesetzte Nervenleitgeschwindigkeit (30 m/s). Histologisch zeigen sich bei den Mäusen ebenso wie bei den Patienten Korrelate der Demyelinisierung (abnormal dünn myelinisierte Axone, Zwiebschalen-Formationen) (Martini et al., 1995), (Shy et al., 1997).

## 1.4 Die Rolle des Immunsystems bei CMT1-Modellen

Eine wichtige Rolle bei der Entstehung der CMT-Neuropathie spielt das Immunsystem, wobei sowohl der angeborene als auch der adaptive Teil des Immunsystems beteiligt sind (Martini and Willison, 2016) (**Abbildung 2**).

Als Teil des adaptiven Immunsystems spielen Lymphozyten bei der Pathogenese der CMT-Neuropathie eine tragende Rolle: In zurückliegenden Studien konnte gezeigt werden, dass diese Zellen aktiv, aber wohl indirekt an der Demyelinisierung der peripheren Nerven beteiligt sind. Bei Menschen, die an vererblichen Neuropathien leiden, sowie bei Mäusen, die einen Genotyp heterozygot für P0 zeigen, konnten vermehrt endoneurale T-Lymphozyten beobachtet werden. P0het Mäuse wurden entweder mit Nullmutanten für das recombination activating gene 1 (RAG-1) verpaart oder aber mit Mutanten defizient für eine  $\alpha$ -Untereinheit des T-Zell-Rezeptors. Tiere mit der RAG-1 Mutation können keine reifen T- und B-Lymphozyten bilden, die Mutation am T-Zell-Rezeptor führt zu einem Mangel nur an T-Lymphozyten. Hier zeigte sich in beiden Fällen, dass die hierdurch verursachte Immundefizienz zu einer verminderten Demyelinisierung und einer verbesserten Nervenleitgeschwindigkeit führte (Schmid et al., 2000). Andere Studien in P0het Mäusen lassen vermuten, dass endoneurale CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten Makrophagen, die die Basallamina der Schwannzelle durchdrungen hatten, aktivieren (Wang Ip et al., 2006). Endogene Antikörper als weiterer Teil des adaptiven Immunsystems sind ebenfalls als Aktivator von Makrophagen tätig. In einer vorherigen Studie konnte gezeigt werden, dass P0het Mäuse entlang der Schwannzellen peripherer Nerven Antikörper der Klasse IgG und IgM aufweisen. Diese Antikörper binden und aktivieren Makrophagen, welche dann wiederum eine Demyelinisierung der peripheren Nerven verursachen und bilden so eine Verbindung zwischen dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem (Klein et al., 2015a).

Makrophagen als Bestandteil des angeborenen Immunsystems sind ebenfalls entscheidend in die pathologischen demyelinisierenden Prozesse der CMT-Erkrankung involviert und führen zu der für die CMT-Neuropathie charakteristischen niedriggradigen Entzündungsreaktion (Martini et al., 2008) (Klein and Martini, 2016) (Groh et al., 2015).

Das monocyte-chemoattracting protein1 (MCP-1/CCL2), welches von Schwannzellen gebildet wird, ist ein zentraler Mediator in der Migration der

Makrophagen in den peripheren Nerven und ein wesentlicher Bestandteil der pathologischen CMT-typischen Veränderungen in P0 heterozygoten Mäusen (Fischer et al., 2008). In letztgenannter Studie konnte zudem festgestellt werden, dass P0het Doppelmutanten zusätzlich heterozygot defizient für CCL2 einen nachhaltig verbesserten Nerv-Phänotyp und eine verringerte Anzahl an endoneuralen Makrophagen aufwiesen.

In einem Cx32def Mausmodell konnte nachgewiesen werden, dass der CCL2 Anteil in den Tieren erhöht war, was zu einer vermehrten Anzahl an endoneuralen Makrophagen führte. In Cx32def Mutanten heterozygot defizient für CCL2 war zu beobachten, dass die Anzahl der phagozytierenden Makrophagen abnahm, ebenso wie die Demyelinisierungsprozesse. Andere Parameter wie die Nervenleitgeschwindigkeit und die Greifkraft der Hinterpfoten verbesserten sich ebenfalls. Hierbei muss jedoch erwähnt werden, dass diese positiven Effekte nur vorübergehend und im Alter von 12 Monaten nicht mehr nachzuweisen waren (Groh et al., 2010).

Weitere Studien bestätigten zudem die zentrale Rolle des Colony-stimulating factor-1 (CSF-1) in der Aktivierung von endoneuralen Makrophagen und somit in der Pathogenese von CMT, zumindest in Mausmodellen, konnte aber auch in der humanen Nervbiopsie nachgewiesen werden (Groh et al., 2012). CSF-1 ist ein Zytokin, welches neben Makrophagen auch andere monozytäre Zellen aktiviert und in peripheren Nerven überwiegend von Fibroblasten sezerniert wird.

CSF-1 existiert in drei Isoformen: der membran-gebundenen Glykoprotein-Isoform und zwei sezernierten Isoformen, jeweils aus Proteoglykanen oder Glykoproteinen bestehend (Pixley and Stanley, 2004). Die von den Fibroblasten sezernierte Proteoglykan-Isoform des CSF-1 (spCSF-1) aktiviert durch eine Bindung an den transmembranären CSF-1-Rezeptor (CSF-1-R bzw. c-Fms) die endoneuralen Makrophagen. In elektronenmikroskopischen Aufnahmen konnte gezeigt werden, dass diese Zellen das Myelin der Schwannzellen phagozytierten (Groh et al., 2016).

Eine Studie mit Cx32def Mäusen (der CMT-Unterform CMT1X entsprechend) zeigte, dass CSF-1-sezernierende Fibroblasten und endoneurale Makrophagen in engem Zell-Zell-Kontakt stehen. Zudem war das CSF-1 im peripheren Nervengewebe der Cx32def Mäuse hochreguliert und vermittelte eine steigende Anzahl an endoneuralen Makrophagen. Die Cx32def Mäuse wurden mit Mutanten, die spontan defizient für CSF-1 waren (sog. osteopetrotische Mäuse (Yoshida et al., 1990)), gekreuzt. In den CSF-1-defizienten Doppelmutanten konnte beobachtet werden, dass typische pathologische Merkmale der CMT-Neuropathie wie die Demyelinisierung der peripheren Nerven und die Axonopathie durch die CSF-1-Defizienz bedeutend abgeschwächt werden konnten (Groh et al., 2012).

Ähnliche Ergebnisse konnten in P0het Mäusen (der CMT-Unterform CMT1B entsprechend) erzielt werden. Doppelmutanten, die zusätzlich defizient für CSF-1 waren, zeigten eine stark verminderte Anzahl und Aktivierung der Makrophagen und als Konsequenz dieses Defektes im angeborenen Immunsystems eine abgeschwächte Demyelinisierung (Carenini et al., 2001).

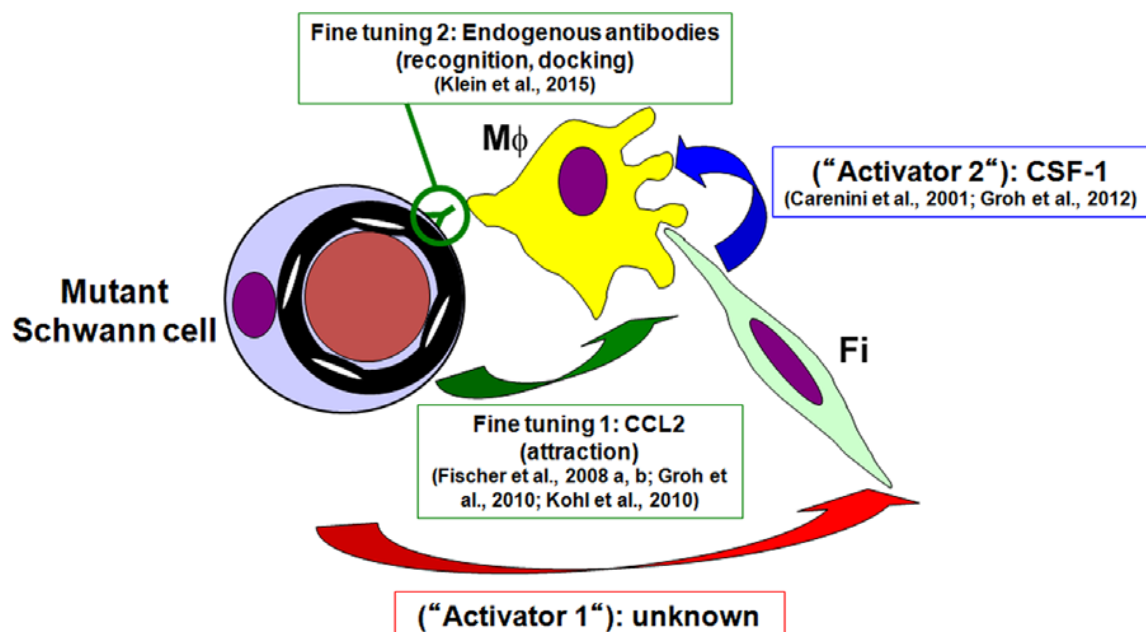
Weitere Studien zeigten zudem einen Zusammenhang zwischen CSF-1-aktivierten Makrophagen und dedifferenzierten Schwannzellen: In Cx32het Mäusen, deren periphere Nerven eine Mosaikverteilung von Cx32-negativen und -positiven Schwannzellen aufweisen, konnte eine starke Assoziation von einer erhöhten endoneuralen Makrophagenanzahl und Cx32def Schwannzellen beobachtet werden. Diese Schwannzellen zeigten eine Hochregulierung der Dedifferenzierungsmarker Neural Cell Adhesion Molecule (NCAM) und L1. In Cx32het Doppelmutanten, die zusätzlich defizient für CSF-1 waren, konnte festgestellt werden, dass die Schwannzell-Dedifferenzierungsmarker NCAM und L1 herunterreguliert waren und die Demyelinisierung der peripheren Nerven bedeutend abnahm (Groh et al., 2015).

Weitere Studien festigten die These, dass CSF-1 und sein Rezeptor (kodiert von *c-Fms*) eine zentrale Rolle in der Pathogenese von CMT1 einnehmen: Eine über mehrere Monate fortgeführte längerfristige Inhibition des CSF-1-Rezeptors

mittels eines oralen CSF-1-Rezeptor-Inhibitors (CSF-1-RI) in Cx32 defizienten Mausmutanten resultierte in einer signifikanten Reduktion der endoneuralen Makrophagen. Diese führte zu histopathologischen und klinischen Verbesserungen. In elektronenmikroskopischen Aufnahmen des Femoralisnerven konnte eine Reduktion von periaxonalen Vakuolen sowie eine Zunahme von Regenerationsclustern im Sinne einer Verbesserung der axonalen Eigenschaften sowie der Myelineigenschaften gezeigt werden. Zudem wurde eine verbesserte Nervenleitgeschwindigkeit sowie eine größere Greifkraft in den Hinterpfoten der Mäuse gemessen (Klein et al., 2015b).

All die zuletzt genannten Studienergebnisse deuten darauf hin, dass eine Inhibition des CSF-1-Rezeptors eine Therapiemöglichkeit für die CMT-Neuropathie Typ 1 bieten könnte.

### Interplay of cells and secreted molecules during secondary inflammation in CMT1 models



**Abbildung 2 Zusammenfassung der immunologischen Prozesse in der Pathogenese von CMT1-Neuropathien**

*Am Anfang der Pathogenese steht die mutierte Schwann´sche Zelle. Ein noch unbekannter Aktivator („Activator 1“), der von mutierten Schwannzellen*

sezerniert wird, induziert eine Freisetzung von CSF-1 („Activator 2“) durch Fibroblasten. CSF-1 aktiviert daraufhin Makrophagen, die proliferieren und eine Schwannzell-Dedifferenzierung sowie Myelinphagozytose hervorrufen. CCL2 bzw. MCP-1 („fine tuning 1“) wird von Schwannzellen sezerniert und dient der Migration der Makrophagen in den peripheren Nerven. Endogene Antikörper („fine tuning 2“), die von Lymphozyten sezerniert werden, binden an Schwannzellen und ermöglichen so den Makrophagen, ihre Zielzelle zu erkennen. (Bild adaptiert von (Martini and Willison, 2016), permanente Druckerlaubnis gegeben im Rahmen eines open access articles bzw. Creative Commons Attribution)

## 1.5 Ziel dieser Arbeit

In vorherigen Studien konnte gezeigt werden, dass sowohl das angeborene als auch das adaptive Immunsystem eine erhebliche Rolle bei der Pathogenese der CMT1 spielen. Durch eine Inhibition des CSF-1-Rezeptors an Makrophagen konnte ein verbesserter Nervphänotyp und eine deutliche Abmilderung des Krankheitsbildes beobachtet werden (Klein et al., 2015b).

In dieser Arbeit sollen an verschiedenen CMT1-Mausmodellen weiterführende Behandlungsstudien mit dem oben erwähnten oral applizierten niedermolekularen CSF-1-Rezeptor-Inhibitor (PLX5622) durchgeführt werden, die untersuchen, zu welchen Zeitpunkten (therapeutisch oder präventiv) innerhalb des Krankheitsverlaufes eine erfolgreiche Therapie noch möglich ist. Zudem soll geprüft werden, ob nach Beendigung einer initial präventiven Therapie ein anhaltender Effekt oder ein Rebound-Phänomen beobachtet werden kann.

Folgende Fragen wurden untersucht:

- Gibt es durch den frühzeitigen Beginn im präventiven Ansatz eine relevante Verbesserung in den klinischen und histopathologischen Merkmalen? Hält dieser an oder gibt es beim Absetzen der Behandlung einen Rebound-Effekt?
- Kann ein therapeutisches Therapieregime ebenfalls zu einer Abmilderung des Krankheitsbildes führen?
- Mit welchen Parametern korreliert die Makrophagen-Anzahl bei präventiver, therapeutischer und unterbrochener Behandlung?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Technische Geräte, Puffer, Antikörper

Eine ausführliche Beschreibung der verwendeten technischen Geräte, Puffer, Antikörperlösungen etc. befindet sich im Anhang dieser Arbeit.

### 2.2 Mausmodell und Genotypisierung

Folgende Genotypen wurden in diese Studie eingeschlossen: Cx32def Mutanten, die eine Inaktivierung des für das Protein Connexin 32 codierenden Gens aufweisen (Nelles et al., 1996), sowie P0het Mutanten (Giese et al., 1992), die typischerweise geringere Mengen des MPZ exprimieren.

Alle Mutanten besaßen einen C57BL/6 Hintergrund, ebenso wie die zusätzlich untersuchten Wildtyp-Kontrollen.

Die Genotypisierung wurde mittels einer konventionellen PCR-Technik durchgeführt. Um die benötigte Desoxyribonucleinsäure (DNA) zu isolieren, wurden Ohrbiopsien entnommen und mit DNeasy blood & tissue kit (Quiagen) verarbeitet.

Die zu untersuchenden Tiere wurden in der Tierhaltung der Neurologischen Klinik und Poliklinik der Universität Würzburg unter kontrollierten Barriere-Bedingungen in individuell belüfteten Käfigen gehalten mit einem Tag-/Nachtrhythmus von 12/12 Stunden.

Alle Experimente wurden von der zuständigen Behörde, der Regierung von Unterfranken, genehmigt (Aktenzeichen des Tierversuchsantrags: 55.2 DMS-2532-2-1).



## 2.3 CSF-1-Rezeptor-Inhibitor-Behandlung

Der CSF-1-Rezeptor-Inhibitor (PLX5622) wurde als fertig-gemischtes Futter von der Firma Plexxikon Inc. (Berkeley, Kalifornien) bereitgestellt.

Die Konzentration betrug 300mg/kg (oder ppm); die Tiere hatten über den Behandlungszeitraum unbegrenzten Zugang. Ursprünglich wurde die Inhibitor-Konzentration anhand derjenigen niedrigsten Konzentration ermittelt, die in einer 14-tägigen Behandlung zu einer 70-prozentigen Reduktion der F4/80 positiven Makrophagen in Quadricepsnerven-Querschnitten führte. (Van Hauwermeiren und Klein, unpublizierte Daten, (Klein et al., 2015b)).

Es wurden Behandlungsstrategien mit unterschiedlichen Start- und Endpunkten gewählt, um den möglichen Effekt der CSF-1-RI-Behandlung in verschiedenen Krankheitsstadien zu registrieren.

### **Präventiver Ansatz**

Zum einen gab es einen Behandlungsansatz, der im ersten Lebensmonat begann und entweder bis zum sechsten oder zwölften Lebensmonat fortgeführt wurde (im Folgenden als präventiver Ansatz bezeichnet). Dieser Ansatz wurde gewählt, um beobachten zu können, wie sich ein möglichst früher Therapiebeginn mit jeweils unterschiedlicher Dauer auf klinische und histopathologische Merkmale der Tiere auswirkt.

### **Therapeutischer Ansatz**

Zum anderen wurde ein Therapieregime gewählt, welches erst im sechsten Lebensmonat begann und bis zum zwölften Lebensmonat fortgeführt wurde (im Folgenden als therapeutischer Ansatz bezeichnet). Dieser Ansatz hatte zum Ziel, die Effekte der Behandlung mit dem CSF-1-RI auf einen bereits fortgeschrittenen Krankheitsverlauf beobachten zu können.

### **Rebound-Gruppe**

Des Weiteren wurde eine dritte Gruppe untersucht, in der die Mäuse vom ersten bis zum sechsten Lebensmonat den CSF-1-RI erhielten, aber erst im zwölften

Monat hinsichtlich der funktionellen und morphologischen Analysen untersucht wurden (im Folgenden als Rebound-Gruppe bezeichnet). Diese Rebound-Gruppe wurde gewählt, um eine mögliche überschießende Reaktion auf einen Therapieabbruch beobachten zu können.

Beide beschriebenen CMT1-Mausmodelle (CX32def und P0het) sowie Wildtypen wurden innerhalb der jeweiligen Behandlungsschemata mit dem Inhibitor-Futter gefüttert. Als Kontrollen wurden Tiere mit dem jeweils gleichen Genotyp gewählt, die nur Zugang zu normalem Futter ohne den Inhibitor hatten.

## 2.4 Gewebepräparation und -fixierung

Zu Beginn der Präparation wurden die Versuchstiere tierschutzgerecht mittels CO<sub>2</sub> getötet und anschließend mit Heparin haltiger 1% phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) perfundiert, welche transkardial zugeführt wurde.

Um das Gewebe für die Immunhistochemie zu gewinnen, wurden der Nervus femoralis sowie der Musculus flexor digitorum brevis herauspräpariert, in O.C.T. Medium eingebettet und in durch flüssigen Stickstoff gekühltem Methylbutan eingefroren. Anschließend wurde das Gewebe bei -20°C gelagert.

Der N. femoralis sowie der M. flexor digitorum brevis wurden an einem Kryostat (Leica) zu 10µm dünnen Querschnitten verarbeitet und weiterhin bei -20°C aufbewahrt.

Für die Untersuchungen mittels Elektronenmikroskopie wurden die Mäuse im Anschluss an die Perfusion mit PBS/Heparin für eine Dauer von 10 Minuten mit 4% Paraformaldehyd (PFA) und 2% Glutaraldehyd in 0,1M Cacodylatpuffer perfundiert, der N. femoralis, N. plantaris, N. ischiadicus sowie die lumbalen Wurzeln L4/L5 entnommen und in selbiger Lösung bei 4°C über Nacht postfixiert. Danach erfolgten die Osmifizierung des Gewebes mit 2% Osmiumtetroxid (OsO<sub>4</sub>) in 0,1M Cacodylatpuffer und eine Dehydrierung mittels aufsteigender Acetonreihe. Anschließend wurde es in Spurr's Medium eingebettet.

Die Ultradünn-Schnitte (80nm) sind nach Aufbringen auf Kupfergrids mit Bleicitrat kontrastiert und für die elektronenmikroskopische Analyse verwendet worden. Semidünn-Schnitte (0,5µm) wurden mit Methyleneblau gefärbt und daraufhin lichtmikroskopisch analysiert.

## 2.5 Immunhistochemische F4/80 Färbung

Um endoneurale Makrophagen zu quantifizieren, sind wie bereits in früheren Studien beschrieben 10µm dünne Querschnitte des N. femoralis mittels einer F4/80-Färbung angefärbt worden (Groh et al., 2012). Nach dem Waschen mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS), wurden die Schnitte mit einem Primärantikörper Ratte-anti-Maus (1:300; Serotec) über Nacht inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden die Schnitte erneut mit PBS gewaschen und sind anschließend zur Detektion der Makrophagen mit einem Cy3-konjugiertem Ziege anti-Ratte IgG Sekundärantikörper (1:300; Dianova) versehen worden. Daraufhin erfolgte eine Kernfärbung mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI, 1:500.000, Sigma-Aldrich). Nach einem letzten Waschschrift mit 0,1M PBS wurden die Querschnitte mit Aqua-Poly/Mount® eingedeckelt.

Die digitalen fluoreszenz- und lichtmikroskopischen Bilder wurden mit einem Axiophot 2 (Zeiss), das mit einer CCD-Kamera (Visitron Systems) ausgestattet ist, aufgenommen und mit GNU Image Manipulation Program (GIMP, Version 2.8) bearbeitet.

Auf jeweils sieben bis zehn Querschnitten wurden die Makrophagen ausgezählt und anschließend ein Mittelwert gebildet.

## 2.6 Immunhistochemische Färbung neuromuskulärer Endplatten

Für die Quantifizierung der intakten Innervation von neuromuskulären Endplatten sind 10µm dünne Querschnitte des M. flexor digitorum brevis untersucht worden. Um unspezifische Antikörperbindungsstellen zu blocken, wurden die Schnitte mit 5% bovinem Serumalbumin (BSA) und 0,3% Triton X-100 in 0,1M PBS inkubiert.

Im Anschluss erfolgte die Detektion der Präsynapsen mittels eines Meerschweinchen anti-Maus Synaptophysin-Primärantikörpers (1:500, 101004, Synaptic Systems, 4°C) mit 1%BSA/0,3% Triton X-100 in 0,1M PBS (Inkubation bei 4°C über Nacht) sowie eines Cy3-konjugiertem Esel anti-Meerschweinchen IgG Sekundärantikörpers (1:300, 706-165-148, Dianova).

Die Postsynapsen sind mit einem mit Alexa Fluor 488 konjugiertem  $\alpha$ -Bungarotoxin (1:300, B-13422, Molecular Probes) gekennzeichnet worden und anschließend mit Aqua-Poly/Mount® eingedeckelt.

Mindesten 100 Synapsen pro Tier wurden ausgezählt und entweder als komplett innerviert, teilweise innerviert oder denerviert beurteilt.

Aufgrund eines defekten Gefrierschranks ergab sich ein Verlust gelagerter Präparate des *M. flexor digitorum brevis* in der Cx32def Rebound Gruppe. Daher konnte im Rahmen dieser Arbeit in der betroffenen Gruppe leider keine Auswertung der neuromuskulären Innervation durchgeführt werden.

## 2.7 Elektronenmikroskopie

Die Herstellung der Ultradünnschnitte für elektronenmikroskopische Analysen des *N. femoralis* wurde wie oben bereits beschrieben durchgeführt.

Daraufhin wurden die Multiple Image Alignments (MIA) mit einer ProScan SlowScan CCD (ProScan) Kamera, die an ein Leo 906 E Elektronenmikroskop (Zeiss) gekoppelt war, aufgenommen und mittels der entsprechenden Bildgebungssoftware iTEM (Soft Imaging System) untersucht.

Abnorm myelinisierte Axone, bestehend aus dünn- und demyelinisierten Axonen, Schaumzellen, periaxonale Vakuolen, sowie Regenerationsbündel wurden in Relation zu der Gesamtanzahl der Axone im Nervenquerschnitt ausgezählt.

## 2.8 Greiftest

Um die maximale Greifkraft in den Hinterbeinen der Mäuse zu messen, wurde ein Grip Strength Meter (Columbus Instruments, Columbus, OH, USA) verwendet:

Die Mäuse sind mit ihren Hinterbeinen auf dessen Haltestange gesetzt und anschließend unter konstantem Kraftaufwand von der Stange heruntergezogen worden. Die Messungen sind an drei aufeinanderfolgenden Tagen zur gleichen Uhrzeit durchgeführt worden mit jeweils zehn Messungen pro Tag. Pro Messung wurde die maximale Greifkraft der Maus notiert und anschließend die Mittelwerte der Genotypgruppen miteinander verglichen. In direkt miteinander verglichenen Gruppen sind alle Tiere desselben Geschlechts, sodass intergeschlechtliche Kraftunterschiede ausgeschlossen werden können.

Um gewichtsbedingte Kraftunterschiede auszuschließen, sind die Tiere vor der ersten Messung gewogen worden.

## 2.9 Elektrophysiologische Messungen

Um die elektrophysiologischen Messungen durchzuführen, wurden die mit dem CSF-1-Rezeptor-Inhibitor behandelten Tiere sowie Tiere der Kontrollgruppe mit 8µl pro Gramm Körpergewicht Xylavet- und Ketavet-haltigem Anästhetikum per intraperitonealer Injektion anästhesiert. Um die Körpertemperatur der Mäuse aufrechtzuerhalten, wurden die Tiere auf eine Wärmeplatte gelegt. Zudem erfolgten während der elektrophysiologischen Untersuchungen regelmäßige Kontrollen der Körpertemperatur, welche stets zwischen 34 und 36°C lag.

Die genaue Durchführung erfolgte wie bereits beschrieben (Zielasek et al., 1996; Klein et al., 2015b).

Zur distalen Stimulation wurden die Elektroden nahe der Incisura ischiadica maior (sciatic notch) platziert, die proximale Stimulation erfolgte durch Elektroden am Knöchel (Nervus tibialis). Im Fußmuskel nahe der Ferse befand sich die ableitende Elektrode. Zudem wurde eine subkutane Referenzelektrode platziert. Die Stimulation der Nerven wurde supramaximal durchgeführt und es wurden folgende Parameter erhoben: Die Muskelsummenaktionspotentiale (CMAP= compound muscle action potential) dienen als Marker für den axonalen Schaden sowohl bei proximaler als auch bei distaler Stimulation. Die Nervenleitgeschwindigkeit (NCV= nerve conduction velocity) und die F-Wellen-

Latenzen galten als Maß für Schäden der Myelinscheiden. Alle Messungen erfolgten auf der linken Seite.

Für die Versuchsdurchführungen wurde ein Digital Neurosoft-Evidence 3102 Elektromyograph verwendet. Alle elektrophysiologischen Messungen wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Dennis Klein durchgeführt, der hinsichtlich des Behandlungsstatus und des Genotyps geblindet war.

## 2.10 Statistische Auswertung

Die Untersucherin war hinsichtlich aller morphologischen Analysen und Quantifizierungen gegenüber Behandlungsstatus und Genotyp geblindet.

Um die nötigen Stichprobengrößen abzuschätzen, wurde das G\*Power Programm (3.1.3) genutzt. Mithilfe des Shapiro-Wilk Tests wurden die Daten auf Normalverteilung geprüft. Zusätzlich erfolgte die Testung auf Varianzgleichheit mittels des Leven-Tests. Eine einfaktorielle Varianz-Analyse (One-Way ANOVA) ermöglichte die Berechnung von Signifikanzen für den Vergleich von mehr als zwei Gruppen mit normalverteilten Daten. Anschließend erfolgte die Bonferroni-Holm-Korrektur bzw. Tukey-Korrektur. Für den Vergleich mehrerer Gruppen mit nicht normal verteilten Daten wurde der parameterfreie Kruskal-Wallis-Test verwendet. Daraufhin erfolgte ebenfalls die Bonferroni-Holm-Korrektur bzw. Tukey-Korrektur.

Für die Erstellung der Diagramme wurde Microsoft Excel 2016 verwendet. Die statistischen Analysen wurden mit dem Programm PASW Statistics 18 (SPSS, IBM) erstellt.

Wenn nicht anders gekennzeichnet, sind die Daten als Mittelwerte plus Standardabweichung aufgeführt. Signifikante Unterschiede sind mit # oder \* kenntlich gemacht. Das Signifikanzniveau unterscheidet sich hierbei wie folgt: \*/# entspricht  $p < 0,05$ ; \*\*/## entspricht  $p < 0,01$ ; \*\*\*/### entspricht  $p < 0,001$ . Die Abkürzung n.s. kennzeichnet relevante nicht signifikante Unterschiede.

### 3 Ergebnisse

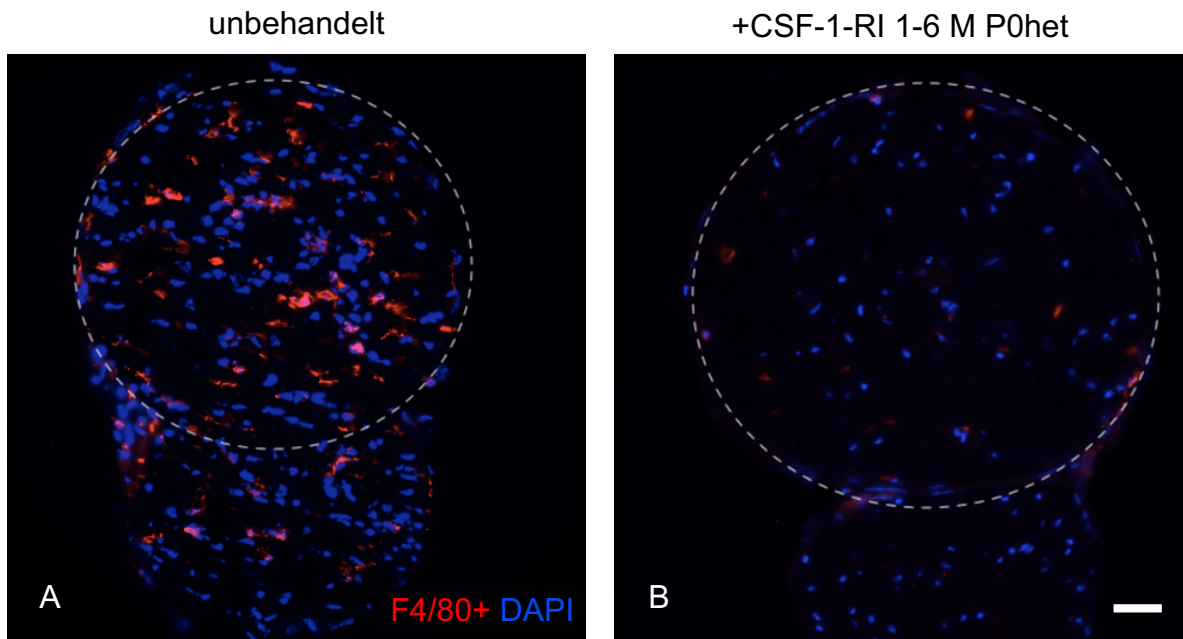
#### 3.1 Behandlung von P0het Mäusen mit dem CSF-1-Rezeptor-Inhibitor

##### 3.1.1 CSF-1-RI-Behandlung führt zu einer Reduktion der Makrophagen im Nervus Quadriceps

Um einen Effekt der CSF-1RI-Behandlung auf die endoneurale Makrophagenanzahl untersuchen zu können, sind immunhistochemische Färbungen mit dem Makrophagenmarker F4/80 durchgeführt worden. Frühere Studien belegten, dass P0het Mutanten vermehrt endoneurale Makrophagen aufweisen und diese durch eine CSF-1-Rezeptorinhibition reduziert werden können (Klein et al., 2015b).

Erwartungsgemäß zeigten unbehandelte P0het Mutanten eine signifikant erhöhte Anzahl an Makrophagen gegenüber Wildtypen. Abhängig vom jeweiligen Behandlungsschema und Alter der Mäuse waren unterschiedliche Effekte auf die Makrophagenpopulation zu beobachten.

In 6 Monate alte P0het-Mutanten erzielte eine präventive Gabe des CSF-1-RI eine signifikante Verminderung der Makrophagenanzahl im Vergleich zu unbehandelten P0het Mutanten (**Abbildung 3**).



### F4/80+ Makrophagen 6 M

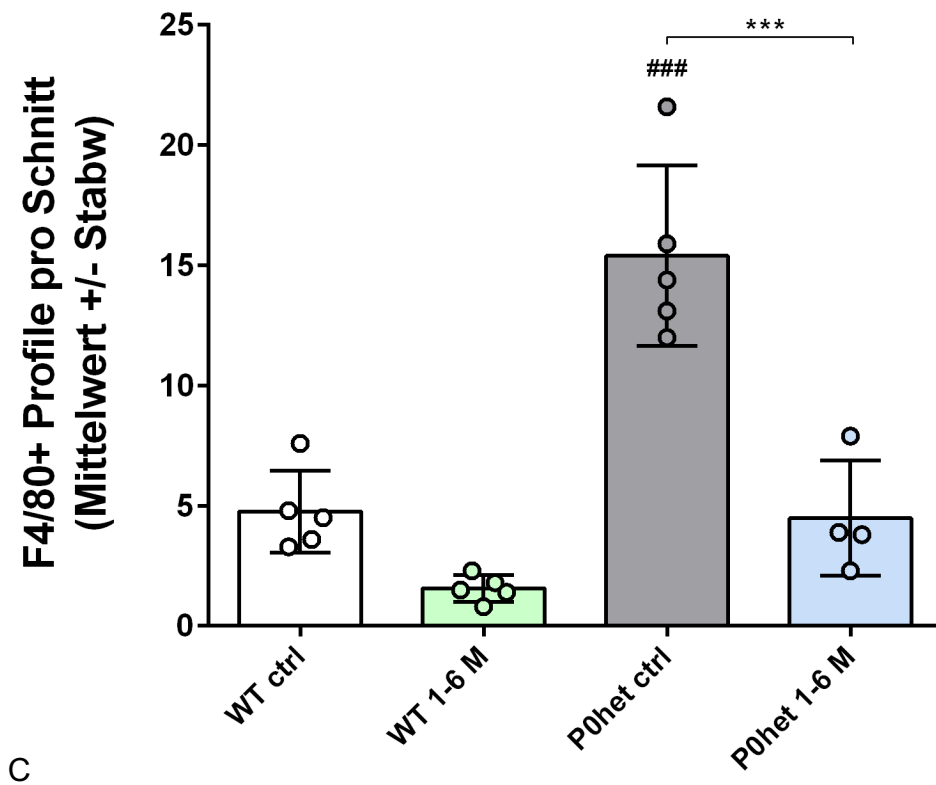


Abbildung 3 Signifikante Reduktion der F4/80+ Makrophagen im N. Quadriceps von 6 Monate alten P0het Mäusen nach präventiver CSF-1-RI-Behandlung

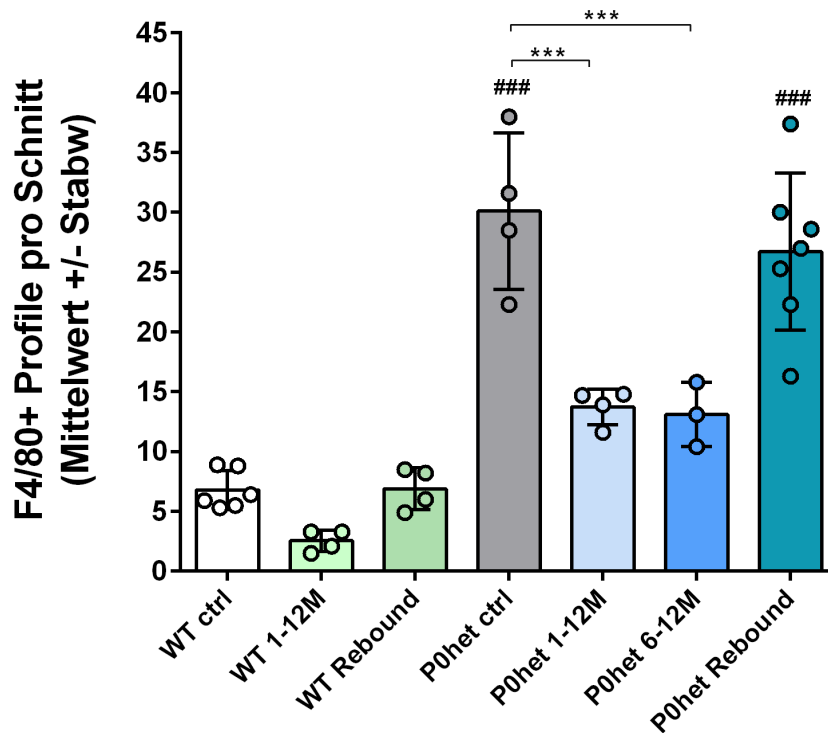


**(A)** F4/80+ Makrophagen (rot) im N. Quadricpes (weiß umrandet) einer P0het Maus. Mittels 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) (blau) wurden die Zellkerne angefärbt. **(B)** Sichtbare Reduktion der Makrophagen durch eine CSF-1-R1-Behandlung vom 1. bis zum 6. Lebensmonat. Maßstab (weiß) 20µm. **(C)** Quantifizierung der F4/80+ Makrophagenprofile im N. Quadriceps: signifikante Abnahme F4/80+ Makrophagenprofile in Querschnitten des N. Quadricpes durch eine CSF-1-R1-Behandlung vom 1. bis zum 6. Lebensmonat. WT ctrl n=5, WT 1-6M n=5, P0het ctrl n=5, P0het 1-6M n=4  
# = Signifikanz zum WT, ctrl = Kontrollgruppe

In 12 Monate alten P0het Mutanten (**Abbildung 4**) war insgesamt eine größere Makrophagenpopulation zu beobachten, bei Mutanten ebenso wie bei Wildtypen. Jedoch zeigte sich auch hier bei Tieren im präventiven Behandlungsschema eine entsprechend starke Reduktion der Makrophagenanzahl, die auch ultrastrukturell beobachtet werden konnte (**Abbildung 5**).

Ein ähnlicher Effekt war auch im therapeutischen Ansatz zu erkennen, hier erfolgte ebenfalls eine signifikante Reduktion der Makrophagen im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren, wohingegen in der Rebound-Gruppe 6 Monate nach Therapieende nur eine leicht verringerte endoneurale Makrophagenanzahl beobachtet werden konnte.

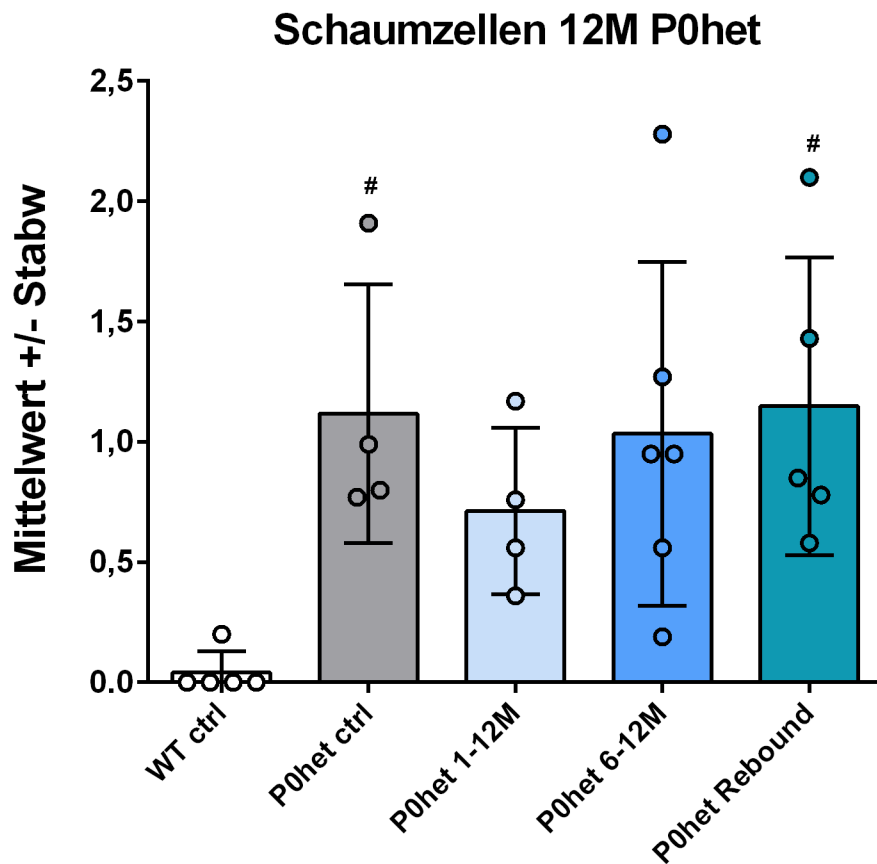
## F4/80+ Makrophagen 12M



**Abbildung 4** Signifikante Reduktion von F4/80+ Makrophagen im N. Quadriceps von 12 Monate alten P0het Mäusen nach präventiver und therapeutischer CSF-1-R1-Behandlung

*Im Vergleich zu den Wildtypen zeigen die P0het Tiere der Kontrollgruppe eine Zunahme von F4/80+ Makrophagen im N. Quadriceps. Durch eine präventive (1-12 Monate) und therapeutische (6-12M) Behandlung kommt es zu einer signifikanten Reduktion von endoneuralen Makrophagen. Im Rebound-Therapieschema ist nur eine leichte Abnahme der Makrophagenanzahl zu beobachten. WT ctrl n=6, WT 1-12 n=4, WT Rebound n=4, P0het ctrl n=4, P0het 1-12M n=4, P0het 6-12M n=3, P0het Rebound n=7*

*# = Signifikanz zum WT, ctrl= Kontrollgruppe*



**Abbildung 5 Reduktion von Schaumzellen in elektronenmikroskopischer Bildgebung**

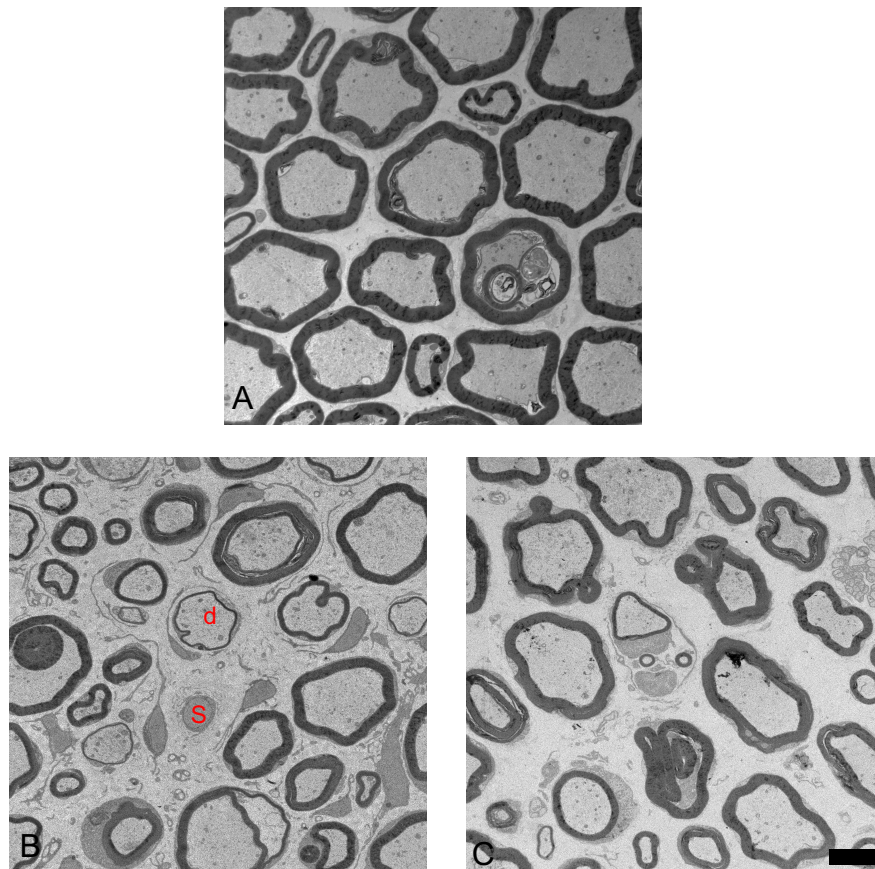
*Eine präventive Gabe des CSF-1-R1 kann eine Verbesserung erzielen: Im Vergleich zu der Kontrollgruppe sind Schaumzellen (phagozytierende Makrophagen) in ihrer Anzahl deutlich vermindert. WT n=5, P0het ctrl n=4, P0het 1-12M n=4, P0het 6-12M n=6, Rebound n= 5*

*# = Signifikanz zum WT, ctrl= Kontrollgruppe*

### 3.1.2 Verbesserung ultrastruktureller Parameter nach präventiver Gabe des CSF-1-R1

Neben einer erhöhten Makrophagenanzahl im N. Quadriceps sind in P0het Mäusen typische ultrastrukturelle Veränderungen des Nerv-Phänotypen zu beobachten. Die im Vergleich zu anderen CMT1-Formen verhältnismäßig milde Neuropathie zeigt Korrelate der Demyelinisierung. Hierzu zählen unter anderem

abnormal dünn- oder demyelinisierte Axone, periaxonale Vakuolen und Schaumzellen, welche Myelin-phagozytierende Makrophagen sind (Martini et al., 1995; Shy et al., 1997). Vorige Studien zeigten, dass durch eine CSF-1-Defizienz in P0het Mäusen ein verbesserter Nerv-Phänotyp beobachtet werden konnte (Carenini et al., 2001). Auch eine medikamentöse Inhibition des CSF-1-Rezeptors hatte einen positiven Einfluss auf den Nerv-Phänotyp P0het Mäuse (Klein et al., 2015b). Daher wurde in dieser Arbeit weiterführende Behandlungsstudien mit einem oral applizierten CSF-1-Rezeptor-Inhibitor durchgeführt, die untersuchen, zu welchen Zeitpunkten innerhalb des Krankheitsverlaufes eine erfolgreiche Therapie noch möglich ist (**Abbildung 6, Abbildung 7, Abbildung 8**).



**Abbildung 6** Verbesserung ultrastruktureller Parameter im N. Quadriceps in 12 Monaten alten präventiv behandelten P0het Mäusen

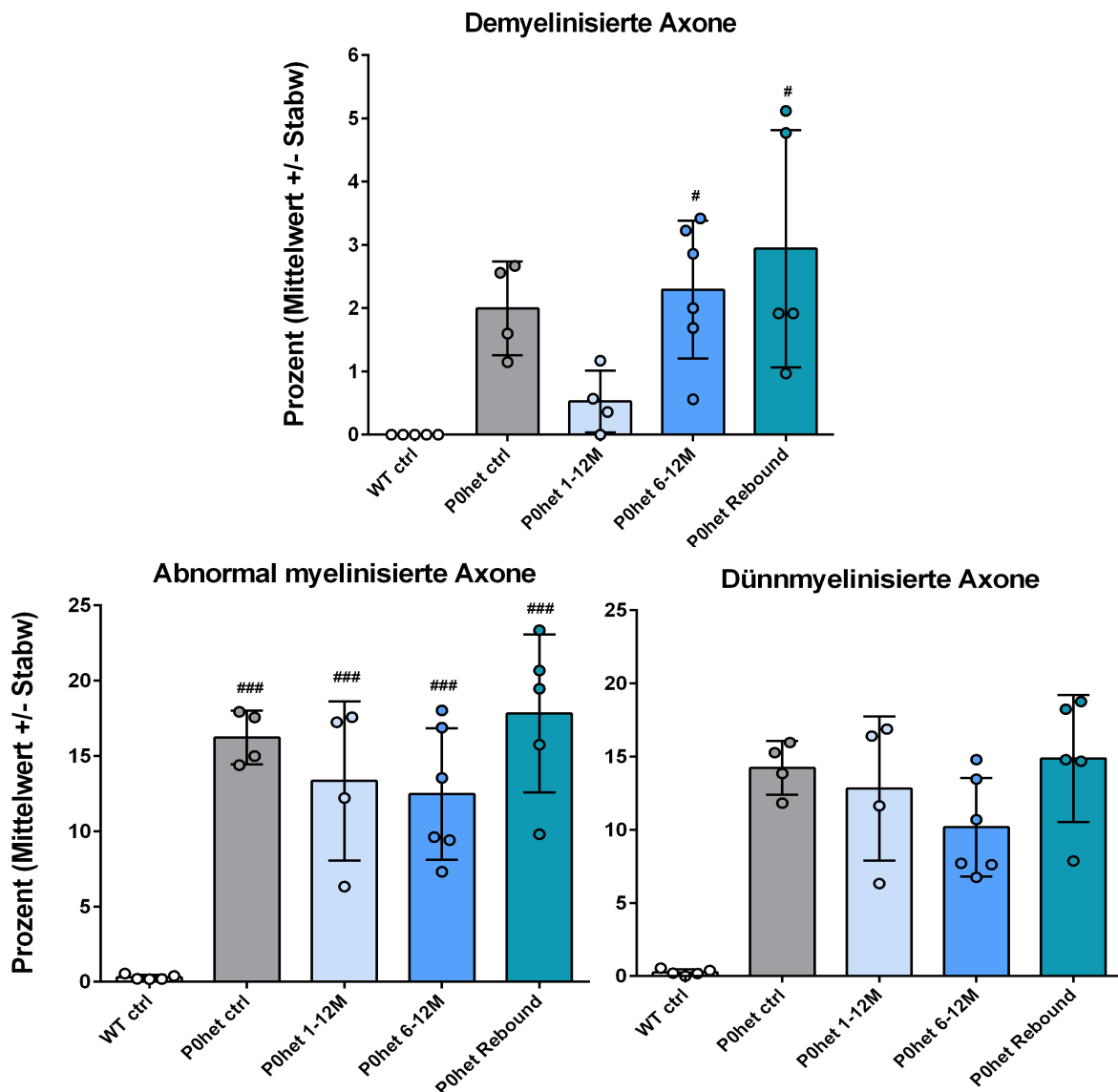
(A) Elektronenmikroskopische Darstellung des N. Quadriceps von 12 Monate alten Wildtypen und (B) unbehandelten P0het Mäusen sowie (C) präventiv

*behandelten P0het Tieren. Unbehandelte P0het Tiere zeigen im Vergleich zu Wildtypen eine deutliche Verschlechterung ultrastruktureller Parameter wie z.B. dünn- oder demyelinisierte Neurone (d) und eine vermehrte Anzahl an Schaumzellen (S). In präventiv behandelten Tieren ist im Vergleich zu den Kontrolltieren eine Verbesserung der Myelinisierung erkennbar. Ebenso ist hier im Vergleich zu unbehandelten P0het Mäusen eine verringerte Anzahl an Schaumzellen ersichtlich. Maßstab (schwarz) 5  $\mu$ m.*

Erwartungsgemäß zeigten unbehandelte P0het Tiere im Vergleich zu Wildtypen eine stark erhöhte Anzahl an abnormal dünn- oder demyelinisierten sowie degenerierten Axonen. Auch Schaumzellen, periaxonale Vakuolen und Regenerationsbündel waren vermehrt zu beobachten.

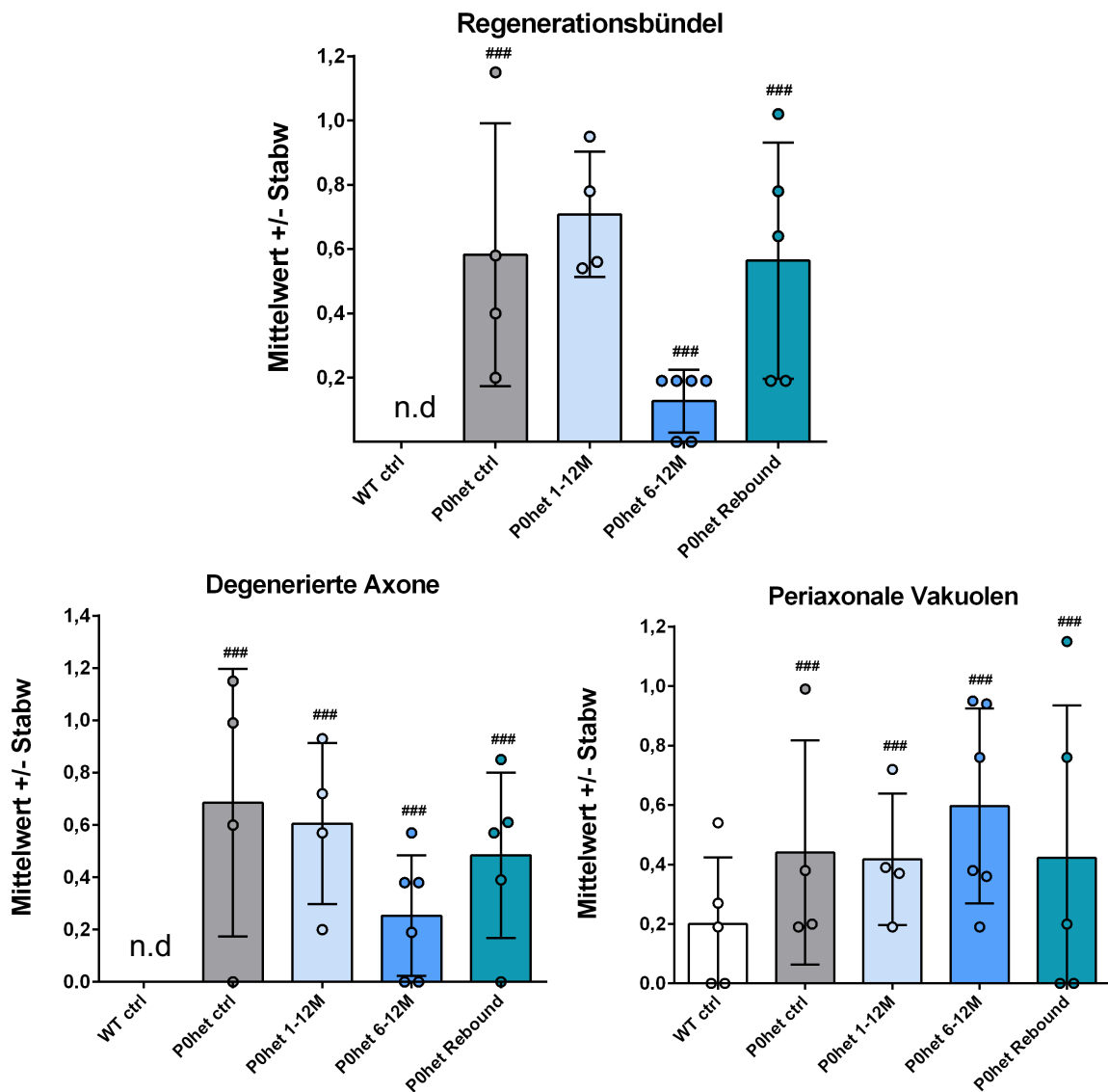
Die präventive Gabe des CSF-1-RI erbrachte eine deutliche Verbesserung einiger ultrastruktureller Parameter: Demyelinisierte Axone und Schaumzellen waren in ihrer Anzahl vermindert; Regenerationsbündel hingegen vermehrt quantifizierbar.

Der therapeutische Behandlungszweig wies eine Reduktion dünnmyelinisierter sowie bei demyelinisierter Axonen auf, wohingegen das Rebound-Schema in nahezu keiner untersuchten Kategorie verbesserte Ergebnisse erzielte.



**Abbildung 7 Deutliche Tendenz zur Reduktion demyelinisierter Axone in P0het Mäusen nach präventiver Gabe des CSF-1-R1**

*Im Vergleich zu Wildtypen zeigen unbehandelte Kontrolltiere verschlechterte ultrastrukturelle Parameter. Eine präventive Gabe des CSF-1-R1 kann im Vergleich zu Wildtypen eine deutliche Tendenz zur Verbesserung erzielen: Demyelinisierte Axone sind in ihrer Anzahl stark vermindert. Die therapeutische Behandlung weist einen Trend zur Abnahme dünnyelinisierter Axone auf. WT n=5, P0het ctrl n=4, P0het 1-12M n=4, P0het 6-12M n=6, Rebound n= 5. # = Signifikanz zum WT, ctrl= Kontrollgruppe*



**Abbildung 8 Verbesserung weiterer ultrastruktureller Parameter in P0het Mäusen nach präventiver und therapeutischer Gabe und des CSF-1-R1**

Im Vergleich zu Wildtypen zeigen unbehandelte Kontrolltiere verschlechterte ultrastrukturelle Parameter. Eine präventive Gabe des CSF-1-R1 kann eine Verbesserung erzielen: Regenerationsbündel sind vermehrt quantifizierbar; degenerierte sowie abnormal myelinisierte Axone sind in ihrer Anzahl verringert. Auch therapeutisch behandelte Tiere weisen bei degenerierten Axonen verbesserte Werte auf. Das Rebound-Schema zeigt keinerlei signifikante Verbesserung der ultrastrukturellen Parameter. WT n=5, P0het ctrl n=4, P0het 1-

12M n=4, P0het 6-12M n=6, Rebound n= 5. n.d.= nicht detektierbar. # = Signifikanz zum WT, ctrl= Kontrollgruppe

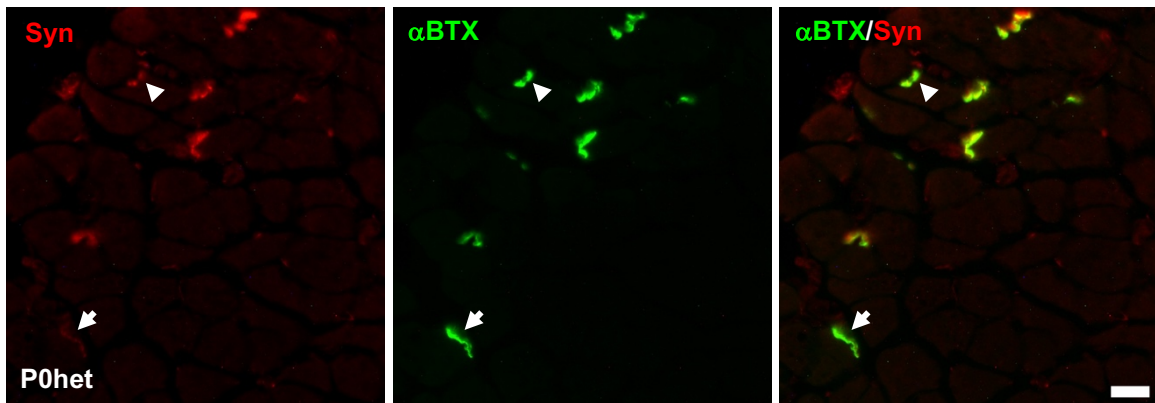
### 3.1.3 Verbesserte neuromuskuläre Innervation im Rebound Therapieschema sowie nach präventiver Gabe des CSF-1-RI

Die CMT-Neuropathie verursacht nicht nur eine Zunahme der endoneuralen Makrophagenpopulation sowie einen verschlechterten Nerv-Phänotypen, sondern schränkt auch die Funktion der neuromuskulären Endplatten ein. Diese sind mit andauerndem Krankheitsverlauf zunehmend de- oder nur partiell innerviert (Klein et al., 2015b).

Um den Effekt der CSF-1-RI-Behandlung auf die neuromuskuläre Innervation zu beobachten, sind immunhistochemische Färbungen des M. flexor digitorum brevis (FDB) angefertigt worden (**Abbildung 9**). In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass ein verbesserter Nerv-Phänotyp eine verbesserte Innervierung der Muskeln verursacht (Klein et al., 2015b). Aufgrund dieser Ergebnisse erfolgte eine Untersuchung des Zielorgans. Präsynapsen wurden mit Synaptophysin und einem Cy3-konjugiertem Esel anti-Meerschweinchen IgG Sekundärantikörper eingefärbt, Postsynapsen wurden mit Hilfe des fluoreszierenden  $\alpha$ -Bungarotoxins detektiert.

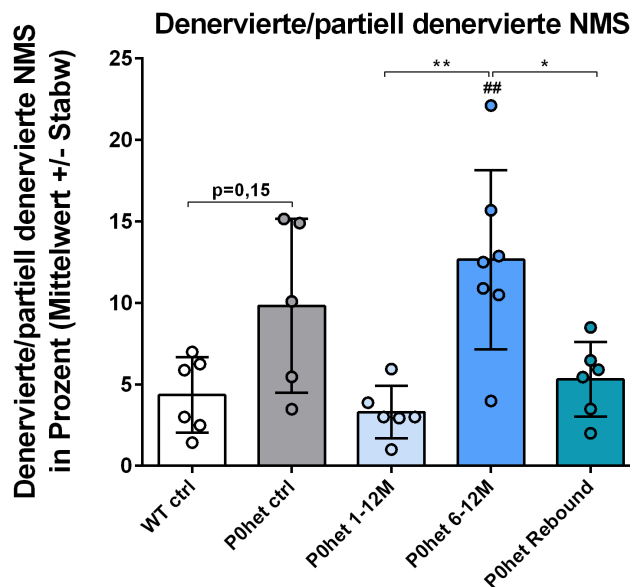
Die Quantifizierung der neuromuskulären Synapsen (NMS) (**Abbildung 10**) ergab, dass 12 Monate alte P0het Mutanten eine deutliche Zunahme an abnormal innervierten Synapsen aufzeigten, wie bereits in vorausgegangen Studien beschrieben (Klein et al., 2015b). Die präventive Behandlung mit dem CSF-1-RI führte zu einer verminderten Anzahl an abnormal innervierten Synapsen. Selbiges konnte auch bei Tieren der Rebound-Gruppe beobachtet werden. Interessanterweise wiesen die therapeutisch behandelten Tiere keine Verbesserung auf.





**Abbildung 9** Immunhistochemische Färbungen neuromuskulärer Synapsen eines P0het Tieres

Exemplarische Darstellung der immunhistochemisch angefärbten NMS eines unbehandelten P0het Tieres. Präsynapsen wurden mit Synaptophysin (rot) und Postsynapsen mit  $\alpha$ -Bungarotoxin (grün) angefärbt. Die Pfeile zeigen denervierte, die Pfeilspitzen partiell denervierte Synapsen an. Maßstab (weiß) 20  $\mu$ m.



**Abbildung 10** Quantifizierung der neuromuskulären Synapsen in P0het Mäusen

Im Vergleich zu den Wildtypen zeigen unbehandelte P0het Mäuse eine starke Zunahme an abnormal innervierten Synapsen. Durch die präventive Behandlung

*mit dem CSF-1-RI kann im Vergleich zu den therapeutisch behandelten Tieren eine signifikante Reduktion abnormal innervierter Synapsen erreicht werden. Das Rebound-Therapieschema erbringt im Vergleich zu den therapeutisch behandelten Tieren ebenfalls eine signifikante Reduktion in der Anzahl abnormal innervierter Synapsen. Präventiv behandelte sowie Tiere aus dem Rebound-Schema weisen im Vergleich zu einander ähnliche Tendenzen auf; durch beide Therapie-Schemata kann eine deutliche Reduktion der abnormal innervierten Synapsen erreicht werden. WT n=6, P0het ctrl n=5, P0het 1-12M n=6, P0het 6-12M n=7, P0het Rebound n=6, ctrl= Kontrollgruppe*

### 3.1.4 CSF-1-RI-Behandlung erbringt keine signifikante Verbesserung der elektrophysiologischen Parameter

Um zu untersuchen, ob die verringerte Denervation in Muskeln CSF-1-RI behandelter P0het Mäuse zu einer funktionellen Verbesserung führt, wurden elektrophysiologische Studien durchgeführt (**Abbildung 11**).

Vorherige Studien bestätigten die These, dass die voranschreitende Demyelinisierung der peripheren Neurone in CMT1-Mausmodellen durch Makrophagen eine Verlangsamung der Nervenleitgeschwindigkeit (NCV) sowie eine vergrößerte F-Wellen-Latenz verursacht (Klein et al., 2015b). Die F-Wellen-Latenz ermöglicht es, die Nervenleitgeschwindigkeit des gesamten peripheren Nerven inklusive seiner proximalen Anteile zu erfassen. Als Ausmaß des axonalen Schadens dienen Messungen der Muskelsummenaktionspotentiale (CMAP), welche in Folge der axonalen Schädigung verringert sind.

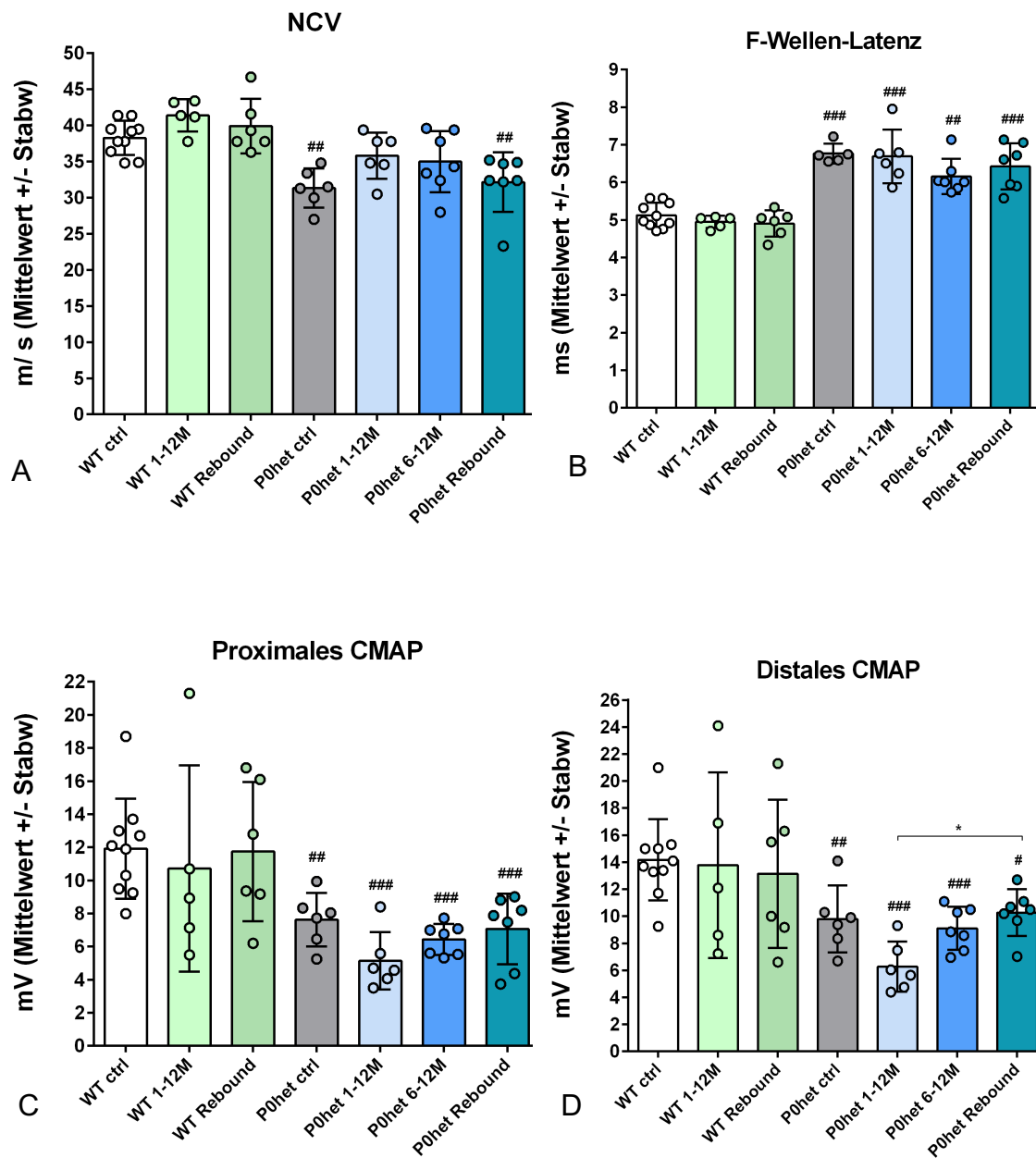
Erwartungsgemäß zeigten die 12 Monate alten P0het Mutanten der Kontrollgruppe eine Verminderung der Nervenleitgeschwindigkeit und eine verlängerte F-Wellen-Latenz im Vergleich zu gleichaltrigen Wildtypen. Die proximalen und distalen Muskelsummenaktionspotentiale waren ebenfalls verringert.

Eine präventive Behandlung mit dem CSF-1-RI erzielte eine geringere Abnahme der Nervenleitgeschwindigkeit und eine leicht verringerte F-Wellen-Latenz im Vergleich zu der Kontrollgruppe. Jedoch waren interessanterweise das proximale

und distale Muskelsummenaktionspotential vergleichend zu der Kontrollgruppe stark vermindert.

Auch bei therapeutisch behandelten P0het Mutanten konnte ein Effekt der CSF-1-RI-Behandlung auf elektrophysiologische Parameter beobachtet werden: Hier zeigten sich ebenfalls eine Verbesserung der Nervenleitgeschwindigkeit und eine Verringerung der F-Wellen-Latenz im Vergleich zu der Kontrollgruppe. Das distale Muskelsummenaktionspotential war im Vergleich zu der Kontrollgruppe leicht verbessert.

Rebound-Tiere wiesen im Vergleich zu der Kontrollgruppe eine leicht verbesserte Nervenleitgeschwindigkeit auf, die jedoch nicht die Werte der therapeutisch behandelten Tiere erreichte. Auch die F-Wellen-Latenz konnte im Vergleich zu der Kontrollgruppe leicht vermindert werden, der Effekt war jedoch ebenfalls nicht so stark wie bei therapeutisch behandelten Tieren. Interessanterweise erzielte die CSF-1-RI-Gabe bei diesem Behandlungsschema eine Verbesserung der Muskelsummenaktionspotentiale, deren Werte sowohl über dem der präventiv als auch therapeutisch behandelten Tiere lagen.



**Abbildung 11 Elektrophysiologische Messungen in 12 Monate alten P0het Mäusen**

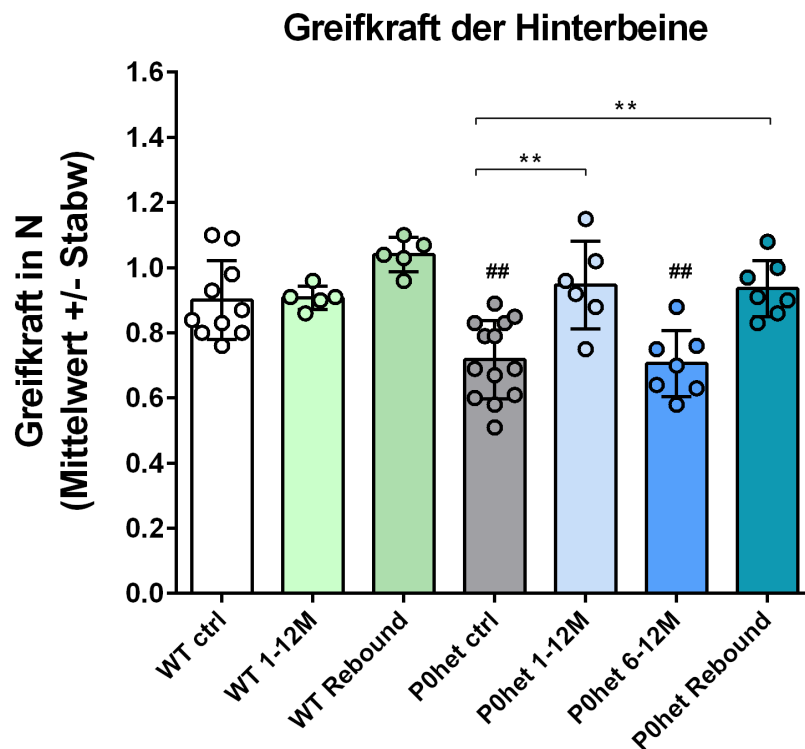
Wildtypen zeigen im Vergleich zu den P0het Kontrolltieren gebesserte elektrophysiologische Parameter; eine CSF-1-R1-Therapie ergab hier keine relevante Verbesserung. In der präventiv sowie in der therapeutisch behandelten Gruppe zeigt sich bezüglich der NCV (A) jeweils ein Trend zu verbesserten Werten, wohingegen die Messungen der F-Wellen-Latenz (B) in der

*therapeutisch behandelten sowie in der Rebound-Gruppe leicht verbesserte Werte ergeben. Das proximale CMAP (C) betreffend zeigt sich keine Verbesserung durch die CSF-1-RI-Therapie im Vergleich zu der Kontrollgruppe. Die Werte des distalen CMAP (D) sind in der Rebound-Gruppe im Vergleich zu der präventiv behandelten Gruppe signifikant verbessert. WT n=10, WT 1-12M n=5, WT Rebound n=6, P0het ctrl n=6, P0het 1-12M n=6, P0het 6-12M n=7, P0het Rebound n=7, # = Signifikanz zum WT, ctrl= Kontrollgruppe*

### 3.1.5 Positiver Effekt der CSF-1-RI-Therapie auf die Greifkraft im präventiven sowie im Rebound-Behandlungszweig

Im Rahmen der CMT1-Neuropathie kommt es durch die Demyelinisierung und dem Verlust von Axonen letzten Endes zu einer Muskelatrophie und zu einer verminderten Muskelkraft. Um morphologische Verbesserungen in Relation zur Nerv- bzw. Muskelfunktion zu setzen, wurden Messungen der Greifkraft in den Hinterbeinen der Versuchstiere gemessen (**Abbildung 12**).

Erwartungsgemäß zeigten die P0het Mutanten im Vergleich zu den Wildtypen einen Verlust in der Greifkraft der Hinterbeine. Die präventive Gabe des CSF-1-RI erzielte eine Verbesserung der Greifkraft, wohingegen die therapeutische Gabe keinen Effekt verzeichnete. In der Rebound-Gruppe waren ähnlich verbesserte Werte in der Greifkraft wie bei präventiv behandelten Tieren zu beobachten.



**Abbildung 12 Weniger reduzierte Greifkraft der Hinterbeine in P0het Mäusen im präventiven und Rebound-Behandlungszweig**

*Unbehandelte Wildtypen zeigen im Vergleich zu den P0het Kontrolltieren eine gebesserte Greifkraft. Eine präventive Gabe des CSF-1-R1 kann signifikant verbesserte Werte erzielen, ebenso wie das Rebound-Therapieschema. Tiere im therapeutischen Behandlungszweig (6-12M) zeigen keine Zunahme in der Greifkraft. WT n=12, WT 1-12M n=5, WT Rebound n=5, P0het n=13, P0het 1-12M n=6, P0het 6-12M n=7, P0het Rebound n=7, # = Signifikanz zum WT, ctrl= Kontrollgruppe*

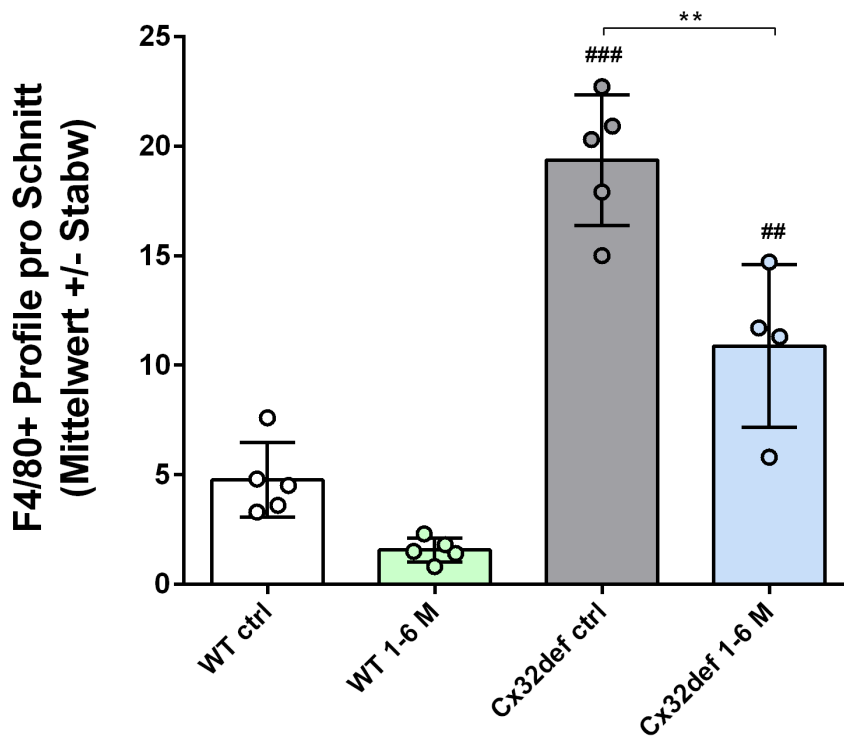
## 3.2 Behandlung von Cx32def Mäusen mit dem CSF-1-Rezeptor-Inhibitor

### 3.2.1 CSF-1-RI-Behandlung führt zu einer Reduktion von Makrophagen im Nervus Quadriceps

Frühere Studien belegten, dass Cx32def Mäuse eine signifikant erhöhte Makrophagenanzahl im Vergleich zu Wildtypen aufweisen (Groh et al., 2015) und durch eine CSF-1-RI-Behandlung eine Reduktion der Makrophagenpopulation erreicht werden kann (Klein et al., 2015b). Zur Detektion dieser Zellen sind immunhistochemische Untersuchungen mit dem Marker F4/80 durchgeführt worden.

Ähnlich zu früheren Studien zeigte sich auch hier bei 6 Monate alten unbehandelten Tieren im Vergleich zu den Wildtypen eine stark erhöhte Makrophagenanzahl im N. Quadriceps. Eine präventive Behandlung vom 1. bis zum 6. Lebensmonat erbrachte eine erhebliche Reduktion der endoneuralen Makrophagen (**Abbildung 13**).

## F4/80+ Makrophagen 6 M



**Abbildung 13** Signifikante Reduktion der F4/80+ Makrophagen im N. Quadriceps von 6 Monate alten Cx32def Mäusen nach präventiver CSF-1-R1-Behandlung

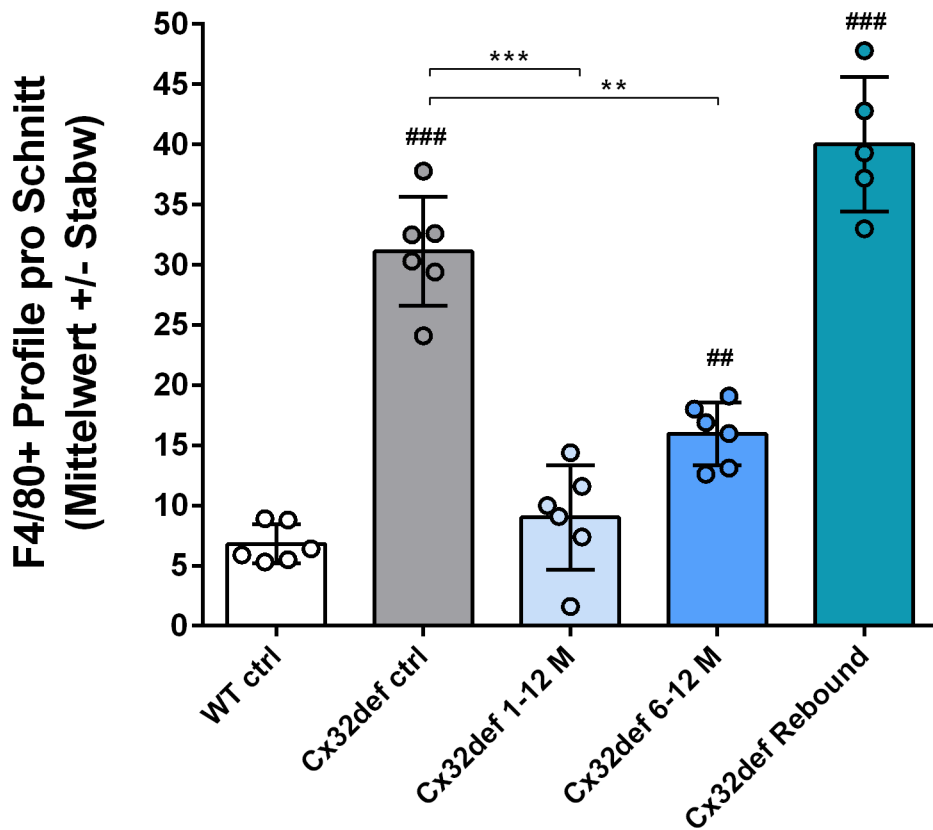
Unbehandelte Cx32def Mutanten zeigen gegenüber Wildtypen eine stark erhöhte Anzahl von endoneuralen F4/80+ Makrophagen. Nach präventiver Gabe des CSF-1-R1 ist eine signifikante Reduktion der F4/80+ Makrophagenprofile zu beobachten. WT ctrl n=5, WT 1-6M n=5, Cx32def ctrl n=5, Cx32def 1-6M n=5, # = Signifikanz zum WT, ctrl= Kontrollgruppe

Cx32def Mutanten, die vom 1. bis zum 12. Lebensmonat mit dem CSF-1-R1 behandelt wurden (**Abbildung 14**), zeigten eine signifikante Reduktion der Makrophagenanzahl im Vergleich zu der Kontrollgruppe. Selbiges konnte auch bei therapeutisch behandelten Tieren beobachtet werden.

Interessanterweise zeigten die Rebound-Tiere im Gegensatz zu den anderen Behandlungsgruppen keine Abnahme von F4/80+ Makrophagenprofilen.



## F4/80+ Makrophagen 12 M



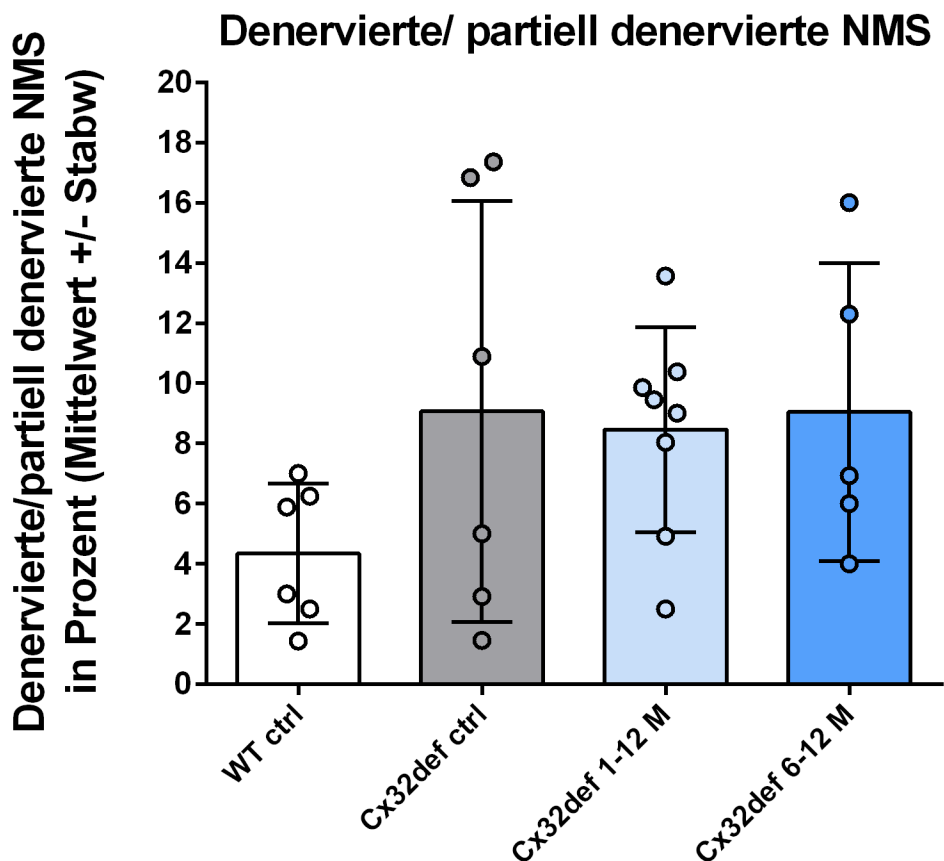
**Abbildung 14** Signifikante Reduktion F4/80+ Makrophagenprofile im N. Quadriceps von 12 Monate alten Cx32def Tieren nach präventiver und therapeutischer CSF-1RI-Gabe

Im Vergleich zu den Wildtypen zeigen die Cx32def Tiere der Kontrollgruppe eine Zunahme von F4/80+ Makrophagen im N. Quadriceps. Durch eine präventive (1-12 Monate) und therapeutische (6-12M) Behandlung kommt es zu einer signifikanten Reduktion von endoneuralen Makrophagen. Die Tiere der Rebound-Gruppe weisen keine Abnahme von F4/80+ Makrophagenprofilen auf. WT ctrl n=6, Cx32def ctrl n=6, Cx32def 1-12M n=5, Cx32def 6-12M n=6, Cx32def Rebound n=5, # = Signifikanz zum WT, ctrl= Kontrollgruppe

### 3.2.2 Verbesserte neuromuskuläre Innervation nach präventiver Gabe des CSF-1-RI

Wie bereits beschrieben, nehmen die demyelinisierenden Prozesse durch einen Verlust von Axonen einen negativen Einfluss auf die neuromuskuläre Innervation. Auch in Cx32def Mutanten konnte mehrfach dieser Effekt nachgewiesen werden, der durch eine CSF-1R-Inhibition abgemildert werden konnte (Klein et al., 2015b). Um in dieser Studie die Auswirkung der Therapie mit dem Rezeptor-Inhibitor untersuchen zu können, sind immunhistochemische Färbungen der neuromuskulären Endplatten angefertigt und anschließend quantifiziert worden (**Abbildung 15**).

Erwartungsgemäß zeigten 12 Monate alte Tiere der Kontrollgruppe im Vergleich zu den Wildtypen eine vermehrte Anzahl an abnormal innervierten Synapsen. Präventiv behandelte Mutanten wiesen im Vergleich zu der Kontrollgruppe eine deutliche Reduktion der denervierten bzw. partiell denervierten Synapsen auf, wohingegen bei therapeutisch behandelten Tieren kein positiver Effekt auf die neuromuskuläre Innervation zu beobachten war.



**Abbildung 15** Verbesserte neuromuskuläre Innervation nach präventiver Gabe des CSF-1-RI

*Im Vergleich zu den Wildtypen zeigen unbehandelte Cx32def Tiere vermehrt denervierte oder partiell denervierte Synapsen. Eine präventive Gabe des CSF-1-RI erzielt eine verbesserte neuromuskuläre Innervation, wohingegen die therapeutische Behandlung keinen positiven Effekt aufweist. WT n=6, Cx32def ctrl n=8, Cx32def 1-12M n=3, Cx32def 6-12M n=5, Cx32def Rebound nicht untersucht (n.u.)*

### 3.2.3 CSF-1-RI-Behandlung erbringt keine signifikante Verbesserung der elektrophysiologischen Parameter

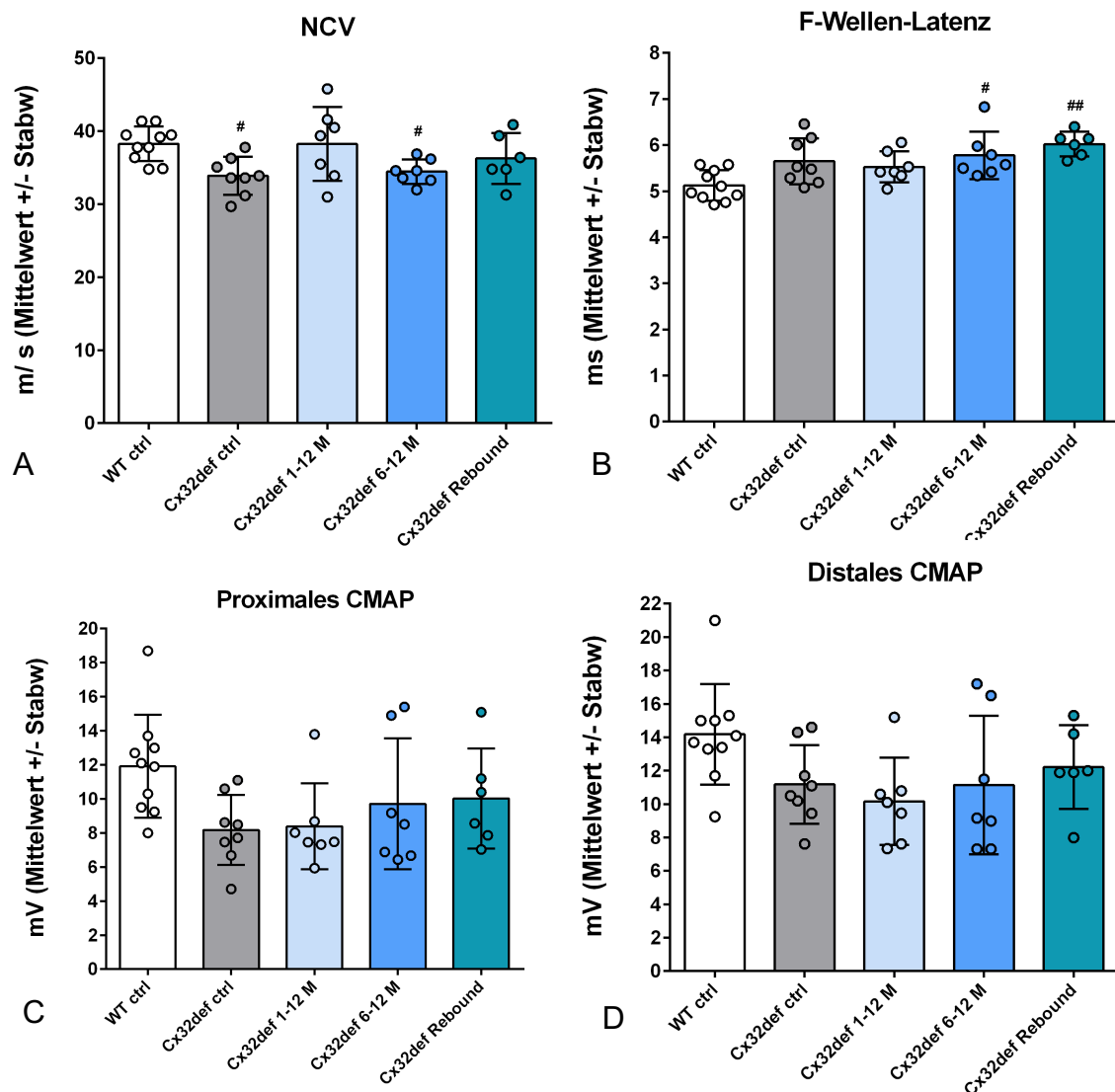
12 Monate alte Cx32def Mäuse der Kontrollgruppe wiesen, wie auch in vorangegangenen Studien beobachtet, eine Reduktion der Nervenleitgeschwindigkeit und eine vergrößerte F-Wellen-Latenz auf. Das

distale sowie das proximale Muskelsummenaktionspotential zeigten sich vermindert (**Abbildung 16**).

Bei präventiv behandelten Tieren war eine verbesserte Nervenleitgeschwindigkeit zu beobachten; die F-Wellen-Latenz zeigte sich leicht verkürzt im Vergleich zu der Kontrollgruppe. Das distale und proximale Summenaktionspotential zeigte keine Verbesserung im Vergleich zu der Kontrollgruppe.

Durch die therapeutische Gabe des CSF-1-RI konnte eine leichte Verbesserung der Nervenleitgeschwindigkeit erzielt werden, die F-Wellen-Latenz war jedoch weiterhin vergrößert. Das proximale Muskelsummenaktionspotential war im Vergleich zu der Kontrollgruppe leicht erhöht, bei dem distalen Muskelsummenaktionspotential war kein Effekt der CSF-1-RI-Therapie zu beobachten.

Rebound-Tiere wiesen im Vergleich zu den Cx32def Kontrollen eine weniger stark reduzierte Nervenleitgeschwindigkeit auf; die F-Wellen-Latenz zeigte sich hingegen nicht verkürzt. Das proximale sowie das distale CMAP waren in Relation zu der Kontrollgruppe leicht gesteigert.



**Abbildung 16 Elektrophysiologische Messungen der NCV/F-Wellen-Latenz in 12 Monate alten Cx32def Mäusen**

Die NCV (A) betreffend weisen die präventiv behandelten Tiere sowie die Rebound Gruppe im Vergleich zu den Kontrolltieren verbesserte Werte auf. Die Messungen der F-Wellen-Latenz (B) zeigen jedoch in keiner der Behandlungsgruppen einen positiven Effekt der CSF-1-RI-Therapie im Vergleich zu den Kontrolltieren.

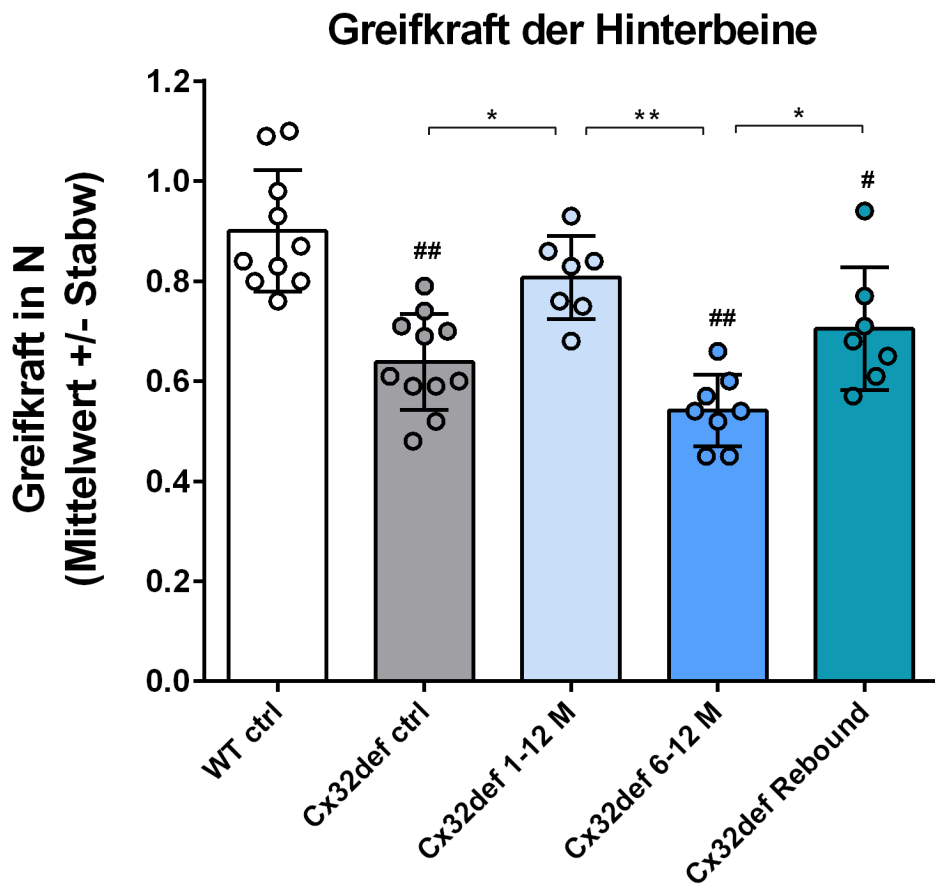
Messungen des proximalen CMAP (C) zeigen verbesserte Werte in der therapeutisch behandelten sowie in der Rebound Gruppe im Vergleich zu den Kontrolltieren. Messungen des distalen CMAP (D) ergeben ähnliche Ergebnisse; auch hier zeigt die Rebound Gruppe im Vergleich zu den Kontrolltieren

*verbesserte Werte, wohingegen die therapeutisch behandelten Tiere keine erhöhten Werte im Vergleich zu der Kontrollgruppe aufweisen. WT n=10, Cx32def ctrl n=8, Cx32def 1-12M n=7, Cx32def 6-12M n=7, Cx32def Rebound n=6, # = Signifikanz zum WT, ctrl= Kontrollgruppe*

### 3.2.4 Positiver Effekt der CSF-1-R1-Therapie auf die Greifkraft im präventiven sowie im Rebound-Behandlungszweig

Cx32def Tiere zeigen ebenso wie P0het Mutanten als Korrelat des Axonverlusts eine Muskelatrophie und folglich eine Verminderung der Greifkraft (Groh et al., 2010). Um den Einfluss der CSF-1-R1-Behandlung auf diesen funktionellen Parameter erfassen zu können, sind Messungen der Greifkraft in den Hinterbeinen der unterschiedlich behandelten Cx32def Mutanten durchgeführt worden (**Abbildung 17**).

Cx32def Tiere der Kontrollgruppe wiesen im Vergleich zu gleichaltrigen Wildtypen erwartungsgemäß eine verminderte Greifkraft auf. Durch die präventive Behandlung mit dem CSF-1-R1 konnte eine Verbesserung in der Greifkraft erzielt werden, wohingegen bei therapeutisch behandelten Tieren kein Effekt verzeichnet werden konnte. Cx32def Mäuse, die dem Rebound-Behandlungsschema zugeordnet waren, wiesen im Vergleich zu der Kontrollgruppe und den therapeutisch behandelten Tieren eine erhöhte Greifkraft auf, jedoch lagen diese Werte immer noch unter denen der präventiv behandelten Tiere.



**Abbildung 17** Weniger reduzierte Greifkraft der Hinterbeine in Cx32def Mäusen im präventiven und Rebound-Behandlungszweig

Unbehandelte Cx32def Mäuse zeigen im Vergleich zu Wildtypen eine verminderte Greifkraft. Die präventive Gabe des CSF-1-R1 (1-12 M) erzielt eine signifikante Zunahme in der Greifkraft im Vergleich zu der Kontrollgruppe. Auch bei Tieren der Rebound-Gruppe kann ein positiver Effekt beobachtet werden. Therapeutisch (6-12 M) behandelte Tiere weisen keine Verbesserung der Greifkraft auf. WT ctrl n=12, Cx32def ctrl n=11, Cx32def 1-12M n=7 Cx32def 6-12M n=8, Cx32def Rebound n=7, # = Signifikanz zum WT, ctrl= Kontrollgruppe

## 4 Diskussion

In vorherigen Studien konnte gezeigt werden, dass sowohl das angeborene als auch das adaptive Immunsystem eine erhebliche Rolle bei der Pathogenese der CMT1 spielen (Klein and Martini, 2016; Martini and Willison, 2016). Hierbei sind Makrophagen als Bestandteil des angeborenen Immunsystems entscheidend in die pathologischen demyelinisierenden Prozesse involviert (Groh et al., 2015; Martini and Willison, 2016). Als Aktivator von Makrophagen nimmt das Zytokin CSF-1 eine zentrale Rolle ein (Groh et al., 2012). Weiterführende Studien zeigten, dass durch eine Inhibition des CSF-1-Rezeptors an Makrophagen ein verbesserter Nervphänotyp und eine deutliche Abmilderung des Krankheitsbildes beobachtet werden konnten (Klein et al., 2015b).

Auf diesen Studienergebnissen basierend sind verschiedene Behandlungsansätze mit einem CSF-1-RI an P0het und Cx32def Mäusen (den CMT1-Unterformen CMT1B und CMT1X entsprechend) durchgeführt worden. Dies hatte zum Ziel, den Einfluss des CSF-1-RI auf histopathologische sowie funktionelle Parameter zu untersuchen.

### 4.1 Die Behandlung von P0het Mäusen mit einem CSF-1-Rezeptorinhibitor führt zu verbesserten histopathologischen und funktionellen Parametern

Abhängig von den verschiedenen Behandlungsansätzen (präventiv, therapeutisch und Rebound) und dem Alter (6 bzw. 12 Monate) waren unterschiedliche Effekte der CSF-1-RI-Therapie zu beobachten.

Immunhistochemische Färbungen mit dem Makrophagenmarker F4/80 zeigten erwartungsgemäß eine vermehrte Makrophagenanzahl in unbehandelten 6 Monate alten P0het Mäusen im Vergleich zu Wildtypen. Eine Behandlung mit dem CSF-1-RI vom 1. bis zum 6. Lebensmonat erbrachte eine signifikante Reduktion der endoneuralen Makrophagen. Auch bei 12 Monate alten unbehandelten P0het Mäusen war die endoneurale Makrophagenanzahl



gegenüber gleichaltrigen Wildtypen erhöht. Im Vergleich zu den 6 Monate alten P0het Mutanten waren insgesamt deutlich mehr Makrophagen zu beobachten. Folglich hat nicht nur die Mutation im *P0*-Gen, sondern auch die Dauer der Erkrankung der P0het Mutanten einen Effekt auf die endoneurale Makrophagenpopulation, da ein Anstieg der Makrophagenanzahl im Zeitraum von 6 bis 12 Monaten zu verzeichnen war. Diese Beobachtung ist in Übereinstimmung mit vorherigen Studien, die einen altersabhängigen Anstieg zwischen 6 und 12 Monaten von endoneuralen Makrophagen in P0het Mutanten zeigen konnte (Carenini et al., 2001).

Sowohl die präventive als auch die therapeutische Gabe des CSF-1-R1 erzielten eine signifikante Reduktion der Makrophagen im N. Quadriceps. Im Rebound Therapieschema war dieser Effekt allerdings nicht zu erkennen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass nach Absetzen des CSF-1-R1 eine Repopulation mit endoneuralen Makrophagen stattfindet. Dieser Effekt konnte bereits eine Woche nach Ende der Therapie im PNS von Wildtypen und Mutanten nachgewiesen werden (Klein und Martini, unpublizierte Daten).

Da sowohl die präventive als auch die therapeutische Gabe des CSF-1-R1 eine signifikante Reduktion der Makrophagen erzielte, lässt dies vermuten, dass der Zeitpunkt für den Beginn der Makrophagendepletion mittels des CSF-1-R1 kein zentraler Faktor ist.

Auch im zentralen Nervensystem (ZNS) sind ähnliche Effekte einer CSF-1-R1-Therapie auf die dort lokalisierten, als Mikroglia bezeichneten Makrophagen bekannt (Elmore et al., 2014; Rice et al., 2017). Mikroglia machen den Großteil der im ZNS vorhandenen Immunzellen aus und nehmen unter anderem eine neuroprotektive Rolle ein (Acharya et al., 2016). Wildtyp-Mäuse, die über mehrere Wochen mit einem CSF-1-R1 behandelt wurden, zeigten eine Mikroglia-Depletion von über 90%. Bereits eine Woche nach Absetzen des CSF-1-R1 zeigte sich vollständige Repopulation der Mikroglia im ZNS (Elmore et al., 2014). Nach einer einwöchigen Behandlung mit dem CSF-1-R1 konnte 7 Tage nach Absetzen der Therapie sogar eine überschießende Repopulation der Mikroglia beobachtet werden (Rice et al., 2017).

Ultrastrukturell konnte ebenfalls ein positiver Effekt der CSF-1-R1-Behandlung verzeichnet werden. In elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigten therapeutisch behandelte P0het Tiere im Vergleich zu der Kontrollgruppe eine Verbesserung des Nervphänotypen. Als Korrelat des Erhalts von Myelinscheiden waren eine deutlich verringerte Anzahl an demyelinisierten Axonen sowie phagozytierenden Makrophagen zu beobachten. Gerade diese Ergebnisse könnten insofern zusammenhängen, als dass die verminderte Anzahl an phagozytierenden Makrophagen die Ursache für den verbesserten Myelinerhalt darstellen könnte. In einer zunehmenden Anzahl von Regenerationsbündeln spiegelte sich ein verbesserter axonaler Erhalt wider. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass ein früher Therapiebeginn sowie eine langfristige Behandlung mit dem CSF-1-R1 für eine nachhaltige Besserung der histopathologischen CMT1-Parameter vonnöten sind. Neue Studien in PMP22tg Mäusen bekräftigen dieser Ergebnisse; hier zeigte sich eine signifikante Verbesserung unter einer Behandlung mit dem CSF-1-R1 ab Tag 0 (Klein, unpublizierte Daten).

In Folge der verbesserten Myelinisierung und des axonalen Erhalts zeigten sich auch die abnormal innervierten Synapsen verringert. Sowohl präventiv behandelte Tiere als auch Mäuse der Rebound-Gruppe zeigten eine deutlich verminderte Anzahl an abnormal innervierten Synapsen. Interessanterweise konnte kein positiver Effekt der CSF-1-R1-Behandlung im therapeutischen Behandlungszweig beobachtet werden. Dies lässt erneut vermuten, dass ein früher Therapiebeginn notwendig ist, um einen relevanten Effekt auf den Krankheitsverlauf zu haben. Studien in Cx32def und P0het Mäusen, die einen Therapiestart mit dem CSF-1-R1 ab dem 3. Lebensmonat untersuchten, ergaben hinsichtlich der histopathologischen und funktionellen Parameter keine signifikante Verschlechterung im Vergleich zum Therapiestart ab dem 1. Lebensmonat (Klein et al., 2015b). Jedoch zeigte sich ein Trend in P0het Mäusen: Ein Therapiebeginn ab dem 1. Lebensmonat erbrachte im Vergleich zu ab dem 3. Lebensmonat behandelten Tieren eine leichte Verbesserung der funktionellen und histopathologischen Parameter. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass in P0het Mäusen ein möglichst früher Therapiestart vorteilhaft

ist, wohingegen in Cx32def Tieren eine Behandlung ab dem 3. Lebensmonat ausreichend ist.

In Übereinstimmung mit der verbesserten neuromuskulären Innervation zeigten sich ähnliche Ergebnisse in funktionellen Parametern wie der Greifkraft. Präventiv behandelte Tiere und Tiere der Rebound-Gruppe zeigten einen Trend zu einer vermehrten Greifkraft, wohingegen therapeutisch behandelte Mäuse keine Zunahme der Greifkraft in den Hinterpfoten aufwiesen. Dies unterstützt die These, dass ein früher Startpunkt für eine Effektivität der Therapie essentiell ist. Im Hinblick auf die Tatsache, dass in der therapeutisch behandelten Gruppe eine signifikante Reduktion der Makrophagen, jedoch keine Verbesserung der funktionellen Parameter zu beobachten ist, kann vermutet werden, dass schon in frühen Krankheitsstadien irreversible pathologische Prozesse durch die Makrophagen hervorgerufen werden. Frühere Studien in Cx32def Mäusen zeigten, dass Makrophagen in engem Zusammenhang mit dedifferenzierten Schwanzzellen stehen (Groh et al., 2015).

Die vorherigen Beobachtungen zusammenfassend, zeigt sich folgendes Ergebnis: Ein früher Therapiestart mit dem CSF-1-RI ist essentiell für eine signifikante Verbesserung der pathologischen Prozesse in CMT-1-Mausmodellen. Für an CMT-1 erkrankte Patienten ist besonders der irreversible Verlust der Muskelkraft von großer Bedeutung (Johnson et al., 2014). Deswegen ist es umso wichtiger, rechtzeitig mit der Therapie zu beginnen. Ein späterer Startpunkt im 6. Lebensmonat erzielt nicht denselben Effekt wie bei präventiv behandelten Tieren. Selbst die Rebound Gruppe zeigt mit der verbesserten Greifkraft sowie dem Erhalt von neuromuskulären Synapsen im Vergleich zu therapeutisch behandelten Tieren einen nachhaltigen positiven Einfluss der Therapie auf den Krankheitsverlauf.

Aufgrund dieser Beobachtungen ergibt sich eine neue Fragestellung: Warum ist ein späterer Therapiestart mit einem schlechteren Outcome verbunden, obwohl die Makrophagen durch die CSF-1-RI Behandlung in ihrer Anzahl deutlich reduziert sind?

Abgesehen von den schädlichen Effekten durch die Makrophagen könnten weitere alternative Degenerationsprozesse von Bedeutung sein: Studien zeigten, dass nicht nur die Makrophagen, sondern auch die Schwannzellen selbst an der Phagozytose von Myelin beteiligt sind. Sowohl nach Verletzungen eines peripheren Nerven als auch in Mausmodellen für die CMT-1-Unterform CMT1A konnte eine Myelinphagozytose durch die Schwannzellen beobachtet werden (Gomez-Sanchez et al., 2015; Jang et al., 2016). Diese These wurde durch weitere Studien bestätigt: Nach Verletzung peripherer Nerven wurde eine Hochregulierung der Schwannzell-Rezeptoren Tyro3, Axl und Mer (TAM-Rezeptoren) beobachtet. Diese Rezeptoren führen nach ihrer Aktivierung zu einer Phagozytose von Myelindebris durch die Schwannzellen (Brosius Lutz et al., 2017). Eine vor kurzem veröffentlichte Studie festigte die These, dass Schwannzellen nach einer Axotomie Myelin autophagozytieren. Das Protein MLKL (Mixed Lineage Kinase Domain-like Protein) ist dabei ein zentraler Faktor: Nach einer Phosphorylierung sorgt das Protein für eine Auflockerung des kompakt gewickelten Myelins, sodass die umgebenden Schwannzellen das geschädigte Myelin phagozytieren können (Ying et al., 2018).

Im Rahmen der CMT1-Neuropathie und der damit verbundenen pathologischen Instabilität des Myelins der Schwannzellen könnte hierdurch eine Myelinautophagozytose hervorgerufen werden (Gomez-Sanchez et al., 2015).

Über die Myelinautophagozytose hinaus könnte auch die Dedifferenzierung der Schwannzellen selbst ursächlich für die Degenerationsprozesse sein, welche durch die Dedifferenzierungsmarker NCAM und L-1 in Cx32def Mäusen nachgewiesen werden konnten (Groh et al., 2015). In einer kürzlich veröffentlichten Studie wurde gar das Konzept einer demyelinisierenden Schwannzelle etabliert: Dedifferenzierte Schwannzellen scheinen in engem Zusammenhang mit einem demyelinisierenden Phänotyp zu stehen. Diese zwei Prozesse - die Dedifferenzierung und die Demyelinisierung durch Schwannzellen selbst – treten vermehrt nebeneinander auf. So wird vermutet, dass die Dedifferenzierung ursächlich für den Progress einer regulären Schwannzelle in einen demyelinisierenden Phänotyp sein könnte (Park et al., 2018).

Die elektrophysiologischen Messungen als ein weiterer funktioneller Parameter zeigen Tendenzen, die auf den Erhalt des Myelins als einen Effekt der CSF-1-RI-Therapie hindeuten. Hier zeigten sich jedoch in allen Gruppen keine signifikanten Verbesserungen in der NCV und der F-Wellen-Latenz, wobei überraschenderweise die therapeutisch behandelten Tiere den höchsten Wert in der NCV aufwiesen sowie die am stärksten verminderte F-Wellen-Latenz. Die Muskelsummenaktionspotentiale als Marker für den axonalen Schaden zeigten sich interessanterweise kaum verbessert. Hier sind nur in der Rebound-Gruppe leicht gesteigerte distale CMAP im Vergleich zu der Kontrollgruppe zu beobachten. Insgesamt erbrachte die CSF-1-RI-Behandlung keine signifikante Verbesserung der elektrophysiologischen Parameter.

Im Widerspruch zu diesen Ergebnissen stehen Resultate aus zurückliegenden Studien, welche Hinweise auf eine signifikante Verbesserung elektrophysiologischer Parameter durch eine CSF-1-RI-Therapie ergaben (Klein et al., 2015b). Diese Diskrepanz könnte durch verschiedene Kontrollmauspopulationen mitbedingt sein, da in dieser Arbeit im Vergleich zu der zurückliegenden Studie die unbehandelten Kontrolltieren generell bessere klinische sowie histopathologische Parameter aufwiesen.

Zusätzlich muss die Tatsache beachtet werden, dass im Gegensatz zu den anderen Messungen, wie der der F4/80+ Makrophagenprofile oder der Quantifizierung der neuromuskulären Innervation, die Untersuchungen nicht im N. Quadriceps, sondern im N. Ischiadicus durchgeführt wurden. Der N. Ischiadicus enthält im Vergleich zum N. Quadriceps (Peyronnard et al., 1986) anteilig mehr sensorische Fasern. Im Mausmodell für die CMT-1 Neuropathie sind besonders die motorischen Fasern betroffen (Martini and Toyka, 2004). Die unterschiedlichen Anteile an sensorischen und motorischen Fasern im N. Ischiadicus im Vergleich zum N. Quadriceps könnten eine mögliche Ursache für die Ergebnisse der elektrophysiologischen Messungen sein.

Oft ist zu beobachten, dass bezüglich des positiven Effekts der CSF-1-RI-Behandlung nach dem präventiven Behandlungszweig die Rebound-Gruppe die stärksten Verbesserungen aufweisen. Selbst 6 Monate nach Therapieende

zeigen sich noch funktionelle Verbesserungen wie eine vermehrte Greifkraft, wohingegen die endoneurale Makrophagenpopulation zu diesem Zeitpunkt wieder vergleichbar mit den Werten der unbehandelten Kontrolltiere ist. Parallel zu der vermehrten Greifkraft lässt sich auch die verbesserte Muskelinnervation beobachten (**Abbildung 18**).

Eine interessante Fragestellung wäre es, zu untersuchen, wie lange der positive Effekt der CSF-1-Behandlung auf die funktionellen Parameter andauert und zu einem späteren Zeitpunkt, beispielsweise in 18 Monate alten Mäusen, histopathologische und funktionelle Untersuchungen durchzuführen.

Die diskutierten Ergebnisse betrachtend, konnte in Übereinstimmung mit vorherigen Studien (Klein et al., 2015b) auch in dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass eine Behandlung von P0het Mäusen mit einem CSF-1-RI zu einer Verbesserung von histopathologischen und funktionellen Parametern führt.

#### 4.2 Die Behandlung von Cx32def Mäusen mit einem CSF-1-Rezeptorinhibitor führt zu verbesserten histopathologischen und funktionellen Parametern

In Cx32def Mäusen konnte ebenso wie bei den P0het Tieren ein positiver Effekt der CSF-1-Therapie auf histopathologische Merkmale und funktionelle Parameter beobachtet werden, welcher in vorherigen Studien zu anderen Behandlungsschemata ebenfalls gezeigt werden konnte (Klein et al., 2015b).

In Analogie zu den Ergebnissen in P0het Tieren konnte auch in Cx32def Mäusen ein ähnlicher Effekt der CSF-1-RI-Therapie auf die endoneurale Makrophagenpopulation nachgewiesen werden.

Eine präventive Behandlung erzielte eine signifikante Reduktion der Makrophagenprofile. Auch bei therapeutisch behandelten Tieren konnte eine signifikante Abnahme der Makrophagenanzahl beobachtet werden. Rebound-Tiere hingegen wiesen im Gegensatz zu gleichaltrigen P0het Tieren 6 Monate

nach Therapieende eine wesentliche Zunahme an endoneuralen Makrophagen auf. Dies könnte auf eine überschießende Reaktion im Sinne eines Rebound-Effekts hindeuten. Studien in Wildtyp-Mäusen zeigten, dass 7 Tage nach Absetzen einer einwöchigen Therapie mit dem CSF-1-RI PLX5622 im ZNS Mikrogliapopulationen zu beobachten waren, deren Werte über dem der Kontrolltiere lagen. 21 Tage nach dem Ende der Therapie waren die Werte der behandelten Tiere wieder mit denen der Kontrolltiere vergleichbar (Rice et al., 2017).

Als eine sinnvolle Ergänzung zu den bereits vorhandenen Ergebnissen dieser Arbeit könnte also eine Quantifizierung der Makrophagen direkt nach Absetzen der Therapie dienen.

Im Vergleich zu den P0het Tieren sind auch bei den funktionellen Parametern wie der Greifkraft ähnliche Effekte der CSF-1-RI-Therapie auf den Krankheitsverlauf zu verzeichnen. Therapeutisch behandelte Tiere wiesen keine verbesserte Greifkraft im Vergleich zu Mäusen der Kontrollgruppe auf. Ein präventiver Ansatz konnte jedoch gesteigerte Werte erreichen. Interessanterweise konnte auch in der Rebound-Gruppe 6 Monate nach Therapieende eine nachhaltige Verbesserung der Greifkraft beobachtet werden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass auch im Mausmodell für CMT1X ein früher Therapiestart mit dem CSF-1-RI von grundlegender Bedeutung ist. Für an CMT1 erkrankte Patienten ist gerade der irreversible Verlust der Muskelkraft von großer Relevanz (Johnson et al., 2014), weswegen ein rechtzeitiger Beginn der Therapie Potential für eine verbesserte Lebensqualität bieten könnte.

Bezüglich der Anzahl an abnormal innervierten Synapsen zeigten sich ähnliche Effekte der CSF-1-RI-Therapie bei Cx32def Tieren wie bei P0het Mäusen. Auch hier schnitt der präventive Behandlungszweig im Vergleich zu den therapeutisch behandelten Tieren besser ab. Dies stützt die These, dass ein früher Therapiebeginn essentiell ist, um die neuromuskuläre Innervation zu erhalten. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die abnormal innervierten Synapsen der Rebound Gruppe nicht untersucht. Da aber die Rebound Gruppe auch hier –

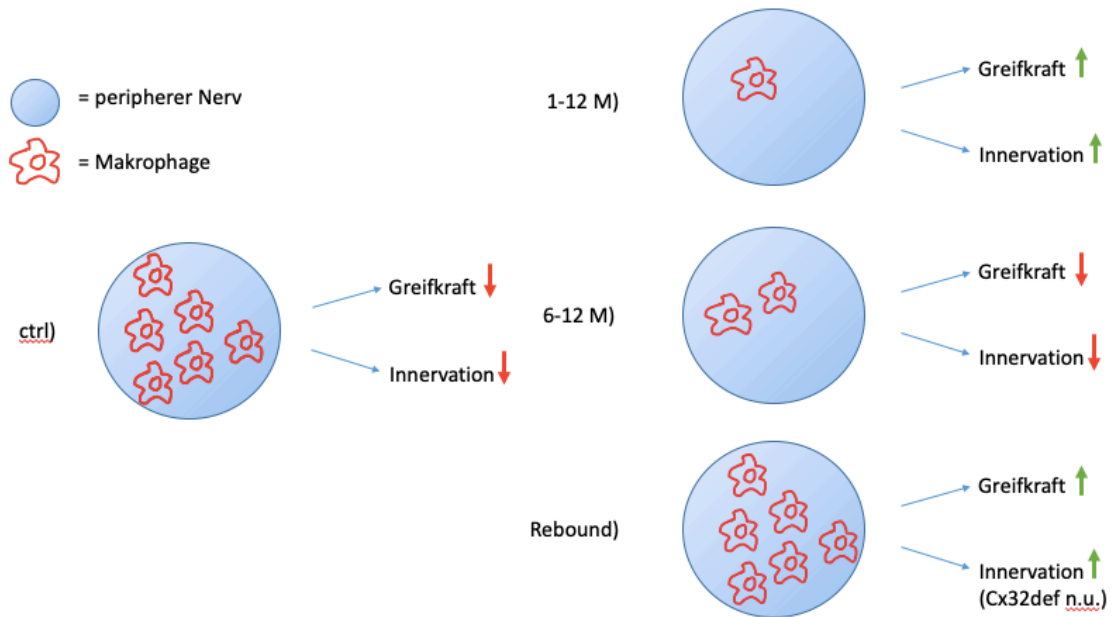
ebenso wie in den P0het Tieren – eine nachhaltige Verbesserung der Greifkraft zeigte, ist anzunehmen, dass die neuromuskuläre Innervation dieser Gruppe den gleichen Trend zeigt.

In Übereinstimmung mit den elektrophysiologischen Messungen in P0het Mäusen zeigten sich auch bei den Cx32def Mäusen insgesamt keine signifikante Verbesserung.

Im zeitlichen Rahmen dieser Arbeit sind elektronenmikroskopische Untersuchungen der Nerven von Cx32def Mäusen unter CSF-1-Therapie nicht möglich gewesen. Aufgrund der ähnlichen funktionellen Parameter im Vergleich zu P0het Tieren ist jedoch zu erwarten, dass auch die Cx32def Tiere in ultrastrukturellen Merkmalen entsprechende Ergebnisse hinsichtlich der CSF-1-Behandlung zeigen. Um diese Ergebnisse zu komplettieren, ist es notwendig, die elektronenmikroskopischen Untersuchungen in weiteren Studien durchzuführen.

Die genannten Ergebnisse der CSF-1-Ri-Therapie in Cx32def Mäusen zusammenfassend, kann ebenso wie bei den P0het Tieren ein positiver Effekt der Behandlung auf funktionelle und histopathologische Parameter verzeichnet werden (**Abbildung 18**).





**Abbildung 18 Zusammenfassende Darstellung der verschiedenen Behandlungsgruppen in P0het und Cx32def Mäusen hinsichtlich des Effekts der CSF-1-RI-Therapie auf Greifkraft und die neuromuskuläre Innervation**

#### 4.3 Möglichkeit der translationalen Ansätze der CSF-1-RI-Therapie

Die untersuchten Effekte der CSF-1-RI-Therapie auf histopathologische und funktionelle Parameter in Mausmodellen für CMT1B bzw. CMT1X zeigen, dass die durch Makrophagen hervorgerufene Entzündungsreaktion gehemmt werden kann.

Obwohl die CSF-1-RI Therapie bei den Cx32def und P0het Mausmodellen, die sowohl histopathologisch als auch funktionell sehr gut die Symptomatik der an CMT1 erkrankten Patienten widerspiegeln, vielversprechende Ergebnisse erzielte, ist dieser Behandlungsansatz dennoch schwierig auf den Menschen zu übertragen.

Zum einen ist der CSF-1-RI Blut-Hirn-Schranken (BHS) permeabel. Eine 14-tägige Inhibition des CSF-1-Rezeptors mittels PLX3397 zeigte eine signifikante Reduktion der Mikroglia im N. Opticus von Wildtyp-Mäusen (unpublizierte Daten (Groh et al., 2019)). Weitere Studien bestätigten die These, dass für die Dauer

einer CSF-1-Ri-Therapie die Mikroglia im ZNS depletiert werden (Elmore et al., 2015). Dies kann problematisch sein, da Mikroglia im ZNS u.a. eine protektive Rolle einnehmen: Studien ergaben, dass z.B. nach Schlaganfall eine Depletion von Mikroglia durch eine Inhibition des CSF-1-Rezeptors zu aggravierten neurologischen Defiziten, einer Vergrößerung des Infarktgebiets sowie zu einer verstärkten inflammatorischen Reaktion führte (Jin et al., 2017). Des Weiteren ergeben sich Hinweise auf eine wichtige Funktion der Mikroglia in Zusammenhang mit ZNS-Synapsen: Hier können Mikroglia die Maturation von Synapsen fördern bzw. deren Plastizität regulieren (Paolicelli et al., 2011; Schafer et al., 2013). Auch nach Schädel-Hirn-Trauma können Mikroglia eine protektive Rolle einnehmen, wobei hier die Situation komplex ist und diese Zellen durchaus auch die Neurotoxizität aggravieren können (Karve et al., 2016; Muccigrosso et al., 2016; Kumar et al., 2017).

Zum anderen exprimieren nicht nur die Makrophagen den CSF-1-Rezeptor, sondern auch andere Zellen, wie bspw. Neurone. Hier spielt der CSF-1-Rezeptor unter anderem eine Rolle in der Entwicklung und Differenzierung von neuronalen Progenitorzellen (Chitu et al., 2016). Weitere Studien in CSF-1-Rezeptor defizienten Mäusen zeigten, dass nach Gabe von Kainsäure die durch Exzitotoxizität hervorgerufene Neurodegeneration sowie die Sterberate im Vergleich zu den Kontrolltieren wesentlich exazerbiert waren (Luo et al., 2013).

Zudem konnte nachgewiesen werden, dass in CSF-1-R defizienten Mäusen die Überlebensrate im Vergleich zu Wildtypen reduziert war. Darüber hinaus zeigten die Tiere eine insgesamt verringerte Größe des Gehirns, eine Atrophie des Bulbus olfactorius, eine Größenzunahme des lateralen Ventrikels und einen verschmälerten Neokortex (Nandi et al., 2012; Chitu et al., 2016). Auch benachbarte Regionen des lateralen Ventrikels wie die Amygdala und das Striatum wiesen eine gestörte Gewebsarchitektur auf (Erblich et al., 2011).

Zwar waren in dieser Arbeit generell keine Nebenwirkungen wie Gewichtsverlust oder Atrophien zu beobachten; da die Ergebnisse jedoch daraufhin deuten, dass ein möglichst früher Therapiebeginn für einen positiven Effekt auf den Krankheitsverlauf von Nöten ist, sind die Auswirkungen des CSF-1-Ri auf die neuronale Entwicklung durchaus kritisch zu sehen. Translationale

Therapieansätze würden einen Behandlungsbeginn ab Kindesalter voraussetzen, gerade hier wären Beeinträchtigungen der neuronalen Entwicklung fatal.

In der Therapie von Tumorerkrankungen sind CSF-1-R1 bereits in translationalen Ansätzen getestet worden und zeigten gute Resultate, beispielsweise in der Behandlung der pigmentierten villonodulösen Synovitis mit dem monoklonalen Antikörper Emactuzumab. Jedoch zeigten sich auch hier teilweise schwerwiegende Nebenwirkungen wie Lupus Erythematodes, periorbitale Ödeme und Dermohypodermatitis (Cassier et al., 2015). Auch bei malignen Tumorerkrankungen wie dem malignen Melanom oder dem Pankreskarzinom werden CSF-1-R1 in Studien eingesetzt. Hier zeigte sich ein verhältnismäßig gutes Risikoprofil für die CSF-1-R1-Therapie, jedoch treten auch hier Nebenwirkungen auf wie Übelkeit, Fatigue, Kopfschmerzen, Pruritus, erhöhte Leberenzyme und ein verminderter Appetit auf (Cannarile et al., 2017)

Die Behandlung der Tumorerkrankungen mit verschiedenen CSF-1-R1 erfolgte in einem wesentlich kürzeren Zeitraum, als es für die Therapie der CMT1 nötig wäre. Hier ist anzunehmen, dass eine Therapie am Patienten über Jahre, wenn nicht Jahrzehnte durchgeführt werden müsste, um einen nachhaltigen Effekt zu erzielen. Jene These wird durch die Beobachtung in dieser Arbeit gestützt, dass neben einem frühzeitigen Therapiebeginn auch eine langfristige Therapie von Bedeutung zu sein scheint: Mäuse, die im Rebound Therapieschema waren, zeigten eine Repopulation von Makrophagen im peripheren Nerven. Funktionelle Parameter wie die Greifkraft waren zwar weiterhin verbessert, jedoch bleibt die Frage offen, ob zu einem späteren Zeitpunkt, zum Beispiel im 18. Lebensmonat, diese positiven Effekte noch zu verzeichnen wären.

Da die genannten Nebenwirkungen des CSF-1-R1 in der Tumorthherapie schon während einer relativ kurzen Behandlungszeit auftraten, ist anzunehmen, dass für die Therapie der CMT1 diese und andere noch unbekannte Nebenwirkungen in gravierenderer Form auftreten könnten.

Diese Problematiken stellen die Therapie der CMT1 mittels des CSF-1RI vor weitere Herausforderungen. Ein Lösungsansatz wäre es, einen spezifischeren CSF-1-RI zu entwickeln, der nicht BHS-permeabel ist und so nur Auswirkungen auf die peripheren Makrophagen hat. Eine weitere Möglichkeit wäre, nicht den Rezeptor, sondern den Liganden selbst zu blocken. Das von den Fibroblasten sezernierte CSF-1 liegt in verschiedenen Isoformen vor (Pixley and Stanley, 2004); wobei die sezernierte Isoform spCSF-1 ursächlich für die Aktivierung der Makrophagen ist (Groh et al., 2016). Mittels eines für die spCSF-1 Isoform spezifischen Antikörpers könnte so gezielt die Aktivierung der Makrophagen inhibiert werden.

Dennoch konnte diese Arbeit mit einem „proof-of-principle“ Therapieansatz aufzeigen, dass die Inhibition der CSF-1/CSF-1-Rezeptor-Achse eine Verbesserung funktioneller und histologischer Merkmale im CMT-1 Mausmodell ermöglicht.

## 5 Zusammenfassung

Die Charcot-Marie-Tooth-Neuropathie umfasst eine heterogene Gruppe von erblichen unter anderem demyelinisierenden Erkrankungen des peripheren Nervensystems. Trotz ihrer hohen Prävalenz von 1:2.500 gibt es bis dato keine kausalen Therapiemöglichkeiten. Durch den progressiven Krankheitsverlauf wird die Lebensqualität der Patienten stetig gemindert; der fortschreitende Verlust der Muskelkraft und Störungen des Gangbildes sind besonders belastend.

Ursächlich für die CMT1-Neuropathie sind unter anderem Mutationen in Genen, die für Moleküle des Myelins von Schwannzellen codieren. Diese Mutationen führen zu einer verminderten Stabilität und Funktion des Myelins und so letzten Endes zu einer Demyelinisierung und axonalen Schädigung der peripheren Nerven. Weitere Studien in CMT1-Mausmodellen zeigten jedoch, dass nicht nur die verringerte Myelininstabilität sondern auch eine durch das Immunsystem vermittelte geringgradige Entzündungsreaktion für die Symptome ursächlich sein könnte. Hier spielen vor allem Makrophagen eine zentrale Rolle. Das Zytokin CSF-1 aktiviert die Makrophagen und verursacht so eine Demyelinisierung der peripheren Nerven. In P0het und Cx32def Mausmodellen konnte nachgewiesen werden, dass eine medikamentöse Inhibition des CSF-1-Rezeptors an Makrophagen zu einem verbesserten Nervphänotypen und einer deutlichen Abmilderung des Krankheitsbildes führte.

In dieser Arbeit wurden in P0het und Cx32def Mausmodellen weiterführende Behandlungsstudien mit einem CSF-1-Ri durchgeführt, die untersuchen, zu welchem Zeitpunkt innerhalb des Krankheitsverlaufs (therapeutisch oder präventiv) eine erfolgreiche Therapie noch möglich ist und ob bei einem früheren Beginn eine noch bessere Wirkung erzielt werden kann.

Abhängig von den verschiedenen Start- und Endpunkten waren unterschiedliche Ergebnisse zu beobachten: Hinsichtlich der klinischen Parameter wie der Greifkraft und der Anzahl an abnormal innervierten Synapsen zeigten die Tiere im präventiven Behandlungszweig in beiden Mausmodellen das beste Ergebnis im Vergleich zu den Kontrolltieren. Diese substantielle Verbesserung ließ sich unabhängig von einem Makrophagen-Reflux sogar noch 6 Monate nach Behandlungsabbruch nachweisen.

Bezüglich der endoneuralen Makrophagendepletion war sowohl in den P0het als auch den Cx32def Tieren im präventiven sowie im therapeutischen Behandlungszweig eine signifikante Verbesserung zu beobachten.

Diese Ergebnisse heben ein weiteres Mal die Bedeutung der Makrophagen als Teil einer Entzündungsreaktion in der Pathogenese der CMT1-Neuropathie hervor. Des Weiteren konnte die These gefestigt werden, dass eine Inhibition des CSF-1-Rezeptors zu verbesserten histopathologischen sowie funktionellen Parametern führt. Um ein gutes Ansprechen auf die Therapie zu erzielen, müssen ein möglichst früher Therapiebeginn sowie eine nachhaltige Behandlungsdauer gewährleistet sein.

Translationale Therapieansätze stehen weiterhin vor großen Herausforderungen. Da anhand der Ergebnisse zu erwarten ist, dass die Therapie im frühen Kindesalter begonnen und wahrscheinlich über Jahrzehnte fortgeführt werden muss, ist eine Minimierung des potentiellen Nebenwirkungsprofils – hier ist vor allem die Beeinträchtigung der neuronalen Entwicklung zu nennen - zwingend erforderlich. Hier könnte die spezifische Blockade eines gegen die spCSF-1 Isoform gerichteten Antikörpers eine weitere Option in der Therapie der CMT1-Neuropathie darstellen.

## 6 Anhang

### 6.1 Materialien

#### 6.1.1 Technische Ausrüstung

|                                    |  |
|------------------------------------|--|
| 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)                     |
| 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)                     |
| Perfusionspumpe Reglo              | Ismatec (Glattbrugg, Schweiz)                          |
| Pipetten                           | Eppendorf (Hamburg, Deutschland)                       |
| Pipettenspitzen                    | Saarstedt (Nümbrecht, Deutschland)                     |
| Reaktionsgefäße                    | Saarstedt (Nümbrecht, Deutschland)                     |
| Software                           |  |
| GNU Image Manipulation Programm    | The GIMP Team  |

|                    |                                  |
|--------------------|----------------------------------|
| Image J            | NIH (Bethesda,, USA)             |
| Office 2016        | Microsoft (Redmond, USA)         |
| Trimmer EM Trim    | Leica (Wetzlar, Deutschland)     |
| Vortex-Mischer L46 | Labinco (Breda, Niederlande)     |
| 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)                 |
| $\alpha$ -Bungarotoxin AlexaFluor 488<br>Konjugat          | Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)         |
| Aqua-Poly/Mount®   | Polysciences (Eppenheim, Deutschland)              |
| Avidin-Biotin-Block-Kit                                    | Vector Laboratories (Burlingame, USA)              |
| Azur   | Applied Biosciences (Darmstadt,<br>Deutschland)    |
| Bleicitrat ( $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ )                  | 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,<br>Deutschland) |
| Dinatriumhydrogenphosphat<br>( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) | Merck (Darmstadt, Deutschland)                     |
| Ethanol  | Sigma-Aldrich (München, Deutschland)               |
| Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)                        | Merck (Darmstadt, Deutschland)                     |
| Glutaraldehyd  | Serva Electrophoresis (Heidelberg,<br>Deutschland) |
| Heparin  | Ratiopharm (Ulm, Deutschland)                      |



|   |   |
|---|---|
| Kaliumchlorid (KCl)   | Merck (Darmstadt, Deutschland)                  |
| Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) | 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)                  |
| Saccharose  | Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)              |
| Streptavidin Cy3 (CLCSA 1010)                               | Biozol (Eching, Deutschland)                    |
| Tissue-Tek® O.C.T. Compound                                 | Sakura (Alphan aan den Rijn, Niederlande)       |
| TritonX-100   | Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)              |
| Vinyl/ERL4221D  | Serva Electrophoresis (Heidelberg, Deutschland) |
| Vitro-Clud®   | R. Langenbrinck (Emmerdingen, Deutschland)      |
| Xylamin   | CP-Pharma (Burgdorf, Deutschland)               |

### 6.1.3 Puffer und Lösungen

|              |  |
|--------------|--|
| Anästhetikum | 1,2% Ketamin<br>0,08% Xylamin<br>In 0,9% NaCl-Lösung   |
| Methylenblau | 1% Azur<br>1% Methylenblau<br>40% Saccharose<br>pH 9,2 |
| PBS (1x)     | 137 mM NaCl  |

2,7 mM KCl  
 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
 8,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
 pH 7,4

PBS/Heparin

0,4% Heparin  
 In 0,1% PBS

4%PFA/2%GA/CaCo

4% Paraformaldehyd  
 2% Glutaraldehyd  
 In 0,1 M CaCo

Spurr's Medium

10g Vinyl/ERL  
 6 g DER 736  
 26 g NSA  
 0,4 g DMAE

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

#### 6.1.4 Antikörper

##### Primärantikörper

| Angriffspunkt           | Spezies                   | Katalognummer | Firma            | Verdünnung |
|-------------------------|---------------------------|---------------|------------------|------------|
| CD 34                   | Ratte Anti-Maus           | 14-0341-85    | e-Bioscience     | 1:1.000    |
| F4/80<br>(biotinyliert) | Ratte Anti-Maus           | MCA497B       | Serotec          | 1:300      |
| Synaptophysin           | Meerschweinchen Anti-Maus | 101004        | Synaptic Systems | 1:500      |

## Sekundärantikörper

| <b>Angriffspunkt</b>     | <b>Spezies</b>                     | <b>Katalognum-<br/>mer</b> | <b>Firma</b>    | <b>Verdün-<br/>nung</b> | <b>Konjugier-<br/>ter<br/>Farbstoff</b> |
|--------------------------|------------------------------------|----------------------------|-----------------|-------------------------|---|
| Ratten IgG               | Ziege anti-<br>Ratte               | A11006                     | invitro-<br>gen | 1:300                   | Alexa<br>Fluor®488                      |
| Meerschwein-<br>chen IgG | Esel Anti-<br>Meerschwein-<br>chen | 706-165-148                | Dianova         | 1:300                   | Cy3                                     |

## 6.2 Literaturverzeichnis

- Acharya MM, Green KN, Allen BD, Najafi AR, Syage A, Minasyan H, Le MT, Kawashita T, Giedzinski E, Parihar VK, West BL, Baulch JE, Limoli CL (2016) Elimination of microglia improves cognitive function following cranial irradiation. *Scientific reports (Sci rep)* 6:31545.
- Adlkofer K, Martini R, Aguzzi A, Zielasek J, Toyka KV, Suter U (1995) Hypermyelination and demyelinating peripheral neuropathy in Pmp22-deficient mice. *Nature genetics (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. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience (J Neurosci)* 17:4545-4551.
- Arroyo EJ, Scherer SS (2000) On the molecular architecture of myelinated fibers. *Histochemistry and cell biology (Histochem Cell Biol)* 113:1-18.
- Bortolozzi M (2018) What's the Function of Connexin 32 in the Peripheral Nervous System? *Front Mol Neurosci* 11:227.
- Brennan KM, Bai Y, Shy ME (2015) Demyelinating CMT--what's known, what's new and what's in store? *Neuroscience letters (Neurosci Lett)* 596:14-26.
- Brosius Lutz A, Chung WS, Sloan SA, Carson GA, Zhou L, Lovelett E, Posada S, Zuchero JB, Barres BA (2017) Schwann cells use TAM receptor-mediated phagocytosis in addition to autophagy to clear myelin in a mouse model of nerve injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (Proc Natl Acad Sci U S A)* 114:E8072-e8080.
- Cannarile MA, Weisser M, Jacob W, Jegg AM, Ries CH, Ruttinger D (2017) Colony-stimulating factor 1 receptor (CSF1R) inhibitors in cancer therapy. *Journal for immunotherapy of cancer (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. *The Journal of cell biology (J Cell Biol)* 152:301-308.
- Cassier PA et al. (2015) CSF1R inhibition with emactuzumab in locally advanced diffuse-type tenosynovial giant cell tumours of the soft tissue: a dose-escalation and dose-expansion phase 1 study. *The Lancet Oncology (Lancet Oncol)* 16:949-956.
- 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 in neurosciences (Trends Neurosci)* 39:378-393.
- Elmore MR, Lee RJ, West BL, Green KN (2015) Characterizing newly repopulated microglia in the adult mouse: impacts on animal behavior, cell morphology, and neuroinflammation. *PloS one* 10:e0122912.
- 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.
- Erblich B, Zhu L, Etgen AM, Dobrenis K, Pollard JW (2011) Absence of colony stimulation factor-1 receptor results in loss of microglia, disrupted brain development and olfactory deficits. *PLoS one* 6:e26317.
- 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 & development (Genes Dev)* 9:1846-1856.
- Fischer S, Kleinschnitz C, Muller M, Kobsar I, Ip CW, Rollins B, Martini R (2008) Monocyte chemoattractant protein-1 is a pathogenic component in a model for a hereditary peripheral neuropathy. *Molecular and cellular neurosciences (Mol Cell Neurosci)* 37:359-366.
- Fledrich R, Stassart RM, Sereda MW (2012) Murine therapeutic models for Charcot-Marie-Tooth (CMT) disease. *British medical bulletin (Br Med Bull)* 102:89-113.
- Giambonini-Brugnoli G, Buchstaller J, Sommer L, Suter U, Mantei N (2005) Distinct disease mechanisms in peripheral neuropathies due to altered peripheral myelin protein 22 gene dosage or a Pmp22 point mutation. *Neurobiology of disease (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.
- Gomez-Sanchez JA et al. (2015) Schwann cell autophagy, myelinophagy, initiates myelin clearance from injured nerves. *The Journal of cell biology (J Cell Biol)* 210:153-168.
- Groh J, Basu R, Stanley ER, Martini R (2016) Cell-Surface and Secreted Isoforms of CSF-1 Exert Opposing Roles in Macrophage-Mediated Neural Damage in Cx32-Deficient Mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience (J Neurosci)* 36:1890-1901.
- Groh J, Klein D, Berve K, West BL, Martini R (2019) Targeting microglia attenuates neuroinflammation-related neural damage in mice carrying human PLP1 mutations. *Glia* 67:277-290.
- 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 : a journal of neurology* 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, Heini K, Kohl B, Wessig C, Greeske J, Fischer S, Martini R (2010) Attenuation of MCP-1/CCL2 expression ameliorates neuropathy in a mouse model for Charcot-Marie-Tooth 1X. *Human molecular genetics (Hum Mol Genet)* 19:3530-3543.
- Huxley C, Passage E, Manson A, Putzu G, Figarella-Branger D, Pellissier JF, Fontes M (1996) Construction of a mouse model of Charcot-Marie-Tooth

- disease type 1A by pronuclear injection of human YAC DNA. *Human molecular genetics (Hum Mol Genet)* 5:563-569.
- Huxley C, Passage E, Robertson AM, Youl B, Huston S, Manson A, Saberandjonedi D, Figarella-Branger D, Pellissier JF, Thomas PK, Fontes M (1998) Correlation between varying levels of PMP22 expression and the degree of demyelination and reduction in nerve conduction velocity in transgenic mice. *Human molecular genetics (Hum Mol Genet)* 7:449-458.
- Jang SY, Shin YK, Park SY, Park JY, Lee HJ, Yoo YH, Kim JK, Park HT (2016) Autophagic myelin destruction by Schwann cells during Wallerian degeneration and segmental demyelination. *Glia* 64:730-742.
- Jerath NU, Shy ME (2015) Hereditary motor and sensory neuropathies: Understanding molecular pathogenesis could lead to future treatment strategies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1852:667-678.
- Jin WN, Shi SX, Li Z, Li M, Wood K, Gonzales RJ, Liu Q (2017) Depletion of microglia exacerbates postischemic inflammation and brain injury. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism (J Cereb Blood Flow Metab)* 37:2224-2236.
- Johnson NE, Heatwole CR, Dilek N, Sowden J, Kirk CA, Shereff D, Shy ME, Herrmann DN (2014) Quality-of-life in Charcot-Marie-Tooth disease: the patient's perspective. *Neuromuscular disorders : NMD (Neuromuscul Disord)* 24:1018-1023.
- Juneja M, Burns J, Saporta MA, Timmerman V (2018) Challenges in modelling the Charcot-Marie-Tooth neuropathies for therapy development. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry (J Neurol Neurosurg Psychiatry)*.
- Karve IP, Taylor JM, Crack PJ (2016) The contribution of astrocytes and microglia to traumatic brain injury. *British journal of pharmacology (Br J Pharmacol)* 173:692-702.
- Klein D, Martini R (2016) Myelin and macrophages in the PNS: An intimate relationship in trauma and disease. *Brain research (Brain Res)* 1641:130-138.
- Klein D, Groh J, Weishaupt A, Martini R (2015a) Endogenous antibodies contribute to macrophage-mediated demyelination in a mouse model for CMT1B. *Journal of neuroinflammation (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 : a journal of neurology* 138:3193-3205.
- 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 : a journal of neurology* 126:804-813.
- Kumar A, Stoica BA, Loane DJ, Yang M, Abulwerdi G, Khan N, Kumar A, Thom SR, Faden AI (2017) Microglial-derived microparticles mediate neuroinflammation after traumatic brain injury. *Journal of neuroinflammation (J Neuroinflammation)* 14:47.

- Lüllmann-Rauch R (2009) Taschenlehrbuch Histologie. In, 3rd Edition, pp 189-191. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Luo J, Elwood F, Britschgi M, Villeda S, Zhang H, Ding Z, Zhu L, Alabsi H, Getachew R, Narasimhan R, Wabl R, Fainberg N, James ML, Wong G, Relton J, Gambhir SS, Pollard JW, Wyss-Coray T (2013) Colony-stimulating factor 1 receptor (CSF1R) signaling in injured neurons facilitates protection and survival. *The Journal of experimental medicine (J Exp Med)* 210:157-172.
- Magy L, Mathis S, Le Masson G, Goizet C, Tazir M, Vallat JM (2018) Updating the classification of inherited neuropathies: Results of an international survey. *Neurology* 90:e870-e876.
- Martini R (1997) Animal models for inherited peripheral neuropathies. *Journal of anatomy (J Anat)* 191 ( Pt 3):321-336.
- Martini R, Schachner M (1997) Molecular bases of myelin formation as revealed by investigations on mice deficient in glial cell surface molecules. *Glia* 19:298-310.
- Martini R, Toyka KV (2004) Immune-mediated components of hereditary demyelinating neuropathies: lessons from animal models and patients. *The Lancet Neurology (Lancet Neurol)* 3:457-465.
- Martini R, Willison H (2016) Neuroinflammation in the peripheral nerve: Cause, modulator, or bystander in peripheral neuropathies? *Glia* 64:475-486.
- Martini R, Fischer S, Lopez-Vales R, David S (2008) Interactions between Schwann cells and macrophages in injury and inherited demyelinating disease. *Glia* 56:1566-1577.
- Martini R, Zielasek J, Toyka KV, Giese KP, Schachner M (1995) Protein zero (P0)-deficient mice show myelin degeneration in peripheral nerves characteristic of inherited human neuropathies. *Nature genetics (Nat Genet)* 11:281-286.
- Muccigrosso MM, Ford J, Benner B, Moussa D, Burnsides C, Fenn AM, Popovich PG, Lifshitz J, Walker FR, Eiferman DS, Godbout JP (2016) Cognitive deficits develop 1month after diffuse brain injury and are exaggerated by microglia-associated reactivity to peripheral immune challenge. *Brain Behav Immun* 54:95-109.
- Muller HW et al. (1997) Advances in Charcot-Marie-Tooth disease research: cellular function of CMT-related proteins, transgenic animal models, and pathomechanisms. *The European CMT Consortium. Neurobiology of disease (Neurobiol Dis)* 4:215-220.
- Nandi S, Gokhan S, Dai XM, Wei S, Enikolopov G, Lin H, Mehler MF, Stanley ER (2012) The CSF-1 receptor ligands IL-34 and CSF-1 exhibit distinct developmental brain expression patterns and regulate neural progenitor cell maintenance and maturation. *Developmental biology (Dev Biol)* 367:100-113.
- Nelles E, Bützler C, Jung D, Temme A, Gabriel HD, Dahl U, Traub O, Stümpel F, Jungermann K, Zielasek J, Toyka KV, Dermietzel R, Willecke K (1996) Defective propagation of signals generated by sympathetic nerve stimulation in the liver of connexin32-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93:9565-9570.

- Niemann A, Berger P, Suter U (2006) Pathomechanisms of mutant proteins in Charcot-Marie-Tooth disease. *Neuromolecular medicine (Neuromolecular Med)* 8:217-242.
- Niemann S, Sereda MW, Rossner M, Stewart H, Suter U, Meinck HM, Griffiths IR, Nave KA (1999) The "CMT rat": peripheral neuropathy and dysmyelination caused by transgenic overexpression of PMP22. *Ann N Y Acad Sci* 883:254-261.
- Paolicelli RC, Bolasco G, Pagani F, Maggi L, Scianni M, Panzanelli P, Giustetto M, Ferreira TA, Guiducci E, Dumas L, Ragozzino D, Gross CT (2011) Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science* 333:1456-1458.
- Pareyson D, Marchesi C (2009) Diagnosis, natural history, and management of Charcot-Marie-Tooth disease. *The Lancet Neurology* 8:654-667.
- Pareyson D, Scaiola V, Laura M (2006) Clinical and electrophysiological aspects of Charcot-Marie-Tooth disease. *Neuromolecular medicine (Neuromolecular Med)* 8:3-22.
- Park HT, Kim JK, Tricaud N (2018) The conceptual introduction of the "demyelinating Schwann cell" in peripheral demyelinating neuropathies. *Glia*.
- Patzko A, Shy ME (2011) Update on Charcot-Marie-Tooth disease. *Current neurology and neuroscience reports (Curr Neurol Neurosci Rep)* 11:78-88.
- Peyronnard JM, Charron LF, Lavoie J, Messier JP (1986) Motor, sympathetic and sensory innervation of rat skeletal muscles. *Brain research (Brain Res)* 373:288-302.
- Pixley FJ, Stanley ER (2004) CSF-1 regulation of the wandering macrophage: complexity in action. *Trends in cell biology (Trends Cell Biol)* 14:628-638.
- Reilly MM, Shy ME (2009) Diagnosis and new treatments in genetic neuropathies. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry (J Neurol Neurosurg Psychiatry)* 80:1304-1314.
- Rice RA, Pham J, Lee RJ, Najafi AR, West BL, Green KN (2017) Microglial repopulation resolves inflammation and promotes brain recovery after injury. *Glia* 65:931-944.
- Schafer DP, Lehrman EK, Stevens B (2013) The "quad-partite" synapse: microglia-synapse interactions in the developing and mature CNS. *Glia* 61:24-36.
- Schenone A, Nobbio L, Monti Bragadin M, Ursino G, Grandis M (2011) Inherited neuropathies. *Current treatment options in neurology (Curr Treat Options Neurol)* 13:160-179.
- Schmid CD, Stienekemeier M, Oehen S, Bootz F, Zielasek J, Gold R, Toyka KV, Schachner M, Martini R (2000) Immune deficiency in mouse models for inherited peripheral neuropathies leads to improved myelin maintenance. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience (J Neurosci)* 20:729-735.
- Shy ME, Arroyo E, Sladky J, Menichella D, Jiang H, Xu W, Kamholz J, Scherer SS (1997) Heterozygous P0 knockout mice develop a peripheral neuropathy that resembles chronic inflammatory demyelinating



- polyneuropathy (CIDP). Journal of neuropathology and experimental neurology (J Neuropathol Exp Neurol) 56:811-821.
- Stojkovic T (2016) Hereditary neuropathies: An update. Revue neurologique (Rev Neurol (Paris)) 172:775-778.
- Szigeti K, Lupski JR (2009) Charcot-Marie-Tooth disease. European journal of human genetics : EJHG (Eur J Hum Genet) 17:703-710.
- 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.
- Wang Ip C, Kroner A, Fischer S, Berghoff M, Kobsar I, Maurer M, Martini R (2006) Role of immune cells in animal models for inherited peripheral neuropathies. Neuromolecular medicine (Neuromolecular Med) 8:175-190.
- Weis J, Claeys KG, Roos A, Azzedine H, Katona I, Schroder JM, Senderek J (2017) Towards a functional pathology of hereditary neuropathies. Acta neuropathologica (Acta Neuropathol) 133:493-515.
- 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. The Journal of cell biology (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. The Journal of cell biology (J Cell Biol) 148:1009-1020.
- Ying Z, Pan C, Shao T, Liu L, Li L, Guo D, Zhang S, Yuan T, Cao R, Jiang Z, Chen S, Wang F, Wang X (2018) Mixed Lineage Kinase Domain-like Protein MLKL Breaks Down Myelin following Nerve Injury. Mol Cell 72:457-468.e455.
- Zielasek J, Martini R, Toyka KV (1996) Functional abnormalities in P0-deficient mice resemble human hereditary neuropathies linked to P0 gene mutations. Muscle & nerve (Muscle Nerve) 19:946-952.

### 6.3 Abbildungsverzeichnis

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Abbildung 1 Symptomatik der CMT-Neuropathie .....</b>  | <b>4</b>  |
| <b>Abbildung 2 Zusammenfassung der immunologischen Prozesse in<br/>der Pathogenese von CMT1-Neuropathien.....</b>   | <b>11</b> |
| <b>Abbildung 3 Signifikante Reduktion der F4/80+ Makrophagen im N.<br/>Quadriceps von 6 Monate alten P0het Mäusen nach<br/>präventiver CSF-1-R1-Behandlung.....</b> | <b>22</b> |

|                     |   |                |
|---------------------|---|----------------|
| <b>Abbildung 4</b>  | <b>Signifikante Reduktion von F4/80+ Makrophagen im N. Quadriceps von 12 Monate alten P0het Mäusen nach präventiver und therapeutischer CSF-1-RI-Behandlung</b> | <b>.....24</b> |
| <b>Abbildung 5</b>  | <b>Reduktion von Schaumzellen in elektronenmikroskopischer Bildgebung</b>   | <b>.....25</b> |
| <b>Abbildung 6</b>  | <b>Verbesserung ultrastruktureller Parameter im N. Quadriceps in 12 Monaten alten präventiv behandelten P0het Mäusen</b>  | <b>.....26</b> |
| <b>Abbildung 7</b>  | <b>Deutliche Tendenz zur Reduktion demyelinisierter Axone in P0het Mäusen nach präventiver Gabe des CSF-1-RI</b>  | <b>.....28</b> |
| <b>Abbildung 8</b>  | <b>Verbesserung weiterer ultrastruktureller Parameter in P0het Mäusen nach präventiver und therapeutischer Gabe und des CSF-1-RI</b>                            | <b>.....29</b> |
| <b>Abbildung 9</b>  | <b>Immunhistochemische Färbungen neuromuskulärer Synapsen eines P0het Tieres</b>  | <b>.....31</b> |
| <b>Abbildung 10</b> | <b>Quantifizierung der neuromuskulären Synapsen in P0het Mäusen</b>   | <b>.....31</b> |
| <b>Abbildung 11</b> | <b>Elektrophysiologische Messungen in 12 Monate alten P0het Mäusen</b>  | <b>.....34</b> |
| <b>Abbildung 12</b> | <b>Weniger reduzierte Greifkraft der Hinterbeine in P0het Mäusen im präventiven und Rebound-Behandlungszweig</b>  | <b>.....36</b> |
| <b>Abbildung 13</b> | <b>Signifikante Reduktion der F4/80+ Makrophagen im N. Quadriceps von 6 Monate alten Cx32def Mäusen nach präventiver CSF-1-RI-Behandlung</b>                    | <b>.....38</b> |
| <b>Abbildung 14</b> | <b>Signifikante Reduktion F4/80+ Makrophagenprofile im N. Quadriceps von 12 Monate alten Cx32def Tieren nach präventiver und therapeutischer CSF-1RI-Gabe</b>   | <b>.....39</b> |
| <b>Abbildung 15</b> | <b>Verbesserte neuromuskuläre Innervation nach präventiver Gabe des CSF-1-RI</b>  | <b>.....41</b> |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Abbildung 16 Elektrophysiologische Messungen der NCV/F-Wellen-Latenz in 12 Monate alten Cx32def Mäusen .....</b>  | <b>43</b> |
| <b>Abbildung 17 Weniger reduzierte Greifkraft der Hinterbeine in Cx32def Mäusen im präventiven und Rebound-Behandlungszweig.....</b>   | <b>45</b> |
| <b>Abbildung 18 Zusammenfassende Darstellung der verschiedenen Behandlungsgruppen in P0het und Cx32def Mäusen hinsichtlich des Effekts der CSF-1-RI-Therapie auf Greifkraft und die neuromuskuläre Innervation .....</b> | <b>55</b> |

Für Abbildung 1 wurde eine permanente Druckerlaubnis erworben, für Abbildung 2 ist diese im Rahmen eines open access articles bzw. der Creative Commons Attribution enthalten

## 6.4 Abkürzungsverzeichnis

|               |   |
|---------------|---|
| $\alpha$ -Btx | $\alpha$ -Bungarotoxin                  |
| BSA           | Bovines Serumalbumin                    |
| °C            | Grad Celcius                            |
| CMAP          | Compound muscle action potential        |
| CMT           | Charcot-Marie-Tooth                     |
| CSF-1         | Monozytenkolonien-stimulierender Faktor |
| CSF-1-RI      | CSF-1-Rezeptorinhibitor                 |
| ctrl          | Kontrollgruppe                          |
| Cx32/GJB1     | Connexin 32/Gap junction protein beta 1 |
| Cy            | Cyanine                                 |
| DAPI          | 4',6-Diamidin-2-phenylindol             |
| DNA           | Desoxyribonucleinsäure                  |
| ERK           | Extracellular-signal regulated kinase   |
| FDB           | Flexor digitorum brevis                 |
| GIMP          | GNU Image Manipulation Programm         |

|            |  |
|------------|--|
| het        | Heterozygot  |
| HMSN       | Hereditäre motorisch-sensible Neuropathie          |
| Kg         | Kilogramm  |
| M          | Monate   |
| M.         | Musculus   |
| MCP-1/CCL2 | Monocyte chemotactic Protein / CC-Chemokinligand 2 |
| MFN2       | Mitofusin 2  |
| mg         | Milligramm   |
| min        | Minuten  |
| μl         | Mikroliter   |
| μm         | Mikrometer   |
| MPZ/P0     | Myelinprotein zero                                 |
| m/s        | Meter pro Sekunde                                  |
| N.         | Nervus   |
| NCAM       | Neural Cell Adhesion Molecule                      |
| NCV        | Nerve conduction velocity                          |
| NMS        | Neuromuskuläre Synapse                             |
| n.s.       | Nicht signifikant                                  |
| n.u.       | Nicht untersucht                                   |
| OCT        | Optimal cutting temperature                        |
| OsO4       | Osmiumtetroxid                                     |
| PBS        | Phosphat buffered saline                           |
| PCR        | Polymerase chain reaction                          |
| PFA        | Paraformaldehyd                                    |
| PMP22      | Peripheres Myelinprotein 22                        |
| PNS        | Peripheres Nervensystem                            |
| RAG        | Recombination activation gene                      |
| SD         | Standard deviation/ Standardabweichung             |
| spCSF-1    | Secreted proteoglycan CSF-1                        |
| WT         | Wildtyp  |

## 7 Danksagung

Mein Dank gilt zunächst Herrn Prof. Dr. Rudolf Martini für das Überlassen des Promotionsthemas, die mir gebotenen Arbeitsmöglichkeiten sowie für die stetige wissenschaftliche Unterstützung, welche maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Insbesondere bedanke ich mich bei meinem naturwissenschaftlichen Betreuer Herrn Dr. Dennis Klein für seine Geduld bei der methodischen Einarbeitung, den vielfachen Hilfestellungen im Laboralltag sowie für zahlreiche aufschlussreiche wissenschaftliche Diskussionen. Seine hervorragende Betreuung und sein Engagement haben diese Arbeit mit ermöglicht.

Bei Heinrich Blazyca, Silke Loserth und Bettina Meyer bedanke ich mich für die exzellente technische Unterstützung und Hilfestellungen beim Durchführen meiner experimentellen Laborarbeiten.

Des Weiteren gilt mein Dank meinen ehemaligen Kolleginnen und Kollegen Dr. Janos Groh, Xidi Yuan, Michaela Hörner, Kristina Berve und Lena Papp für die immer angenehme und produktive Arbeitsatmosphäre sowie Lena Lößlein für die Erstellung einiger Graphen.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie, insbesondere meinen Eltern Ute und Martin Ostertag für die stetige Unterstützung und den permanenten Rückhalt bedanken.