

Aus der Abteilung Neurogenetik  
(Leiter: Prof. Dr. rer. nat. K. A. Nave)  
des Max-Planck-Instituts für Multidisziplinäre Naturwissenschaften  
in Göttingen

# **Experimentelle Therapie eines Mausmodells für die Pelizaeus-Merzbacher-Erkrankung mit Lonaprisan und Curcumin**

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von

**Dirk Benedikt Epplen**

aus  
Göttingen

Göttingen 2023

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück  
Referent: Prof. Dr. med. M.W. Sereda  
Ko-Referent\*in: Prof. Dr. med. I. Metz  
Promotor-Vertretung: Prof. Dr. Thomas Meyer

Datum der mündlichen Prüfung: 08.06.2023

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Experimentelle Therapie eines Mausmodells für die Pelizaeus-Merzbacher-Erkrankung mit Lonaprisan und Curcumin" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den 29.05.2023

Die Daten, auf denen die vorliegende Arbeit basiert, wurden teilweise publiziert:

Prukop T, Epplen DB, Nientiedt T, Wichert SP, Fledrich R, Stassart RM, Rossner MJ, Edgar JM, Werner HB, Nave KA, Sereda MW (2014): Progesterone antagonist therapy in a Pelizaeus-Merzbacher mouse model. *Am J Hum Genet* 94, 533–546

Epplen DB, Prukop T, Nientiedt T, Albrecht P, Arlt FA, Stassart RM, Kassmann CM, Methner A, Nave KA, Werner HB, Sereda MW (2015): Curcumin therapy in a Plp1 transgenic mouse model of Pelizaeus-Merzbacher disease. *Ann Clin Transl Neurol* 2, 787–796

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	III
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	IV
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	V
<b>1. Einleitung</b> .....	1
1.1 Oligodendrozyten bilden das Myelin des ZNS und unterstützen Axone .....	1
1.2 Das Myelinprotein Proteolipid-Protein (PLP) .....	4
1.3 Die Myelinproteine CNP und MAG .....	5
1.4 Die Pelizaeus-Merzbacher-Erkrankung (PMD) .....	6
1.5 Das Mausmodell der PMD .....	10
1.6 Der Progesteronrezeptor als Zielstruktur therapeutischer Strategien bei der PMD	11
1.7 Curcumin als pleiotroper Wirkstoff gegen die Demyelinisierung bei der PMD .....	13
1.8 Zielsetzung .....	14
<b>2. Material und Methoden</b> .....	16
2.1 Chemikalien .....	16
2.2 Verbrauchsmaterial .....	17
2.3 Lösungen und Puffer .....	18
2.4 Enzyme .....	20
2.5 Reaktionskomplettausstattungen .....	20
2.6 Nukleinsäuren und Nukleotide .....	21
2.7 Oligonukleotide .....	21
2.8 Antikörper .....	22
2.9 Pharmaka .....	22
2.10 Geräte .....	22
2.11 Software .....	24
2.12 Studiendesign .....	24
2.13 Tierhaltung und Analyse .....	25
2.14 Genotypisierung von Mäusen .....	28
2.15 Quantifizierung der mRNA-Expression .....	30
2.16 Histologische Auswertung .....	32
<b>3. Ergebnisse</b> .....	37
3.1 Auswahl eines geeigneten Testverfahrens zur Phänotypisierung .....	37

## Inhaltsverzeichnis

3.2	Analyse der <i>PLP1</i> -mRNA-Expression im Gesamthirn .....	40
3.3	Positiver Effekt auf den Phänotyp durch Lonaprisan und Curcumin .....	41
3.4	Einfluss der Therapien auf das Körpergewicht .....	43
3.5	Quantitative elektronenmikroskopische Analyse des <i>Tractus corticospinalis</i> .....	45
3.6	Quantitative immunhistochemische Untersuchung des <i>Tractus corticospinalis</i> .....	53
3.7	Analyse der mRNA-Expression weiterer Myelinproteine .....	59
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b> .....	61
4.1	Förderung der axonalen Unterstützung durch Oligodendrozyten und Induktion der mRNA-Expression von MAG durch Lonaprisan .....	61
4.2	Curcumin verlangsamt den Progress der PMD im Mausmodell .....	64
4.3	Ausblick .....	66
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	68
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	70

## Abbildungsverzeichnis:

Abb. 1: Schematische Darstellung des Oligodendrozyten .....	3
Abb. 2: PLP/DM20 als topologische Modellzeichnung .....	5
Abb. 3: Ultrastrukturelle Pathologien der PMD im Mausmodell .....	8
Abb. 4: Schema der Pathogenese der PMD bei der Duplikation des Gens <i>PLP1</i> .....	8
Abb. 5: Studiendesign mit Darstellung der zeitlichen Abfolge der Analysen .....	25
Abb. 6: Untersuchung der Motorik mit dem <i>Grid Test</i> .....	27
Abb. 7: G-Ratio zur Beurteilung der Dicke der Myelinscheide .....	36
Abb. 8: <i>Grid Test</i> mit 1 cm Abstand zwischen den Gitterstäben .....	37
Abb. 9: <i>Grid Test</i> mit 2 cm Abstand zwischen den Gitterstäben .....	38
Abb. 10: <i>Rotarod Test</i> .....	39
Abb. 11: Stangenhaltetest ( <i>Bar Test</i> ) .....	40
Abb. 12: Relative <i>PLP1</i> -mRNA-Expression im Gesamthirn .....	40
Abb. 13: <i>Grid Test</i> zu Beginn und am Ende der Studie .....	41
Abb. 14: Gen-Dosis-Effekt auf den Phänotyp .....	42
Abb. 15: Klinische Bewertungsskala am Anfang und am Endpunkt der Studie .....	43
Abb. 16: Körpergewichtsmessung im Verlauf .....	44
Abb. 17: Auswirkungen des Gewichts auf die Motorik der mit Curcumin gefütterten Tiere .....	45
Abb. 18: Lichtmikroskopische Darstellung des <i>Tractus corticospinalis</i> .....	46
Abb. 19: <i>Tractus corticospinalis</i> bei elektronenmikroskopischer Vergrößerung von 4400x .....	47
Abb. 20: Quantifizierung der myelinisierten Axone im <i>Tractus corticospinalis</i> .....	48
Abb. 21: Messung der Gesamtfläche (in mm <sup>2</sup> ) des <i>Tractus corticospinalis</i> des zervi- kalen Rückenmarks bei PMD-Mäusen .....	49
Abb. 22: <i>Tractus corticospinalis</i> bei elektronenmikroskopischer Vergrößerung von 12000x .....	50
Abb. 23: Quantifizierung unmyelinisierter Axone im <i>Tractus corticospinalis</i> .....	50
Abb. 24: Korrelation von Phänotyp und Axonanzahl im <i>Tractus corticospinalis</i> .....	51
Abb. 25: Korrelation der myelinisierten Axone mit der <i>PLP1</i> -mRNA-Expression .....	52
Abb. 26: Keine Korrelation myelinisierter Axone mit der <i>PLP1</i> -mRNA-Expression in der Curcumingruppe .....	52
Abb. 27: Messung der G-Ratio im <i>Tractus corticospinalis</i> .....	53
Abb. 28: MAC3 positive Zellen pro 30.000µm <sup>2</sup> .....	55

## Abbildungsverzeichnis/ Tabellenverzeichnis

Abb. 29: GFAP positive Zellen pro 30.000 $\mu\text{m}^2$ .....	56
Abb. 30: CD3 positive T-Zellen pro 30.000 $\mu\text{m}^2$ .....	57
Abb. 31: Olig2 positive Zellen pro 30.000 $\mu\text{m}^2$ .....	58
Abb. 32: Effekt von Lonaprisan auf die <i>MAG</i> -mRNA-Expression .....	59
Abb. 33: <i>CNP</i> -mRNA-Expression nach Lonaprisangabe .....	60

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Spektrum der <i>PLP1</i> -assoziierten Erkrankungen	10
Tabelle 2: Chemikalien und Hersteller	16
Tabelle 3: Verbrauchsmaterial und Bezugsquellen	17
Tabelle 4: Enzyme und Hersteller	20
Tabelle 5: Reaktionskomplettausstattungen	20
Tabelle 6: Nukleinsäuren und Nukleotide	21
Tabelle 7: Antikörper	22
Tabelle 8: Pharmaka	22
Tabelle 9: Geräte	22
Tabelle 10: Software	24
Tabelle 11: Paraffineinbettung	32
Tabelle 12: Einbettung in Epon	34



# Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungen im Text, die abgeleiteten SI-Einheiten (Système International d'Unités) entsprechen, werden nicht gesondert aufgeführt.

Abb.	Abbildung
bp	Basenpaare
CD3	<i>Cluster of Differentiation 3</i>
cDNA	komplementäre DNA
CMT1A	Charcot-Marie-Tooth-Erkrankung
CNP	2,'3'-Cyclic Nucleotid 3'-Phosphodiesterase
CRISPR-Cas	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats- Endonuklease Cas9</i>
CU	Curcumin (Diferuloylmethan)
DAB	Diaminobenzidin
DDSA	2-Duodecenylsuccinicacidanhydrid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMP-30	2,4,6-tris-dimethylaminomethyl-Phenol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosid-Triphosphat
DTT	1,4-Dithiotreitol
ErbB2	<i>erb-b2 receptor tyrosine kinase 2</i>
FAM	6-Carboxy-Fluorescein
f.c.	Endkonzentration
Fwd	<i>Vorwärtsprimer</i>
GFAP	Saures Gliafaserprotein
HBSS	<i>Hanks Balanced Salts Solution</i>
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
MAC3	Mac-3 Antigen auf mononukleären Phagozyten
MAG	Myelin-assoziiertes Glykoprotein
MBP	Myelin-basisches Protein
MNA	Methylnadicanhydrid
MOSP	Myelin/Oligodendrozytenspezifisches Protein
MPI	Max-Planck-Institut
MPI für exp. Med.	ehemaliges Max-Planck-Institut für Experimentelle Medizin, seit 01.01.2022 Teil des Max-Planck-Instituts für Multidisziplinäre Naturwissenschaften

## Abkürzungsverzeichnis

mRNA	messenger-; Boten-Ribonukleinsäure
ns	nicht signifikant
Olig2	<i>Oligodendrocyte transcription factor 2</i>
PA	Progesteronantagonist Lonaprisan
PCR	Polymerasekettenreaktion
PLP	Proteolipid-Protein
<i>PLP1</i>	Gen, das das Proteolipid-Protein kodiert
PMD	Pelizaeus-Merzbacher-Erkrankung
PMD-Mäuse	<i>PLP1</i> -transgenes Tiermodell der PMD durch <i>PLP1</i> -Duplikation
PMP22	peripheres Myelinprotein 22 kDa
PNS	peripheres Nervensystem
PR	Progesteronrezeptor
PRA	Progesteronrezeptor, Isoform A
PRB	Progesteronrezeptor, Isoform B
qRT-PCR	Quantitative <i>RealTime-PCR</i>
Rev	Rückwärts <sup>primer</sup>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
TAE	Tris/Acetat-Puffer mit Ethylendiamintetraacetat
TAMRA	6-Carboxy-tetramethylrhodamin
Taq	hitze stabile DNA-Polymerase aus dem Bakterium <i>Thermus aquaticus</i>
TET	Tetrachloro-6-carboxyfluorescein
tg	transgen
tg Cu	PMD-Mäuse behandelt mit Curcumin
tg PA	PMD-Mäuse behandelt mit Lonaprisan
tg Placebo	PMD-Mäuse behandelt mit Placebo
Wt	Wildtyp
ZK230211	Lonaprisan (Bayer Schering Pharma)
ZNS	zentrales Nervensystem

# 1. Einleitung

## Das Nervensystem

Die Funktionen des Nervensystems sind unter anderem Empfang, Weiterleitung, Verarbeitung von Signalen aus Organismus und Umwelt sowie das Ausführen einer adäquaten Reaktion. Es wird in Zentralnervensystem (ZNS) und peripheres Nervensystem (PNS) unterteilt. Makroskopisch besteht das ZNS aus Gehirn und Rückenmark, das PNS wird aus den peripheren Nerven gebildet. Mikroskopisch werden Nervenzellen und Gliazellen unterschieden. Nervenzellen (Neurone) haben einen 'Soma' genannten Zellkörper und Fortsätze, die die Erregungsleitung und Interaktion mit anderen Neuronen ermöglichen. Sie haben eine Polarität, die eine festgelegte Richtung der elektrischen Leitung bedingt. Fortsätze, die der zum Soma gerichteten Erregungsübertragung dienen, werden Dendriten genannt, während die Weiterleitung vom Soma weg durch einen einzelnen Fortsatz, das Axon, abläuft. Gliazellen sind im ZNS ca. zehn Mal häufiger als Neurone (Pfrieger und Barres 1995) und erfüllen spezifische Aufgaben: Mikroglia sind spezialisierte Zellen der angeborenen Immunabwehr, die sich durch Bewegung und die Fähigkeit zur Phagozytose auszeichnen. Astrozyten sind die Stützzellen des ZNS sowohl in mechanischer als auch in metabolischer Hinsicht, da sie das Ionengleichgewicht herstellen. Sie sind zur Signalübertragung fähig, bilden einen Teil der Blut-Hirn-Schranke und füllen Substanzdefekte mit Narbengewebe. Ependymzellen kleiden das Ventrikelsystem aus und sind an der Liquorsynthese beteiligt. Oligodendrozyten ummanteln Axone mit Myelinscheiden. Sie ermöglichen die schnelle saltatorische Erregungsleitung und haben unterstützende Funktionen für das Axon. Erkrankungen des Myelins wie zum Beispiel Leukodystrophien, Multiple Sklerose oder periphere Neuropathien unterstreichen seine Bedeutung für das Funktionieren des menschlichen Nervensystems.

### 1.1 Oligodendrozyten bilden das Myelin des ZNS und unterstützen Axone

Das Myelin des ZNS wird aus der Plasmamembran von Oligodendrozyten gebildet, die in mehreren Lagen zirkulär um Axone gehüllt ist. Es zeichnet sich durch einen spezialisierten Aufbau mit einem hohen Anteil an Lipiden aus, was den Fasertrakten der weißen Substanz ihre Farbe verleiht. Oligodendrozyten bilden blattförmige Fortsätze aus, die sich um die Axone wickeln. Diese Zellfortsätze umkleiden Axone in Segmenten, genannt Internodien, von 100 bis 1700µm Länge und sind von folgenden Segmenten durch kleine unmyelinisierte Stücke von 1µm Länge, die Ranvierschen Schnürringe getrennt (Hildebrand et al. 1993). Myelin bedingt eine elektrische Isolierung und folglich die schnelle, saltatorische Impulsfortleitung über die frei liegenden Axonabschnitte, die Ranvierschen Schnürringe. Es ermöglicht eine Hochgeschwindigkeitsleitung

## Einleitung

und Übertragungsgenauigkeit über längere Strecken kombiniert mit geringem Platzverbrauch. Die Myelinisierung ist einer der letzten Prozesse in der Entwicklung des ZNS, der nach dem neuronalen Wachstum parallel zur Synaptogenese in einer präzise kontrollierten, zeitlichen Abfolge stattfindet. Hierzu bedarf es einer Kommunikation zwischen Oligodendrozyten und Nervenzellen (Nave und Trapp 2008). Ein wichtiger Schritt zur Induktion der Myelinbildung ist die Ausbildung eines Kontaktes zwischen Axon und Oligodendrozyt. Astrozyten partizipieren durch Ausrichten der Oligodendrozytenfortsätze bei diesem Vorgang (Meyer-Franke et al. 1999). Ein Oligodendrozyt myelinisiert gleichzeitig bis zu 50 Axone verschieden stark entsprechend ihres unterschiedlichen Axondurchmessers. Dies führte zur Hypothese, dass axonale Signale die Myelindicke regulieren (Bansal et al. 1996). Es ist wahrscheinlich, dass lösliche und membranständige Signalmoleküle dabei zusammenwirken. Kandidaten sind Fibroblastenwachstumsfaktoren (Bansal et al. 1996; Qian et al. 1997), Schilddrüsenhormone (Barres et al. 1994) oder Oberflächenproteine wie Neurales Zelladhäsionsmolekül (NCAM-L1), Myelin-assoziiertes Glykoprotein (MAG), und N-Cadherin (Payne et al. 1996; Trapp 1990). Axonales Neuregulin und sein oligodendroglialer Rezeptor (ErbB2) beeinflussen Maturation und morphologische Veränderungen in Oligodendrozyten (Vartanian et al. 1994; Park et al. 2001; Nave und Salzer 2006).

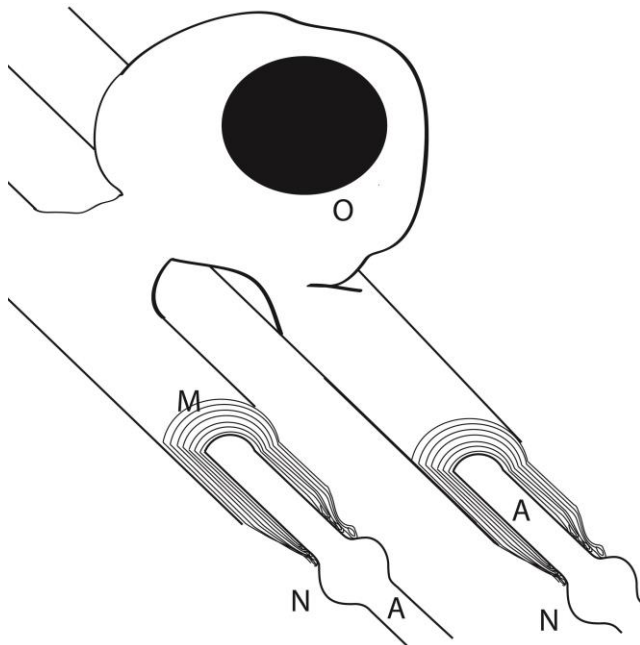
Die Differenzierung der Oligodendroglia und damit einhergehend die Myelinenexpression muss streng mit der Entwicklung der Neuronen korreliert werden, so dass die generelle Annahme ist, dass neuronale Signale die Transformation der Oligodendrozyten-Vorläuferzellen in myelinbildende Oligodendrozyten kontrollieren (Simons und Nave 2015). Dabei werden von den Axonen zunächst inhibitorische Signale ausgesandt über Oberflächenproteine wie zum Beispiel Jagged und *Polysialic acid neural cell adhesion molecule*, die ihrerseits inhibitorische Transkriptionsfaktoren wie *Transcription factor SOX-5/6* oder *Inhibitor of DNA binding 2* aktivieren (Piaton et al. 2010; Taveggia et al. 2010). Zur Initiation der Myelinisierung werden diese inhibitorischen Transkriptionsfaktoren ihrerseits gehemmt unter anderem von micro-Ribonukleinsäure (microRNA), Histon-Deacetylasen und dem Wnt-Signalweg (Shin et al. 2005; Fancy et al. 2009; Budde et al. 2010; Dugas et al. 2010; Kim et al. 2010; Zhao et al. 2010; Tawk et al. 2011).

Die Ausbildung der komplexen Myelinstruktur setzt eine koordinierte Synthese und Arrangement der Myelinkomponenten, das sind vor allem Proteine und Lipide, voraus (Campagnoni und Macklin 1988; Madison et al. 1999). Die Interaktionen zwischen Axon und Oligodendroglia sind bidirektional und beeinflussen sich gegenseitig während der Entwicklung, Degeneration und Regeneration. So führt Myelinisierung zu lokalen Veränderungen in der Cytoarchitektur des Axons sowie systemischen Veränderungen in myelinisierten Neuronen (de Waegh et al. 1992; Brady et al. 1999). Mutationen in Oligodendrozyten können eine axonale Degeneration verursachen, die auf fehlende nutritive Unterstützung schließen lässt (Edgar und Nave 2009). In Knockout-Mäusen für Myelinproteine ist z.B. der schnelle axonale Transport gestört und es kommt zur axonalen Degeneration bevor eine Demyelinisierung eintritt (Kitagawa et al. 1993; Lappe-Siefke et al. 2003).

## Einleitung

Die spezialisierte Funktion der Impulsfortleitung und die extreme Separierung des Axons von dem neuronalen Zellkörper, wo die Proteinbiosynthese stattfindet, trägt wahrscheinlich zu seiner hohen Vulnerabilität bei (Edgar und Nave 2009). Die Myelinisierung bedeutet für die Oligodendrozyten eine massive Proteinsyntheseleistung. Während des Myelinisierungsprozesses sind die Oligodendroglia metabolisch sehr aktiv. Ein Einziger myelinisiert bis zu 50 einzelne Internodien, was die Synthese der Zellmembran, die sich um das Perikarion befindet, um das tausendfache übersteigt (Pfeiffer et al. 1993). Berechnungen zufolge synthetisiert jeder Oligodendrozyt circa  $1,75 \times 10^{-7}$  mg Protein pro Tag, was dem dreifachen Gewicht des Perikarions entspricht (Garbern 2007). Weil ein Drittel der Trockenmasse des Myelins aus Protein besteht, hat der Oligodendrozyt einen hohen Proteinbiosynthesebedarf. Darüber hinaus müssen auch Lipide synthetisiert, transportiert und korrekt in die *Lipid rafts* eingebaut werden (Schneider et al. 2005; Simons et al. 2000; Taylor et al. 2002; Kim und Pfeiffer 1999).

Durch die Myelinscheide sind die Axone vom extrazellulären Raum getrennt, so dass sie auch metabolisch isoliert sind (Simons und Nave 2015). Daher werden sie durch Oligodendroglia mit Energiesubstraten wie zum Beispiel Lactat versorgt (Fünfschilling et al. 2012). Es besteht eine oligodendrogliale, metabolische Unterstützung für das Axon, die wie Saab et al. (2016) zeigten, aktivitätsabhängig Energiesubstrate zur Verfügung stellt. Axonale Glutamatfreisetzung erhöht die oligodendrogliale Glucoseaufnahme und Glykolyse, was zeigt, dass Oligodendrozyten ihre metabolische Aktivität steigern können, in Abhängigkeit von der Aktivität der zugehörigen Axone.



**Abb. 1: Schematische Darstellung des Oligodendrozyten**

Der Oligodendrozyt (O) myelinisiert mehrere Axone (A). Im Längsschnitt stellen sich das lamellare Myelin (M) und das Axoplasma dar: Das Axoplasma bildet dort, wo es nicht von der Myelinscheide umgeben ist, eine Auftreibung, den Ranvierschen Schnürring (N). Das Myelin ist so dicht gepackt, dass zwischen den einzelnen Schichten kaum Cytoplasma vorhanden ist. Nur am Rande am Ranvierschen Schnürring enthalten die Schleifen Cytoplasma.

### 1.2 Das Myelinprotein Proteolipid-Protein (PLP)

Ca. 30% der Trockenmasse des Myelins besteht aus Myelinproteinen, die zum größten Teil spezifische Komponenten der Myelinscheide und der Oligodendrozyten sind (Campagnoni und Macklin 1988). Myelin-basisches Protein (MBP) und PLP als kleine Proteine mit geringem molekularem Gewicht machen im Myelin des ZNS den größten Anteil von ca. 25% der Gesamtproteinmasse aus (Jahn et al. 2009). Zudem existieren weitere Myelinproteine, die zum Teil Enzymaktivität besitzen, wie die 2,3'-Cyclic Nucleotide 3'-Phosphodiesterase (CNP) und verschiedene Glykoproteine unter anderen das Myelin-assoziierte Glykoprotein (MAG).

PLP ist im ZNS das am häufigsten vorkommende Myelinprotein (Jahn et al. 2009; Lees et al. 1995). Es wird vom *PLP1* Gen (*PLP1*) kodiert, welches ein evolutionär hoch konserviertes 17 kB großes Gen ist. Es enthält 7 Exons und befindet sich auf dem langen Arm des X-Chromosoms (Xq21±q22). Durch alternatives Spleißen entsteht das 35 Aminosäuren kürzere DM20. Es wird vor allem während der Embryonalentwicklung hauptsächlich von Neuronalen und Oligodendrozyten-vorläuferzellen exprimiert, wohingegen PLP spezifisch vom maturen Oligodendrozyt gebildet wird (Timsit et al. 1995; Spassky et al. 1998; Delaunay et al. 2008). Zusammen agieren sie als wichtige Faktoren bei der oligodendroglialen Entwicklung und der Stabilität des Myelins (Nadon und West 1998; Klugmann et al. 1997).

Die *PLP1*-Genexpression unterliegt wahrscheinlich einer komplexen, multimodalen Regulierung (Tuason et al. 2008). Die Sequenz des humanen PLP-Proteins stimmt zu 100% mit der der Maus überein (Diehl et al. 1986; Macklin et al. 1987). In verschiedenen Spezies wurden sechs evolutionär konservierte Regionen gefunden (Tuason et al. 2008), die es ermöglichen PLP und DM20 in der nötigen spatio-temporalen Abfolge zu exprimieren.

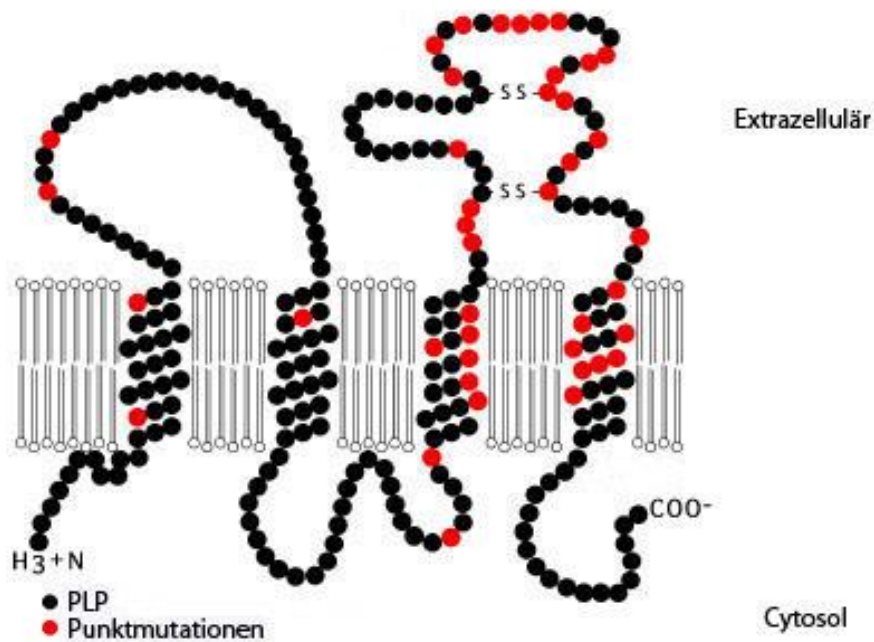
PLP ist ausgesprochen lipophil und besteht aus vier Transmembrandomänen (Abb. 2). Synthetisiert wird es im rauen endoplasmatischen Retikulum und wird dann in den Golgi-Apparat transportiert, in dem es sich mit anderen Myelinbestandteilen wie Cholesterol in mizellenartigen Strukturen, den *Lipid rafts* assoziiert (Gow et al. 1994; Simons et al. 2000). Diese werden dann durch vesikulären Transport an die Plasmamembran gebracht.

Seine genaue biologische Funktion ist bis heute unklar. So führt das vollständige Fehlen des Proteins zu funktionell intakten Myelinscheiden und nur geringen ultrastrukturellen Veränderungen, sowie verminderter physikalischer Stabilität. PLP könnte als Kanal für kleine Moleküle dienen (Knapp 1996), als Signalmolekül bei der Entwicklung der Oligodendroglia wirken (Yamada et al. 1999; Gow und Lazzarini 1996; Gudz et al. 2002), oder als das Myelin stabilisierende Stütze fungieren (Kitagawa et al. 1993). Eine wichtige Aufgabe von PLP könnte die Transporterleichterung für andere Myelinbestandteile, vor allem Lipide, in das Myelinkompartiment sein (Werner et al. 2007).

Interessanterweise werden viele pathologische Vorgänge bei Mutation des *PLP1* Gens besser verstanden, als die essentielle Rolle von PLP beim Gesunden. So führen Punktmutationen des

## Einleitung

*PLP1* zu Konformationsänderungen von PLP, falscher Proteinfaltung, zur Akkumulation, zur Aktivierung der *Unfolded protein response* (Southwood und Gow 2001), der Apoptose von Oligodendroglia, Dysmyelinisierung und potentieller axonaler Degeneration (Dhaunchak und Nave 2007). Das vollständige Fehlen von PLP führt nur zu geringen Änderungen in der Verdichtung der Myelinlamellen (Klugmann et al. 1997; Rosenbluth et al. 2006; 2009). PLP knockout Mäuse entwickeln eine spät einsetzende axonale Pathologie (Griffiths et al. 1998), die auf mangelnder Unterstützung durch den Oligodendrozyten beruht, wie durch Zelltransplantationsstudien herausgefunden wurde (Edgar et al. 2004). Es führt zur Akkumulation von Organellen bei gestörtem schnellem axonalem Transport und konsekutiv zur Degeneration des distalen Anteils vor allem längerer spinaler Axone (Edgar und Nave 2009). Die spezifische axoprotektive Rolle von PLP wurde durch Rescue-Versuche mit peripheren Myelinproteinen dargelegt (Yin et al. 2006; 2008; Stecca et al. 2000). Interessanterweise führt die Duplikation des *PLP1*-Gens, wie dessen Punktmutationen, zu einer Gen-Dosis-Erkrankung, der Pelizaeus-Merzbacher-Erkrankung.



**Abb. 2: PLP als topologische Modellzeichnung**

Das Protein bildet vier transmembranäre Domänen mit zwei extrazellulären und einer intrazellulären Schleife. Punktmutationen, die zur Pelizaeus-Merzbacher-Erkrankung oder zur spastischen Paraplegie führen, sind rot dargestellt.

### 1.3 Die Myelinproteine CNP und MAG

Der Anteil der 2,3'-Cyclic Nucleotide 3'-Phosphodiesterase (CNP) an der Gesamtmasse der Myelinproteine beträgt circa 4% (Baumann und Pham-Dinh 2001). Das *CNP*-Gen ist 7kb groß, besteht aus 4 Exons und befindet sich auf Chromosom 17q21 (Douglas et al. 1992). Die genaue Funktion des Moleküls ist unklar. Das Protein kann 2,3'-Cyclische Nucleotide hydrolysieren, jedoch konnte dieses Substrat im Gehirn bisher nicht nachgewiesen werden (Vogel und Thompson

## Einleitung

1988). CNP kommt im unkompaktierten Myelin und der paranodalen Zone vor (Trapp et al. 1988). Es besitzt mehrere Bindungsstellen für GTP, so dass es auch andere Funktionen unabhängig von der Enzymaktivität besitzen könnte (Braun et al. 1990). Überexpression von *CNP* führt zu Dysmyelinisierung und vermehrter Expansion der Oligodendrozytenmembran (Gravel et al. 1996). Zudem kommt es hierbei zu einer Vakuolisierung des Myelins, wie sie auch beim Mausmodell der Pelizaeus-Merzbacher-Erkrankung (s.u.) beschrieben wurde (Anderson et al. 1998).

Das Myelin-assoziierte Glykoprotein (MAG) macht ca. 1% der Myelinproteine des ZNS aus (Baumann und Pham-Dinh 2001). Das *MAG*-Gen hat eine Länge von 16 kb mit 13 Exons und befindet sich auf dem Chromosom 19 (D'Eustachio et al. 1988). Das *MAG*-Protein hat eine molekulare Masse von 100 kDa, wovon circa 30% Polysaccharide sind. Es besteht aus einem intrazellulären Teil, einer Transmembrandomäne und einen extrazellulären Teil, der homolog zu der Immunglobulin-Superfamilie ist (Salzer et al. 1987). *MAG* wird im periaxonalen Raum des Oligodendrozyten eingebaut und bindet direkt an Ganglioside des Axons und trägt damit zur Interaktion zwischen Oligodendrozyten und Axonen bei (Tang et al. 1997; Poltorak et al. 1987). Durch alternatives Spleißen von Exon 12 entstehen ein großes L-*MAG* und ein kleineres S-*MAG*, die sich in ihrem intrazellulären Teil unterscheiden. Bei der Maus konnte gezeigt werden, dass L-*MAG* über eine Aktivierung einer Tyrosinkinase Teil der Signaltransduktionskaskade der Myelinisierung ist (Umemori et al. 1994). In *MAG*-Knockout-Mäusen wurde ein Absterben von Oligodendrozyten festgestellt, was durch pathologische Vorgänge am Mesaxon, folglich weit entfernt vom Soma der Zelle seinen Ursprung nimmt (Lassmann et al. 1997). Ein charakteristischer morphologischer Defekt zeigte sich in den Internodien, wo der periaxonale, cytoplasmatische Ring fehlte. Ähnliche morphologische Veränderungen wurden von Anderson et al. (1998) auch beim Mausmodell der Pelizaeus-Merzbacher-Erkrankung (s.u.) beschrieben.

### 1.4 Die Pelizaeus-Merzbacher-Erkrankung

Die Pelizaeus-Merzbacher-Erkrankung (PMD) ist eine Gen-Dosis-Erkrankung der Oligodendrozyten. Die PMD ist eine x-chromosomal vererbte, schwere Leukodystrophie. Leukodystrophien sind erblich bedingte Erkrankungen des Myelinaufbaus. Gemeinsam haben sie eine genetisch determinierte, molekulare Pathologie von Gliazellen, die verantwortlich ist für metabolische Defekte des Myelins oder der myelinbildenden Zellen. Aktuell sind 30 Erkrankungen bekannt, die laut einer Konsensusstudie von Vanderver et al. (2015) zu den Leukodystrophien zählen. Die Prävalenzen jeder einzelnen Leukodystrophie sind gering, wahrscheinlich werden sie jedoch in ihrer Gesamtheit deutlich unterschätzt, da es bis 2010 keine klaren Diagnosekriterien gab und neuere Untersuchungen eine höhere Prävalenz zeigen (Bonkowsky et al. 2010). Die bekanntesten Vertreter der Leukodystrophien sind Adrenoleukodystrophie, Metachromatische Leukodystrophie, Globoidzell-Leukodystrophie, Alexander-Krankheit, Canavans-Krankheit, Aicardi-Goutieres-Syndrom und PMD.



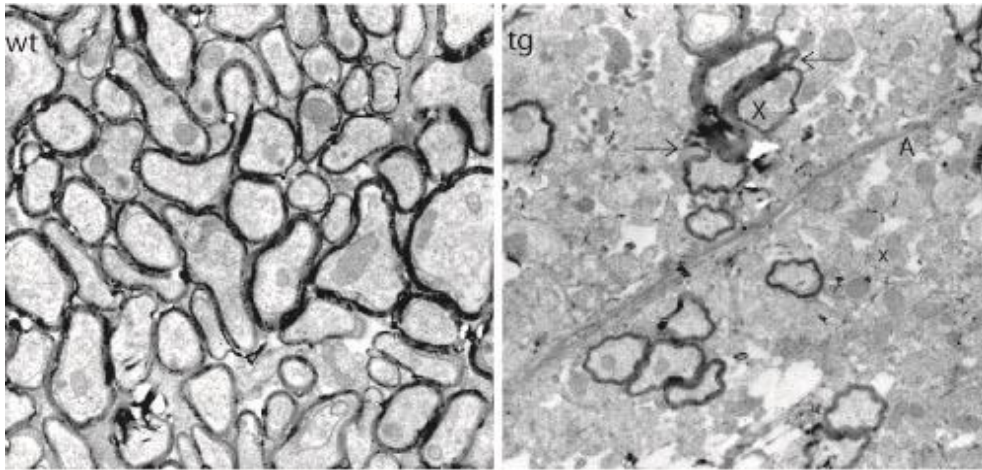
## Einleitung

Die PMD ist definiert durch Mutationen im *PLP1*-Gen, das für das Proteolipid-Protein (PLP) kodiert. Die häufigste Ursache ist eine Duplikation des *PLP1*-Gens (Mimault et al. 1999). Des Weiteren sind *Missense*-Mutationen und Deletionen bekannt. Durch die Erkrankung sind Oligodendrozyten nicht mehr in der Lage, ausreichend funktionsfähiges Myelin zu bilden, was elektronenmikroskopisch als Dysmyelinisierung zu erkennen ist (siehe Abb. 3). Im Verlauf kommt es sekundär zum Untergang des fehlerhaft aufgebauten Myelins, was als Demyelinisierung bezeichnet wird (Abb. 3). Die fehlende Unterstützung des Oligodendrozyten für das Axon führt schließlich zur axonalen Degeneration und zum Funktionsverlust (Abb. 4). Dabei führt die Überexpression von *PLP1*- Boten-Ribonukleinsäure (mRNA) zur Akkumulation von PLP im endosomalen/lysosomalen Kompartiment und den daraus folgenden Konsequenzen zur *Toxic Gain of function* (Simons et al. 2002). *PLP1* entwickelt folglich bei einer Duplikation neben den physiologischen Funktionen eine toxische Wirkung.

Während der Myelinisierung ist der Oligodendrozyt metabolisch äußerst aktiv (Pfeiffer et al. 1993). Die tägliche Proteinbiosyntheseleistung beträgt circa  $1.75 \times 10^{-7}$  mg Protein pro Tag, das entspricht der dreifachen Proteinmasse des Perikaryons (Garbern 2007). Im Falle der *PLP1*-Duplikation wird ebenso vermehrt PLP synthetisiert (Anderson et al. 1998), der Energiebedarf eines Oligodendrozyten ist folglich während der Myelinisierung zusätzlich erhöht. Dies könnte einer der Mechanismen sein, der zur *Toxic gain of function* bei der *PLP1*-Duplikation beiträgt.

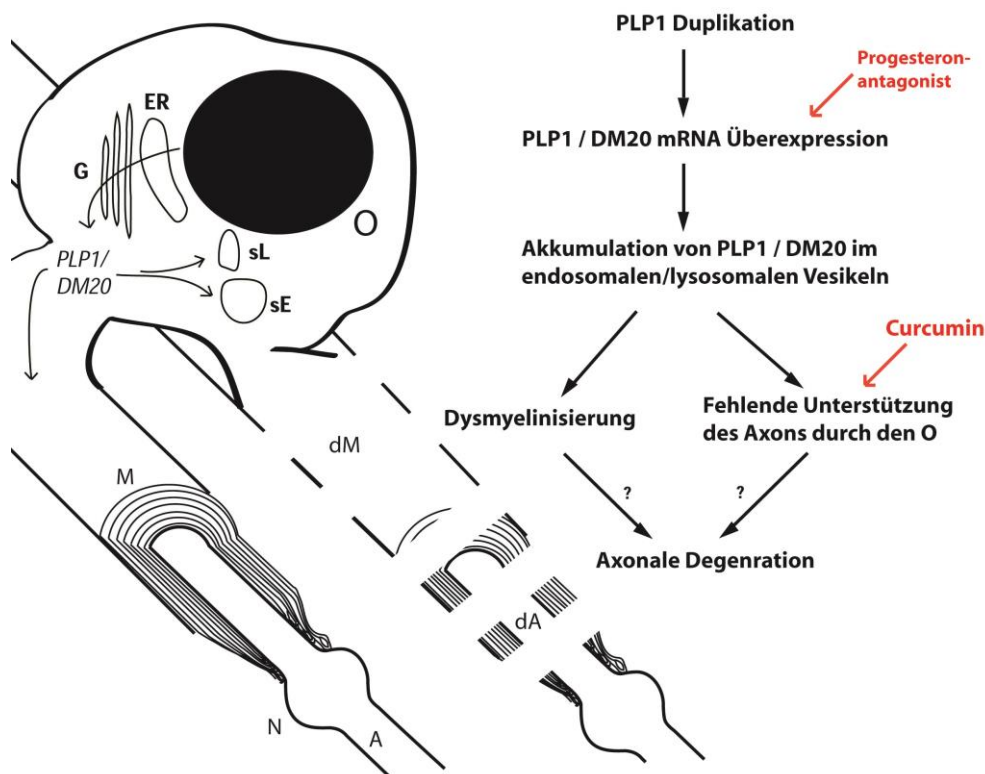
Der Energiebedarf eines Axons ist aufgrund der enormen Distanz zum Soma und den damit verbundenen Transportprozessen hoch. Kommt es zur Demyelinisierung erhöht sich dieser aufgrund der gestörten Verteilung der Ionenkanäle (Campbell und Mahad 2011; Andrews et al. 2006). Das Gehirn ist während des Reifungsprozesses besonders anfällig für Schädigungen durch freie Radikale, da es eine hohe Verfügbarkeit von Eisen, jedoch ein unvollständig entwickeltes System von Radikalfängern hat (Blomgren und Hagberg 2006). Bei *PLP1*-Überexpression spielen Mitochondrien eine zentrale Rolle bei der Apoptose des Oligodendrozyten, wobei Änderungen des intrazellulären pH-Wertes gefolgt von oxidativem Stress zum Zelltod führen können (Cerghet et al. 2001).

## Einleitung



**Abb. 3: Ultrastrukturelle Pathologien der PMD im Mausmodell**

EM-Aufnahmen des *Tractus corticospinalis* (Rückenmark) der Maus links Wildtyp (Wt), rechts PMD-Mausmodell (tg) bei 12000 x: Beim Wildtyp sind eng gepackte, myelinisierte Axone sichtbar; Das PMD-Mausmodell zeigt nur wenige, ausschließlich hypomyelinisierte Axone (X) mit einer Ablösung des Myelins vom Axon (Pfeile), demyelinisierte Axone (x) und Aussprossung von Astrozytenfortsätzen (A).



**Abb. 4: Schema der Pathogenese der PMD bei der Duplikation des Gens *PLP1***

Die *PLP1*-Duplikation führt zu einer toxischen Überexpression von *PLP1/DM20*-mRNA und Proteinen, was eine Akkumulation von PLP und DM20 in endosomalen oder lysosomalen Vesikeln erzeugt. Dies bewirkt morphologisch eine Dysmyelinisierung und funktionell eine fehlende, vor allem metabolische, Unterstützung der Axone durch die Oligodendrozyten. In der Folge kommt es zur axonalen Degeneration. Der Progesteron-antagonist verringert die Transkription von *PLP1* während Curcumin die metabolische Überforderung des Oligodendrozyten reduzieren soll. (A = Axon; dA = axonale Degeneration; dM = Dysmyelinisierung; ER = Endoplasmatisches Retikulum; G = Golgi-Apparat; M = Myelin; N = Nukleus; sE = Endosom; sL = Lysosom)

## Einleitung

Aufgrund der Vielzahl unterschiedlicher *PLP1*-assoziierter Gendefekte und der Lokalisation auf dem X-Chromosom werden gänzlich unterschiedliche klinische Manifestationen beobachtet. Neben asymptomatischen, weiblichen Trägern werden klinisch zwei verschiedene Krankheiten die PMD einerseits und Spastische Paraplegie Typ 2 (SPG2) andererseits unterschieden. Bei der SPG2 sind die Symptome auf das Rückenmark beschränkt. Sie äußert sich in einer spastischen Paraparese der Beine und autonomen Dysfunktionen. Die PMD zeigt darüber hinaus Beeinträchtigungen der Hirnfunktionen mit unter anderem kognitiven Einschränkungen, epileptischen Anfällen, Ataxie, Dystonie und Nystagmus. Die PMD hat verschiedene Verlaufsformen, die nach ihren Erstbeschreibern in „konnatal“ (Seitelberger 1954), „klassisch“ (Pelizaeus 1885; Merzbacher 1910) und *PLP1* Null Syndrom eingeteilt werden (siehe Tabelle 1). Häufig sind jedoch auch Mischformen, so dass PMD und SPG2 als Enden eines Kontinuums gesehen werden können (Inoue 2005). Punktmutationen verursachen meist schwerere Verläufe als Duplikationen, Deletionen haben die beste Prognose. Von der Klinik eines Betroffenen kann jedoch nicht auf den zugrundeliegenden Genotyp geschlossen werden, da es eine weitgehend komplette Überlappung gibt.

## Einleitung

**Tabelle 1: Spektrum der *PLP1*-assoziierten Erkrankungen**

Seitelberger (Seitelberger 1970) unterschied eine konnatale Verlaufsform der PMD im Unterschied zu den Erstbeschreibern (Pelizaeus 1885; Merzbacher 1910), die die klassische PMD beschrieben. Den einzelnen Verlaufsformen kann keine zugrundeliegende Mutation des *PLP1* zugeordnet werden. (modifiziert nach Wolf et al. 1993)

Erkrankung	Beginn	Neurologische Befunde	Gang	Sprache	Todeszeitpunkt
Schwere konnatale PMD	Neugeborenenalter	Nystagmus, Hypotonie, Spastik, Stridor, kognitive Einschränkung	nicht möglich	fehlend	Säuglingsalter bis 3. Dekade
Klassische PMD	0 - 5 Jahre	Nystagmus während der ersten 2 Monate, Hypotonie, spastische Tetraparese, Ataxie ± Dystonie, Athetose, kognitive Einschränkung	mit Hilfe möglich, während der Jugend Verlust der Gehfähigkeit	vorhanden	3. - 7. Dekade
<i>PLP1</i> Null Syndrom	0 - 5 Jahre	Kein Nystagmus, milde spastische Tetraparese, Ataxie, Polyneuropathie, leichte bis mittelschwere mentale Retardierung.	vorhanden	vorhanden	5. - 7. Dekade
„Komplizierte“ spastische Paraplegie (SPG2)	0 - 5 Jahre	Nystagmus, Ataxie, autonome Dysfunktion, spastisches Gangbild, leichte bis keine mentale Retardierung.	vorhanden	vorhanden	4. - 7. Dekade
„Unkomplizierte“ spastische Paraplegie (SPG2)	Normalerweise 0-5 Jahre, selten 3.-4. Dekade	autonome Dysfunktion, spastisches Gangbild	vorhanden	vorhanden	Normal

### 1.5 Das Mausmodell der PMD

Es gibt klare Unterschiede zwischen Leukodystrophien bei Menschen und Tiermodellen aufgrund von Größe, Lebensspanne und kognitiver Entwicklung. Jedoch existieren verschiedene Mausmodelle für die PMD, die den Verlauf der humanen PMD gut nachbilden. Es gibt Spontanmutationen mit Deletion genannt „Jimpy“ (Nave et al. 1986) und *Missense*- Punktmutationen „Rumpshaker“ (Schneider et al. 1992). Für komplette Deletionen (Boison und Stoffel 1994; Klugmann et al. 1997) und Duplikationen (Kagawa et al. 1994; Readhead et al. 1994) wurden transgene Mäuse kreiert. Diese bilden den humanen Krankheitsverlauf klinisch und histologisch gut ab und haben sich bei der Erforschung der Pathogenese der PMD als sehr wertvoll erwiesen. Da die *PLP1*-Duplikation die häufigste Form der PMD darstellt (Mimault et al. 1999), wurden für die vorliegende Arbeit homozygote Tiere der Linie 72 verwendet (Readhead et al. 1994; Anderson et al. 1998), die folgend

## Einleitung

PMD-Mäuse genannt werden. Diese tragen drei extra Kopien des kompletten *PLP1*-Gens der Maus inklusive der 3,5 kb 5' regulatorischen Region per haploidem Genom, welche hochwahrscheinlich Tandem integriert sind, da sich eine Cosegregation in den Folgegenerationen zeigte (Readhead et al. 1994). Sie weisen einen der klassischen PMD beim Menschen vergleichbaren Phänotyp auf und der Verlauf der Erkrankung ähnelt am ehesten dem von Patienten, die eine Xq22 Mikroduplikation tragen. Die erhöhte *PLP1*-Expression verursacht eine schwere Neuropathologie mit vorzeitigem Abbruch der Oligodendrozytendifferenzierung, Dysmyelinisierung und Astrogliose, aber vergleichsweise geringer glialer Apoptose (Cergnet et al. 2001). Nachdem die Mäuse bei Geburt klinisch unauffällig sind, entwickeln sie mit zunehmendem Alter eine Ataxie, dann Tremor und schließlich Krampfanfälle. Die PMD-Mäuse haben im Vergleich zu Wildtypmäusen ein geringeres Gewicht. Sie versterben vorzeitig im Alter von 5-6 Monaten. Der Prozess der Myelinerhaltung nach Abschluss der Myelinisierung, der bei Mäusen im Alter von ca. 60 Tagen eintritt, lässt sich mit diesem Tiermodell im Vergleich zu anderen, die bereits während der Myelinisierung versterben, gut untersuchen.

### **1.6 Der Progesteronrezeptor als Zielstruktur therapeutischer Strategien bei der PMD**

Progesteron hat als Sexualhormon eine Vielzahl unterschiedlicher Funktionen in der Steuerung der Reproduktion. Gemeinsam mit Östrogen reguliert es über *Feedback*-Mechanismen im Hypothalamus und der Hypophyse den menstruellen Zyklus, Schwangerschaft und reproduktives Verhalten. Daneben hat es aber noch reproduktionsunabhängige Effekte im ZNS, die unter anderem Kognition, Stimmung, Entzündung, mitochondriale Funktion, Neurogenese, Neuroregeneration und Myelinisierung beeinflussen.

Progesteronrezeptoren (PR) kommen im gesamten ZNS in Neuronen, Oligodendrozyten, Astrozyten und Mikroglia vor. Unter anderem wurden sie im *Hippocampus*, *Hypothalamus*, *Thalamus*, *Kortex*, *Cerebellum*, *Bulbus olfactorius* und Rückenmark nachgewiesen (Guerra-Araiza et al. 2001; Kato et al. 1993; Labombarda et al. 2000). Dabei werden 4 verschiedene Rezeptoren unterschieden (Brinton et al. 2008): Die klassischen nukleären Isoformen, Progesteronrezeptor Isoform A (PRA) und Isoform B (PRB) und Spleißvarianten dieser, der transmembranöse PR (7TMPR $\beta$ ) und membran-assoziierte PR (PGRMC1). Die Zinkfingerproteine PRA und PRB sind durch Liganden aktivierte Transkriptionsfaktoren. Nach Bindung von Progesteron ändern sie ihre Konformation, bilden ein Dimer und binden an spezifische Sequenzen den *Progesterone response elements* (PREs) in der Promotorregion von Zielgenen (Leonhardt et al. 2003; Edwards et al. 1991; Allan et al. 1992). Klassische PREs sind jedoch nicht essentiell, da Progesteron auch die Expression von Genen induzieren kann, die nicht über diese Elemente verfügen (Groshong et al. 1997; Richer et al. 1998; Owen et al. 1998). Der 7-Transmembran-Protein-Rezeptor  $\beta$  (7TMPR $\beta$ ) dagegen ist ein membranständiger G-Protein gekoppelter Rezeptor. Wenn Progesteron an ihn bindet, blockiert er

## Einleitung

die Aktivität der Adenylatcyclase und verhindert so den Anstieg von intrazellulärem, cyclischen Adenosinmonophosphat (cAMP), einem *Second Messenger*. Ein weiterer membranständiger Rezeptor ist der sogenannte 25-DX PR, der ebenfalls eine nicht-genomische Wirkungsweise hat. Das bei der Ratte charakterisierte 25 kDa, aus 223 Aminosäuren bestehende Protein (25-DX), entspricht beim Menschen zwei orthologen Genen hrp6.6 (X-Chromosom, 195 Aminosäuren) und Dg6 (Chromosom 4, 223 Aminosäuren). Nach Aktivierung dieses Rezeptors steigt die intrazelluläre Calciumkonzentration (Falkenstein et al., 1999). Die unterschiedlichen Effekte der Progesteronwirkung im ZNS lassen sich zusammenfassend durch drei prinzipielle Mechanismen erklären: Regulation der Genexpression, Modulation von Neurotransmittersystemen und Aktivierung von Signalkaskaden (Brinton et al. 2008).

In sämtlichen Neuroglia des ZNS werden durch Progesteron verursachte Veränderungen beobachtet. In Nervenzellen werden Neuroprotektion, Neurogenese, Zellproliferation, Exzitabilität und synaptische Plastizität stimuliert (Leonelli et al. 2007; Giachino et al. 2003; Wang et al. 2005; Gibbs 2000; Gould et al. 1990; Feng et al. 2004). Astrozyten verändern ihre Größe (Klintsova et al. 1995; Cashion et al. 2003) und bilden vermehrt GFAP (Saures Gliafaserprotein) unter Progesteroneinfluss (Stone et al. 1998; Giachino et al. 2004). Progesteron kann Mikroglia von einem proinflammatorischen Status in einen neuroprotektiven, antiinflammatorischen Zustand versetzen (Habib und Beyer 2015).

Progesteron fördert die Oligodendrozytenproliferation, Differenzierung und Maturation (Labombarda et al. 2009). Oligodendrozyten exprimieren vermehrt Myelinproteine nach Progesterongabe (Schumacher et al. 2007a; 2007b; Baulieu und Schumacher 2000). Induziert wird MBP (Ghoumari et al. 2003) durch klassische Aktivierung und Aktivierung des Gamma-Aminobuttersäure-Rezeptors (GABA<sub>A</sub>-R). Labombarda et al. (2009) zeigten, dass bei Langzeitprogesteronbehandlung die *PLP1*-Expression sowohl auf mRNA- als auch Proteinebene ansteigt. Auch die 2',3'-Cyclic nucleotide-3'-Phosphodiesterase (CNP) wird durch Progesteron ebenfalls vermehrt exprimiert (Jung-Testas und Baulieu 1998).

Mit Lonaprisan (ZK230211) steht ein Progesteronantagonist (PA) zur Verfügung, der verglichen mit Mifepriston und Onapriston eine starke und anhaltende Bindung zum PRE ausbildet und eine geringere agonistische Aktivität zeigt (Afhüppe et al. 2010). Das Einfügen einer 17 $\alpha$ -Pentafluorethyl Seitenkette erzeugte eine Kombination von hoher antiprogestiner Aktivität mit nur sehr geringen endokrinologischen Nebenwirkungen (Fuhrmann et al. 2000). Lonaprisan ist ein potenter Antagonist bei beiden PR Isoformen PR-A und PR-B und hat nur marginale antigluocorticoide Wirkung (Fuhrmann et al. 2000).

In Pilotexperimenten zeigte Prukop (2008), dass Lonaprisan bei subkutaner Injektion die Blut-Hirn-Schranke überwindet. Hierzu wurde Hirngewebe von Wildtypmäusen 1,3,9 und 24 Stunden nach der letzten Gabe von Lonaprisan mittels Massenspektroskopie untersucht, wobei die höchste Konzentration mit circa 11 $\mu$ mol/l nach 9h erreicht wurde. Wegbereitend war eine zehntägige Kurzzeitstudie mit Lonaprisan an PMD-Mäusen, bei der die mRNA-Expression von *PLP1* bei einer

## Einleitung

Dosis von 125 mg/d signifikant reduziert werden konnte. Nach täglicher, subkutaner Gabe wurde nach 10 Tagen im Hirngewebe eine Reduktion der Transkription von *PLP1* in Richtung Wildtyp-Niveau demonstriert (Prukop 2008). Hiermit war der Nachweis gelungen, dass Lonaprisan die toxische Überexpression von *PLP1* senken kann.

### **1.7 Curcumin als pleiotroper Wirkstoff gegen die Demyelinisierung bei der PMD**

Curcumin (Diferuloylmethan, CU) ist ein pflanzliches Polyphenol, gewonnen aus dem Rhizom der *Curcuma longa*. Das Mehl, das aus der Wurzel der *Curcuma longa* gewonnen wird, wird Turmeric genannt und enthält als biologisch aktivsten Bestandteil 2-8% Curcumin (Sharma et al. 2007). Es wird in der Lebensmittelindustrie als Farbstoff E100 oder als Currygewürz verwendet. Die orale Bioverfügbarkeit von Curcumin ist gering, aufgrund einer Kombination aus ausgeprägtem First-Pass-Effekt, schlechter gastrointestinaler Resorption, schneller Elimination und der hohen Hydrophobizität (Epstein et al. 2010).

Die glucuronidierten und sulfatierten Metabolite besitzen eine reduzierte Aktivität (Ireson et al. 2001). Ein Metabolit, Tetrahydrocurcumin, jedoch besitzt eine größere antioxidative Potenz als Curcumin (Okada et al. 2001; Naito et al. 2002). In verschiedenen Mausmodellen wurde gezeigt, dass Curcumin nach oraler Gabe die Blut-Hirn-Schranke überwindet (Lim et al. 2001; Perry et al. 2010; Purkayastha et al. 2009). Begum et al. (2008) beschreiben nach einmaligen sowie Langzeitgaben messbare Curcuminspiegel im Gehirn nach der Gabe von circa 83 mg/kg Körpergewicht Curcumin pro Tag.

Curcumin hat antiinflammatorische (Srimal und Dhawan 1973; Satoskar et al. 1986), antioxidativen (Reddy und Lokesh 1994), antimikrobielle (Negi et al. 1999), antifungizide (Apisariyakul et al. 1995) und antitumoröse (Kuttan et al. 2007) Eigenschaften. Die Wirkung ist dabei abhängig vom Zelltypus und wird durch unterschiedliche molekulare Mechanismen übertragen. Curcumin bildet Chelatkomplexe mit Eisen oder Kupfer (Hegde et al. 2011), reguliert die Genexpression (Aggarwal et al. 2003), interagiert direkt mit Bestandteilen (Thiolen) der Mitochondrienmembran (Morin et al. 2001) und absorbiert Sauerstoffradikale (Singh et al. 2011).

Bei der PMD könnte Curcumin folglich als Antioxidans und direkter Radikalfänger, aber auch als Chelator von Eisen fungieren und so die Lipidperoxidation verhindern (Sreejayan et al., 1994). Bei neurodegenerativen Erkrankungen wurde eine exzessive Akkumulation von Eisen und Kupfer festgestellt, die einerseits die Bildung von reaktiven Sauerstoffradikalen induzieren und andererseits die Reparatur-Enzyme der Desoxyribonukleinsäure (DNA) hemmen (Li et al. 2009). Curcumin konnte als Chelator und Antioxidans beide Effekte in Neuroblastomzellen nahezu egalisieren (Hegde et al. 2011).

Die PMD hat eine inflammatorische Komponente, wobei kontrovers diskutiert wird, ob diese sekundär auftritt und deshalb ein Epiphänomen darstellt. Tatsächlich werden bei *PLP1*-überexpre-

## Einleitung

mierenden Mäusen im ZNS ein vermehrtes Auftreten von Immunzellen insbesondere Mikroglia und eine Erhöhung von Entzündungsmarkern noch vor der Myelinisierung festgestellt (Tatar et al. 2010). Diese werden folglich nicht reaktiv durch den Untergang von Myelin, sondern durch die toxische Überexpression von *PLP1* induziert. Die Entzündung kann ebenfalls zur axonalen Degeneration beitragen (Groh et al. 2016). Die antiinflammatorische Wirkung von Curcumin wird vor allem durch die Hemmung von Lipoxigenase und Cyclooxygenase (Rao 2007) auf der Ebene der Genexpression vermittelt. Ein Teil der antiinflammatorischen Wirkung ist zudem auf die antiproliferative Eigenschaft von Curcumin zurückzuführen (Gautam et al. 1998). Es kann in den Zellzyklus eingreifen, indem es die Genexpression von Cyclinen und Cyclin-abhängigen Kinasen beeinflusst (Mackenzie et al. 2008; Cai et al. 2009). Zusätzlich wurde in verschiedenen Zelllinien die Hemmung der *Nuclear factor kappaB*-Signalkaskade und damit Hemmung der von Tatar et al. (2010) beschriebenen Chemokinen TNF-alpha und IL-6 Expression in *PLP1*-überexprimierenden Mäusen festgestellt (Reuter et al. 2009; Spiller et al. 2011; Lee et al. 2007; Jin et al. 2007).

Der Effekt von Curcumin auf die Genexpression im Gehirn ist zelltypspezifisch divers. Curcumin ist ein potenter Inhibitor des Activating Protein-1 (Sikora et al. 1997) und blockiert hierdurch die von Glutamat induzierte Apoptose von Neuronen (Chen et al. 2003). In aktivierten Mikroglia unterdrückt Curcumin die Expression der NADPH-Oxidase und der Nitritoxid-Synthetase und erhöht somit die Anzahl der überlebenden Oligodendrozyten (He et al. 2010). In Astrozyten bewirkt Curcumin den Efflux von Glutathion und wirkt damit neuroprotektiv (Stridh et al. 2010). Die Genexpression von Oligodendrozyten wird vor allem in der oxidativen Stressantwort, der Kontrolle des Zellzyklus, der DNA-Transkription, und dem DNA-Metabolismus beeinflusst (Panchal et al. 2008). Ein Effekt auf die Myelinenexpression ist bisher nicht bekannt.

Darüber hinaus wurde Curcumin in verschiedenen Mausmodellen von neurodegenerativen Erkrankungen angewandt und erzielte zum Teil vielversprechende Ergebnisse bei Modellen für den M. Alzheimer (Lim et al. 2001; Baum und Ng 2004), oder M. Parkinson (Mythri et al. 2011; Pal et al. 2011). Yu et al. (2012) demonstrierten eine Verlängerung der Überlebenszeit sowie eine Verringerung der Apoptoserate von Oligodendrozyten bei einem Mausmodell für Punktmutationen der PMD nach Curcumingabe. Jedoch konnte hier kein Hinweis auf die funktionelle Wirkungsweise von Curcumin gefunden werden.

### 1.8 Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit war, den potentiell therapeutischen Effekt von Lonaprisan, einem Progesteronantagonisten, und Curcumin, einem pleiotropen Wirkstoff, auf die PMD zu untersuchen, einer Leukodystrophie, für die bisher keine kausale Therapie bekannt ist. Langfristiges Ziel der vorliegenden Untersuchung war einen kausalen Therapieansatz zu entwickeln, der perspektivisch zur Verbesserung der Behandlung von PMD-Patienten beitragen könnte. Da ein Mausmodell vorhanden war, welches den Verlauf der humanen PMD gut nachahmt (Readhead et al. 1994), wurden zeitaufwendige Zellkulturexperimente übersprungen, um Zeit im Sinne der



## Einleitung

PMD-Patienten einzusparen.

Die PMD ist eine schwere Leukodystrophie, die definiert ist durch Mutationen des auf dem X-Chromosom befindlichen Gens *PLP1*, welches für das Proteolipid-Protein kodiert. Die PMD wird in den meisten Fällen durch eine *PLP1*-Genduplikation (Mimault et al. 1999) und daraus folgender schädlicher Überexpression von PLP, dem Hauptbestandteil der Myelinproteine des ZNS, verursacht.

Bei der PMD wird ein axonaler Verlust beobachtet (Anderson et al. 1998), welcher mit den neuroprotektiven und antioxidativen Eigenschaften von Curcumin (Mazaheri et al. 2015; Tegenge et al. 2014) aufgehalten werden sollte. Curcumin hat bereits bei einem anderem Mausmodell für die PMD, mit einer Punktmutation für *PLP1*, einen positiven Effekt auf die Überlebenszeit gezeigt (Yu et al. 2012).

Die Strategie mit Lonaprisan einer hormon-basierten, pharmakologischen Behandlung der *PLP1*-Überexpression in vivo entgegenzuwirken, entspringt der *Proof-of-principle* Studie von Sereda et al. (2003). In dieser wurde ein Progesteronantagonist (Onapriston, Bayer-Schering) im PNS verwendet, um die Überexpression des peripheren Myelinproteins 22 (PMP22) in Schwannzellen in einem transgenen Tiermodell der Charcot-Marie-Tooth-Krankheit (CMT1A) zu verringern.

Das vorliegende Projekt wurde in 3 konsekutiven Schritten ausgeführt:

- 1) Etablierung von notwendigen Applikationsformen und molekularen Methoden zur Analyse. Die Entwicklung einer klinischen Untersuchungsmethode, um interindividuelle Unterschiede im Schweregrad der Erkrankung auszumachen.
- 2) Durchführung der Behandlungsstudie mit vier Armen: mit Placebo behandelte Wildtyp-Mäuse, mit Placebo behandelte PMD-Mäuse, mit Lonaprisan behandelte PMD-Mäuse und mit Curcumin behandelte PMD-Mäuse. Tägliche, subkutane Injektionen von Placebo- oder Wirkstoff suspension. Zu Beginn, am Ende und im Verlauf der Studie erfolgten regelmäßige klinische Untersuchungen und Überprüfung der Motorik mittels *Grid Test*.
- 3) RNA-Expressionanalyse, histologische Untersuchung des ZNS und Auswertung.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien

**Tabelle 2: Chemikalien und Hersteller**

Agarose	Bio-Rad, Hercules, USA
Amylalkohol	Merck, Darmstadt
Azur-II-Farbstoff	Merck, Darmstadt
Benzylbenzoat	Sigma, Hamburg
Blei-II-Nitrat	Merck, Darmstadt
bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma, Hamburg
Chloroform	Merck, Darmstadt
Chlorhydrat	Merck, Darmstadt
DAB (3-3'-Diaminobenzidin)	Dako, Hamburg
DDSA (2-Duodecenylnsuccinicanhydrid)	Serva, Heidelberg
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Dinatriumhydrogenphosphat-2-hydrat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ )	Merck, Darmstadt
DMP-30 (2,4,6-tris-Dimethylaminomethyl-Phenol)	Serva, Heidelberg
DTT (1,4-Dithiotreitol)	Gibco BRL, Karlsruhe
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Formvar	Merck, Darmstadt
Glutardialdehyd	Merck, Darmstadt
Glycidether	Serva, Heidelberg
Hämalaun	Merck, Darmstadt
HBSS (Hanks Balanced Salts Solution)	Gibco BRL, Karlsruhe
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kalialaun	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
Magermilchpulver	Naturaflor Töpfer
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt
Methylenblau	Merck, Darmstadt
Methylnadicanhydrid (MNA)	Serva, Heidelberg
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat-hydrat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt

## Material und Methoden

Natriumjodid	Merck, Darmstadt
Osmiumtetroxid	Serva, Heidelberg
Paraformaldehyd	Serva, Heidelberg
Propylenoxid	Serva, Heidelberg
RNA-Marker	Agilent-Technologies, Böblingen
Salzsäure (HCl)	Serva, Heidelberg
Sesamöl	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Standard-RNA (eukaryot)	Promega, Mannheim
Stickstoff, flüssig	Air Liquide, Düsseldorf
Tris-Acetat mit Ethylendiamintetraacetat (TAE)	Merck, Darmstadt
Taq-Polymerase Puffer	Promega, Mannheim
Tribrommethanol	Serva, Heidelberg
Trinatriumcitrat-dihydrat	Merck, Darmstadt
Uranylacetat	Merck, Darmstadt
Xylol	Merck, Darmstadt
Ziegenserum	Invitrogen, Karlsruhe
Zitronensäure	Carl Roth, Karlsruhe

## 2.2 Verbrauchsmaterial

**Tabelle 3: Verbrauchsmaterial und Bezugsquellen**

CO <sub>2</sub> -Gas	Messer-Griesheim, Krefeld
Einmalhandschuhe	Hartmann, Heidenheim
Einschlussmittel Eukitt	Kindler, Freiburg
Eppendorfgefäße	Eppendorf, Hamburg
Injektionskanülen, Größe: 17G, 20G, 23G	Becton & Dickinson, Le Pont De Claix, Frankreich
Objektträger	Menzel-Gläser, Braunschweig
Objektträger Histobond	Marienfeld, Königshofen
PCR-Mikrotiterplatten	ABgene, Surrey, UK
PCR-Plattenfolie Air Pore Sheet	ABgene, Surrey, UK
Pipettenspitzen	Molecular Bioproducts, San Diego, USA
Präparationsbesteck:	
chirurgische Pinzette	Fine Science Tools, Heidelberg
gerade Schere	Fine Science Tools, Heidelberg
gebogene Schere	Fine Science Tools, Heidelberg
Serum-Monovette, Größe: 2,6 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Spritzen NormInjekt, Größe: 1ml	Henke Saas Wolf, Tuttlingen
Transferpipetten	Bio-Rad, Hercules, USA

## Material und Methoden

Trockeneis	Messer-Griesheim, Krefeld
Weichholzgranulateinstreu Bedding S8/15	Ssniff Spezialdiäten, Soest

### 2.3 Lösungen und Puffer

Avertin-Narkoselösung:

Tribrommethanol 1 g

Amylalkohol 0,81 ml

H<sub>2</sub>O (destilliert) 71,49 ml

Wasser auf 40 °C erwärmen. Amylalkohol und Tribrommethanol abwiegen und mit dem Wasser mischen. Circa 10 min auf dem Magnetrührer rühren lassen. Die fertige Lösung steril filtrieren und im Kühlschrank lagern, vor Sonneneinstrahlung in dunklem Gefäß schützen. Dosierung: 0,2 ml / 10g Körpergewicht. Intraperitoneale Injektion.

Bleicitrat (Reynolds 1963):

H<sub>2</sub>O (frisch abgekocht, frei von CO<sub>2</sub>) 30 ml

Blei-II-nitrat 1.33 g

Trinatriumcitrat-dihydrat 1.76 g

Das Gesamte gut schütteln und 30 min stehen lassen. Dann unter Schwenken tropfenweise max. 8 ml 1N NaOH zugeben, bis die Lösung klar wird. Lösung mit H<sub>2</sub>O auf 50 ml auffüllen und bei 4 °C ca. 3 Wochen maximal haltbar.

DEPC-H<sub>2</sub>O:

H<sub>2</sub>O 1000 ml

DEPC 1 ml

Über Nacht bei 37 °C inkubieren, dann autoklavieren bei 121 °C für eine Stunde.

Fixativ für die Licht- und Elektronenmikroskopie (Karlsson und Schultz 1965):

Glutardialdehyd (25%) 100 ml

H<sub>2</sub>O 500 ml

Paraformaldehydlösung (10 %) 400 ml

Dinatriumhydrogenphosphat-2-hydrat 15,5 g

Natriumchlorid 5,0 g

Natriumdihydrogenphosphat-hydrat 1,8 g

Das Paraformaldehyd (50 g) auf 500 ml mit H<sub>2</sub>O vermengen und auf 60°C erhitzen. Danach mit 1 M Natronlauge klar filtrieren. Die restlichen Bestandteile hinzugeben. Mit dem Magnetrührer ca. 30 min rühren. Danach abkühlen lassen und steril filtrieren. Den pH-Wert dann mit HCl auf 7,2 bis 7,4 einstellen.

## Material und Methoden

Fixierungslösung für die Immunhistochemie (1000 ml):

0,2 M Natriumdihydrogenphosphat 100 ml

0,2 M Dinatriumhydrogenphosphat 400 ml

37% Formol, abfiltriert durch zwei Faltenfilter 100 ml

aqua bidestillata 400 ml.

Formvar-Lösung zum Befilmen von Kupfergrids:

Formvar 0,25 g in eine dunkle Flasche geben. Chloroform 100 ml durch einen getrockneten Papierfilter in die Flasche laufen lassen. Flasche verschließen und 24 h lang bis zur kompletten Auflösung des Formvars stehen lassen.

Kunstharzmischung Epon (Luft 1961):

Glycidether 21,4 g

DDSA 14,4 g

MNA 11,3 g

10 min mit Magnetrührer rühren

DMP-30: 0,84 ml zugeben.

20 min mit Magnetrührer rühren.

Methylen-Azur-II-Färbelösung (Richardson et al. 1960):

Methylenblau-Lösung: 1% Methylenblau in 1% wässriger Boraxlösung

Azur-II-Lösung: 1% Azur II in H<sub>2</sub>O

Beide Lösungen in einem Verhältnis von 1:1 mischen.

PBS/BSA:

0,2 M Natriumdihydrogenphosphat 20 ml

0,2 M Dinatriumhydrogenphosphat 80 ml

NaCl 1,8 g

BSA 1 g

aqua bidestillata 100 ml.

Saures Hämalaun:

Hämalaun 1 g

Natriumjodid 0,1 g

Kalialaun 50 g

Unter Schütteln in 1 l aqua bidestillata lösen.

Chlorhydrat 50 g

Zitronensäure 1 g

## Material und Methoden

zugeben und mischen.

Scotts Lösung:

Kaliumhydrogencarbonat 2 g

Magnesiumsulfat 20 g

aqua bidestillata ad. 1000 ml.

Trispuffer:

Stammlösung (0,5 M, pH 7,6):

TRIS (hydroxymethyl)-aminomethan 60,75 g

in 500 ml aqua bidestillata lösen, mit 1 M HCl auf pH 7,6 einstellen und mit H<sub>2</sub>O auf 1000 ml auffüllen.

Gebrauchslösung (0,05 M, pH 7,6):

Stammlösung 100 ml

NaCl 9 g

mit H<sub>2</sub>O auf 1000 ml auffüllen.

Trispuffer + 2% Milchpulver (1000 ml)

Trispuffer Gebrauchslösung 1000 ml

Magermilchpulver 20 g

Über Faltenfilter abfiltrieren.

## 2.4 Enzyme

**Tabelle 4: Enzyme und Hersteller**

DNase freie Ribonuklease (RNase) H	Invitrogen, Karlsruhe
Proteinase K (Lyophilisat; auf 10 U/μl einstellen)	Roche Diagnostics, Mannheim,
RedTaq DNA Polymerase (5 U/μl)	Sigma, Hamburg

## 2.5 Reaktionskomplettausstattungen

**Tabelle 5: Reaktionskomplettausstattungen**

Absolute QPCR ROX Mix	Abgene, Hamburg
DNeasy 96 Kit	Qiagen, Hilden
LSAB2 Kit für die Immunhistochemie	Dako, Hamburg
RedTaq PCR Reaction Buffer, 10x	Sigma, Hamburg
RNasin RNase-Inhibitor	Promega, Mannheim
RNA 6000 Nano Assay	Agilent Technologies, Böblingen
RNeasy Lipid Tissue Mini Kit	Qiagen, Hilden
Superscript III Reverse Transcriptase Kit	Invitrogen, Karlsruhe

### 2.6 Nukleinsäuren und Nukleotide

**Tabelle 6: Nukleinsäuren und Nukleotide**

Desoxyribonukleosid-Triphosphate (dNTPs)	Roche Diagnostics, Mannheim
DNA-Größenmarker Lambda/HindIII	Promega, Walldorf
DNA-Größenmarker PhiX174/HaeIII	Promega, Walldorf
zufällige <i>Nonamerprimer</i>	Sequenzierungsabteilung, Max-Planck-Institut (MPI) für exp. Med.

### 2.7 Oligonukleotide

Mithilfe des Programms DNASTAR SeqMan und Primer Express 1.65 wurden *Primer* konstruiert. Die Herstellung erfolgte in der Abteilung Sequenzierung des MPI für experimentelle Medizin (Göttingen). Die mit den Farbstoffen 6-Carboxy-Fluorescein (FAM), Tetrachloro-6-carboxy-fluorescein (TET) und 6-Carboxy-tetramethylrhodamin (TAMRA) markierten Sonden stammten von Eurogentec (Brüssel, Belgien).

*Primer* von *CNP*:

*CNP* Fwd: 5'-GACCTGGCTGGCTACTGCC

*CNP* Rev: 5'-CCGCTCGTGGTTGGTATCAT

*Primer* und TaqMan-Sonde von *Exon1B* des *PMP22*-Gens:

*Exon1B* Fwd: 5'-GCTGTCCCTTTGAACTGAAA-3'

*Exon1B* Rev: 5'-GAACAGGATCCCCAACAAGAGTAG-3'

*Exon1B* Sonde: 5'-TET-AGCCCAACTCCCAGCCACCATG-TAMRA-3'

*Primer* von *MAG*:

*MAG* Fwd: 5'-TCTACCCGGGATTGTCACTG

*MAG* Rev: 5'-GCAGCCTCCTCTCAGATCC

*Primer* und TaqMan-Sonde zur Unterscheidung hetero- und homozygoter transgener Mäuse:

*Neuregulin1* Fwd: 5'-GTTTGACAGGTCCTTCACCATG-3'

*Neuregulin1* Rev: 5'-GTGTGCGGAGAAGGAGAAA-3'

*Neuregulin1* Sonde: 5'-FAM-TCTGTGTGAATGGACGCGAGTGCTTC-TAMRA-3'

*Primer* zur Genotypisierung transgener Mäuse:

*PLP1* Fwd: 5'-CAGGTGTTGAGTCTGATCTACACAAG-3'

*PLP1* Rev: 5'-GCATAATACGACTCACTATAGGGATC-3'

## Material und Methoden

*Primer* und TaqMan-Sonde zur Unterscheidung hetero- und homozygoter transgener Mäuse:

*PLP1* Fwd: 5'-TCAGGCAGATCTTTGGCGAC-3'

*PLP1* Rev: 5'-TGTTACCGTTGCGCTCAGG-3'

*PLP1* Sonde: 5'-FAM-ACAAGACCACCATCTGCGGCAAG-TAMRA-3'

*Primer* und TaqMan-Sonde von *PLP1*:

*PLP1* Fwd: 5'-GGCTAGGACATCCCGACAAG-3'

*PLP1* Rev: 5'-GCAAACACCAGGAGCCATACA-3'

*PLP1* Sonde: 5'-FAM-TTGTGGGCATCACCTATGCCCTGA-TAMRA-3'

## 2.8 Antikörper

**Tabelle 7: Antikörper**

Antikörper	Hersteller	Verdünnung
CD3 (monoklonal, Ratte)	Serotec	1:150
GFAP (monoklonal, Maus)	Novocastra	1:200
MAC-3 (monoklonal, Ratte)	PharMingen	1:400
OLIG-2 (polyklonal, Haase)	Dana-Farber Cancer Institute	1:200

## 2.9 Pharmaka

**Tabelle 8: Pharmaka**

Curcumin	HALDI Turmeric Powder, TRS Wholesale Co. LTD. Southhall Middlesex, UK
Lonaprisan	Bayer Pharma, Berlin

## 2.10 Geräte

**Tabelle 9: Geräte**

Agarose-Gelkamm	MPI exp. Med. wiss. Werkstatt
Agarose-Gelkammer	MPI exp. Med. wiss. Werkstatt
Agarose Geldokumentation ImageMaster VDS	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Agilent Bioanalyzer 2100	Agilent Technologies, Böblingen
Ausgießstation AP 280	Microm, Walldorf
Diamantmesser Ultrathin Diamond Knife 45°	Diatome U.S., Fort Washington, USA
Drucker Color Laser Jet 4650	Hewlett-Packard, Böblingen
7500 Fast RealTime PCR System	Applied Biosystems, Darmstadt
Feinwaage	Heraeus Instruments, Langenselbold



## Material und Methoden

Fräse für Epon-Präparate Leica EM Trim	Leica Microsystems, Wetzlar
Gefrierschrank -20 °C	Liebherr, Ochsenhausen
Gefrierschrank -85 °C Ultra Low Freezer	New Brunswick Scientific, Nürtingen
Gelladestation für Agilent Bioanalyzer	Agilent Technologies, Böblingen
Gewebe-Einbettautomat Lynx el	Vision BioSystems Inc, Norwell, USA
Gewebehomogenisierer Ultraturrax T8	IKA Labortechnik, Staufen
Gewebeinfiltrationsautomat (Paraffin) HMP 110	Microm, Walldorf
Glaswaren	Schott, Mainz
<i>Grid Test</i>	MPI exp. Med. wiss. Werkstatt
Inova 4000 Incubator Shaker	New Brunswick Scientific, Nürtingen
Magnetrührer RCT basic Ikamag	Omnilab, Bremen
Lichtmikroskop Leica DM RXA2	Leica Microsystems, Wetzlar
Elektronenmikroskop Zeiss EM 900	Zeiss, Oberkochen
PCR-Thermocycler T3	Biometra, Göttingen
PCR-Versiegeler Combi Thermosealer	Advanced Biotechnologies, Surrey, UK
Peristaltikpumpe	Heraeus Instruments, Langenselbold
Pipetten, Größen: 10µl, 20µl, 200µl, 1000µl	Gilson, Villiers-le-Bel, Frankreich
Präparationsbesteck, chirurgisch	Fine Science Tools, Heidelberg
Quarzküvette	Hellma, Müllheim (Baden)
Rotationsmikrotom Reichert Ultracut S	Reichert, Wien, Österreich
Reinstwasseranlage Arium 611 VF	Sartorius, Göttingen
Schlittenmikrotom HM400	Microm, Walldorf
Spannungsgeräte Elektrophorese	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Spektralphotometer	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Stangentesteinrichtung	MPI exp. Med. wiss. Werkstatt
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Tierkäfige	Tecniplast, Buguggiate, Italien
Trocknungszentrifuge Speed Vac	Eppendorf, Hamburg
Videomikroskopie-Kamera	Hamamatsu, Herrsching
Probenmischgerät Vortex Genie 2	Bender & Hobein, Zürich, Schweiz
Zentrifugen	
Centrifuge 5403 bis -10 °C	Eppendorf, Hamburg
Biofuge pico	Heraeus Instruments, Langenselbold
Mikrozentrifuge	Carl Roth, Karlsruhe
Zentrifuge 4K15C	Sigma, Osterode am Harz

## Material und Methoden

### 2.11 Software

**Tabelle 10: Software**

DNASTAR SeqMan	DNASTAR Inc., Madison, USA
Excel für Windows 10 Professional	Microsoft Corporation, Redmond, USA
ImageJ	<a href="http://www.rsb.info.nih.gov/ij/">www.rsb.info.nih.gov/ij/</a>
Illustrator CS4	Adobe Systems Software, Saggart, Irland
Photoshop CS4	Adobe Systems Software, Saggart, Irland
PrimerExpress v1.65	Applied Biosystems, Foster City, USA
PyRAT	Scionics Comp. Innovation GmbH, Dresden
Statistica 7.0	StatSoft Europe, Hamburg
Word für Windows 10 Professional	Microsoft Corporation, Redmond, USA

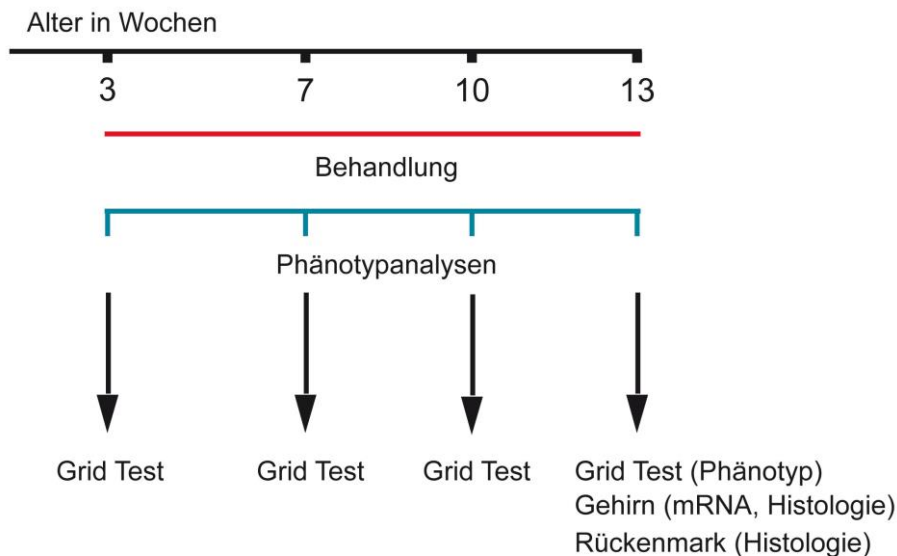
Sämtliche Daten wurden mit Excel für Windows 10 Professional verarbeitet und mit Statistica 7.0 ausgewertet. Zum Vergleich der Placebo- und Behandlungsgruppen wurden die Ergebnisse mit dem *Student's t-Test* für unverbundene Stichproben untersucht, wobei Abweichungen mit einem  $p < 0,05$  als signifikant gewertet wurden. Die Korrelationen wurden mit dem *Spearman's Rang* Korrelationstest überprüft, wobei ein  $p < 0,05$  als signifikant gewertet wurde. In allen Abbildungen wurden jeweils der Mittelwert und der Standardfehler dargestellt.

### 2.12 Studiendesign

Die vorliegende Therapiestudie ist randomisiert eingeteilt und über die gesamte Studiendauer geblindet, placebokontrolliert durchgeführt worden (Abb. 5). Im Alter von 3 Wochen wurden ausschließlich männliche Tiere gewogen und der Phänotyp mit dem *Grid Test* untersucht. Anhand der Gewichtsdaten, der Phänotypergebnisse und der Wurfzugehörigkeit sind die transgenen (tg) Mäuse gleichmäßig auf die Placebo-Kontrollgruppe und Behandlungsgruppen zugeordnet worden. Zudem wurden Wildtypmäuse, die für die Gesamtwildtypgruppe repräsentativ waren, als eine weitere Placebo- Kontrollgruppe hinzugefügt.

Die Blindung erfolgte über ein Doppelbenennungssystem für die Tiere. Die Identifizierung eines einzelnen Tieres und die damit verbundene Zugehörigkeit zu einer Behandlungsgruppe war bei sich wiederholenden Ohrlochmarkierungen und damit Tiernummern nur mit einer zugehörigen Identifizierungskarte über die darauf vermerkte Wurfzugehörigkeit möglich (siehe 2.13.1). Die Wurfzugehörigkeit wurde durch ein fortlaufendes Zahlensystem verschlüsselt und Tiere unterschiedlicher Würfe wurden im selben Käfig zusammengesetzt. Somit war die Wurfzugehörigkeit nicht nachvollziehbar und damit die Tieridentifikation dem verantwortlichen Untersucher (D.B. Epplen) nicht möglich. Vermieden wurde Tiere gleicher Ohrlochmarkierungen in denselben Käfig zu setzen, sonst wäre die Tieridentifikation auch der verblindenden Person (T. Prukop) nicht mehr möglich gewesen.

## Material und Methoden



**Behandlungsgruppen: Plp1 tg Mäuse (Lonaprisan, Curcumin)**  
**Kontrollgruppen: Wt Mäuse (Placebo); Plp1 tg Mäuse (Placebo)**

### Abb. 5: Studiendesign mit Darstellung der zeitlichen Abfolge der Analysen

Die Studie bestand aus 4 Armen: mit Placebo behandelte Wildtyp-Mäuse (Wt), mit Placebo behandelte transgene (tg) PMD-Mäuse, mit Lonaprisan behandelte PMD-Mäuse und mit Curcumin behandelte PMD-Mäuse. Sämtliche Tiere waren männlich. PMD-Mäuse wurden ab einem Alter von 3 Wochen für die Dauer von 10 Wochen oral mit Curcumin und dem Progesteronantagonisten (PA) Lonaprisan durch tägliche subkutane Applikationen behandelt. Die Studienbedingungen waren definiert durch: 1. Studienbeginn im Alter von 3 Wochen. 2. Behandlung über 10 Wochen; 3. Quantifizierung des pathologischen Phänotyps durch den *Grid Test* und die klinische Untersuchung (im Alter von 3, 7, 10, 13 Wochen); 4. Histologische und mRNA-Expressionsanalysen des ZNS.

Studienbeginn war im Alter von 3 Wochen mit der täglichen Gabe von Curcumin über das Futter und täglichen, subkutanen Injektionen von Placebo oder Lonaprisan. Im Abstand von 3 oder 4 Wochen wurde der Phänotyp mittels Gewichtsmessung, klinischer Untersuchung und *Grid Test*, jeweils bei 3, 7, 10 und 13 Wochen Alter der Tiere untersucht. Histologische Analysen (s.u.) und mRNA-Expressionsanalysen (s.u.) erfolgten zum Studienende im Alter von 13 Wochen (Abb. 5).

## 2.13 Tierhaltung und Analyse

### 2.13.1 Mauszucht und Maushaltung

Ausschließlich männliche Mäuse vom Stamm C57/Black6N aus homozygoter Zucht der zuvor beschriebenen *PLP1*-transgenen (tg) Mäuse der Linie #72 (Readhead et al. 1994) wurden eingesetzt. Sie werden in dieser Arbeit als PMD-Mäuse bezeichnet. Die Tierhaltung erfolgte unter standar-disierten Bedingungen im Tierhaus des MPI für experimentelle Medizin (Göttingen)

## Material und Methoden

entsprechend den Empfehlungen der deutschen Gesellschaft für Versuchstierkunde. Die Haltung der Mäuse erfolgte in Gruppen von 2 bis 4 Tieren.

### **2.13.2 Identifikation der Versuchstiere**

Im Alter von 3-4 Wochen wurden die Mäuse durch ein Ohrstanzgerät mit einer Lochkodierung versehen. Die Identifizierung der einzelnen Tiere erfolgte durch die Ohrlochmarkierung in Kombination mit einer jeweils an jedem Käfig befestigten Karte. Auf dieser waren für jedes im Käfig befindliche Tier die fortlaufende Tiernummer, das Geschlecht, das Geburtsdatum und die Nummern der Elterntiere vermerkt. Zur Verwaltung der Zucht wurde das Datenbankprogramm PyRAT (Scionics Computer Innovation GmbH, Dresden) verwendet.

### **2.13.3 Schwanzbiopsie**

Für Schwanzbiopsien wurde eine Kurzinhalationsnarkose mit CO<sub>2</sub> durchgeführt. Schwanzbiopsien wurden im Alter von 3-4 Wochen während des Absetzens von der Mutter durchgeführt, um daraus genomische DNA zur Genotypisierung zu gewinnen. Dabei wurde ein etwa 0,5 cm langes Schwanzstück mit einer Schere entfernt. Die Schwanzbiopsie wurde in einem Reaktionsgefäß bei minus 20°C gelagert.

### **2.13.4 Stangenhaltetest (*Bar Test*)**

Der Stangenhaltetest im Alter von 4 und 8 Wochen wurde von demselben Untersucher unter Blindung für den Genotyp durchgeführt. Die Tiere wurden auf die Mitte einer runden Stange mit einem Durchmesser von 1,2 cm und griffiger Oberfläche gesetzt. Die Höhe über dem Boden betrug 25 cm. An beiden Enden war die Stange begrenzt, auf einer Länge von 50 cm konnten die Mäuse sich frei bewegen. Gemessen wurde die Haltezeit auf der Stange bis zum Herunterfallen in Sekunden bei jedem Tier 3 Mal. Die Messung wurde nach einem Maximalwert von 180 Sekunden abgebrochen. Aus den 3 Versuchen pro Tier wurde der Mittelwert berechnet.

### **2.13.5 Rotarod Test**

Die Tiere wurden unter Blindung für den Genotyp auf ein elektrisch angetriebenes Laufrad gesetzt (Durchmesser 10 cm, Laufbreite 7 cm). Die Messzeit betrug maximal 5 min. Die Umdrehungszahl wurde von der Apparatur automatisch gesteigert. Wenn die Mäuse nicht mehr so schnell laufen konnten, wie sich das Laufrad drehte, fielen sie nach hinten herunter, was den Endpunkt der Zeitmessung bedeutete. Aufgetragen wurde der Mittelwert von 3 Versuchen.

### **2.13.6 Grid Test**

Der *Grid Test* ist eine Methode zur Erfassung der koordinativen Leistungsfähigkeit von Mäusen.

## Material und Methoden

Unter Blindung für die Behandlungsgruppe und den Genotyp wurden die Tiere auf ein 50 cm langes Gitter gesetzt. Das Gitter bestand während der Studie aus in 1 cm Abstand entfernten Gitterstäben. In Vorbereitung auf die Studie wurden auch Untersuchungen mit Gitterstäben in 2 cm Abstand durchgeführt. Die Tiere mussten dieses viermal in Folge überqueren. Hierbei bestimmten die Mäuse selbst ihre Geschwindigkeit. Auf der Wegstrecke von zwei Metern wurde die Anzahl an Fehlritten gezählt (Abb. 6).



**Abb. 6: Untersuchung der Motorik mit dem *Grid Test***

Die Mäuse wurden auf ein Ende des Gitters gesetzt und die Anzahl der Fehlritte wurde gezählt. Das Gitter musste viermal überquert werden, so dass insgesamt eine Strecke von 2 Metern zurückgelegt wurde. Fotografiert wurde eine Maus seitlich zur Laufrichtung.

### **2.13.7 Phänotypanalyse mit der klinischen Bewertungsskala**

Die klinische Bewertungsskala ist eine Methode zur Erfassung der charakteristischen, klinischen Symptome des PMD Tiermodells. Unter Blindung für die Behandlungsgruppe und den Genotyp wurden die Tiere auf eine Platte gesetzt und ihre spontanen Bewegungen einer Punkteskala zugeordnet:

- 1 = normaler Bewegungsablauf, sicherer Gang, ohne Auffälligkeiten
- 2 = ataktisches Gangbild
- 3 = Tremor
- 4 = Krampfanfall
- 5 = Tod

### **2.13.8 Fütterung von Curcumin**

Die Gabe von Curcumin erfolgte über das Futter. Hierzu wurde Turmericpulver aus dem Rhizom der *Curcumuma longa* als 1:6 Mischung in normales Futter (pelletierte Standarddiät: Ssniff R/M-H V1535) mit Wasser eingearbeitet. Curcumin stellt den hauptsächlich aktiven Bestandteil des Turmericpulvers mit ca. 3% dar (Goel et al., 2008). Dies entspricht einem Anteil von ca. 0,5% im

## Material und Methoden

Mäusefutter. Die PMD-Mäuse erhielten Futter ad libitum. Die Gabe erfolgte nach der Gruppeneinteilung im Alter von 3 Wochen bis zum Ende der Studie. Für die Phänotypisierung wurden die Tiere wie die anderen Behandlungsgruppen zur Verblindung in andere Käfige ohne Futter umgesetzt.

### **2.13.9 Injektion von Placebo- und Lonaprisansuspension**

Lonaprisan ist subkutan gewichtsadaptiert mit einer Zieldosis von 125 mg/kg Körpergewicht injiziert worden. Die Placebosuspension wurde im Verhältnis 9:1, Sesamöl zu Benzylbenzoat, angesetzt und als Basis für die Wirkstoffsuspension verwendet. Die Wirkstoffsuspension enthielt 2,5 mg Lonaprisan pro 100 µl Suspension und 40 µl Injektionsvolumen pro 10 g Körpergewicht wurden appliziert. Die Gabe erfolgte täglich nach der Gruppeneinteilung im Alter von 3 Wochen bis zum Endpunkt der Studie.

### **2.13.10 Narkose und Tötung von Mäusen**

Zur Probengewinnung am Endpunkt der Studie wurden die Versuchstiere durch eine intraperitonealen Avertininjektion getötet. Unmittelbar anschließend wurden die Gewebe für mRNA-Analysen entnommen und danach die Perfusionsfixierung der Versuchstiere zwecks histologischer Probengewinnung eingeleitet (s.u.).

### **2.13.11 Hirn- und Rückenmarkspräparation**

13 Wochen alte PMD-Mäuse und Wildtyp-Kontrollen wurden 6 Stunden nach der letzten Applikation getötet. Die Hirnentnahme erfolgte über das Offenlegen des *Foramen magnum* durch Dekapitation der Versuchstiere. Mit einer Schere wurde die Schädelkalotte entfernt. Das offen liegende Hirn wurde entnommen und sofort in flüssigen Stickstoff überführt. Die Gehirne wurden bis zur mRNA-Expressionsanalyse im Tiefkühlschrank bei -80°C gelagert. Es folgte die Eröffnung des Wirbelkanals nach distal durch Laminektomie. Die Präparation wurde bis zum *Vertebra prominens C7* bei der Kreuzung der beiden *Musculi rhomboidei* durchgeführt. Das gesamte zervikale Rückenmark wurde entnommen. Die Fixierung durch Diffusion erfolgte für den kranialen Teil, der immunhistologisch untersucht werden sollte in 4% Paraformaldehydlösung. Der kaudale Teil wurde in Fixativ nach Karlsson und Schulz (1965) bei 4 °C nachfixiert um somit für die weitere Verarbeitung zur elektronenmikroskopischen Untersuchung vorbereitet zu werden.

## **2.14 Genotypisierung von Mäusen**

### **2.14.1 Gewinnung von DNA aus Mausschwanzgewebe**

Die Genotypisierung von Mäusen zur Unterscheidung von Wildtyp- und transgenen Tieren ist mit genomischer DNA aus Schwanzbiopsien mithilfe des „DNeasy 96 Kits“ durchgeführt worden. Die

## Material und Methoden

Schwanzbiopsien wurden in einer Mischung aus 180 µl Puffer ATL und 20 µl Proteinase K bei 55 °C über Nacht verdaut. Nach kurzer Zentrifugation wurde die Proteinase K durch 10-minütige Inkubation bei 95°C in einem Wasserbad inaktiviert. Dem Lysat wurden 400 µl Puffer AL/E hinzugegeben und nach kurzer Zentrifugation (1 min, 3000 Umdrehungen pro Minute (rpm)) wurde der Überstand (maximal 900 µl) auf die Silicamembran der Säulchen pipettiert. Bei der anschließenden Zentrifugation (10 min, 6000 rpm) wurde die DNA an der Silicamembran aufgefangen. Die Silicamembran wurde folgend zweimalig durch 500 µl Puffer AW1 und 500 µl Puffer AW2 gewaschen und nachfolgend zentrifugiert (5 min, 6000 rpm). Zur Elution der gebundenen DNA wurden 200 µl vorgewärmter Puffer AE zugegeben. Nach 5 min Inkubation bei 60 °C erfolgte die Zentrifugation (2 min, 6000 rpm) mit Auffangen der DNA in einem Eppendorfcup. Der gleiche Vorgang wurde mit weiteren 100 µl Puffer AE wiederholt. Für die weitere Verwendung wurde die genomische DNA bei 4°C gelagert.

### 2.14.2 Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren

Mithilfe eines Spektralphotometers wurde die DNA- bzw RNA-Konzentration einer Lösung durch Messung der optischen Dichte bestimmt. Dazu wurde die Lösung 1:1000 verdünnt und die Extinktion in einer Quarzküvette bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Verunreinigungen wurden durch das Messen der Extinktion bei einer Wellenlänge von 280 nm detektiert. Ein Wert von 1.5-2.0 für das Verhältnis der optischen Dichte 260 nm/ 280 nm, war das Einschlusskriterium für äußerst gering verunreinigte Proben.

### 2.14.3 Polymerasekettenreaktion (PCR) mit genomischer DNA

Für die PCR nach Mullis et al. (1986) wurde ein Reaktionskit von Sigma verwendet. Die Reaktion basierte auf zwei spezifischen Oligonukleotiden, die als *Primer* bezeichnet werden, und an komplementäre Bereiche denaturierter DNA binden. Durch die hitzestabile DNA-Polymerase aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* (Taq-Polymerase) wurde anschließend die molare Menge der eingesetzten Matrizen-DNA in jedem Zyklus verdoppelt. Zur Unterscheidung von Wildtyp- und transgenen Mäusen wurde eine für das transgene *PLP1*-Gen der Maus spezifische Sequenz amplifiziert (Readhead et al. 1994). Verwendet wurde ein Reaktionsvolumen von 20 µl pro DNA-Probe.

1 µl Matrizen-DNA

2 µl 10x RedTaq Reaction Buffer

2 µl dNTPs (je Nukleotid f.c. 200 µM)

0,5 µl PLBH *Forward-Primer* (f.c. 150 nM)

0,5 µl PLBH *Reverse-Primer* (f.c. 150 nM)

1 µl RedTaq DNA-Polymerase (f.c.1,6 U/50 µl)

15 µl H<sub>2</sub>O

## Material und Methoden

Die DNA-Amplifikation enthielt 20 Zyklen nach folgendem Protokoll:

3 min – 95°C

30 s – 56°C

30 s – 72°C 32 Zyklen

30 s – 95°C

60 s – 56°C

10 min – 72°C

### 2.14.4 Agarose-Gelelektrophorese

Um die DNA-Fragmente nach ihrer Größe aufzutrennen, wurden 0,5-2% Agarose-Gele verwendet. Die Agarose wurde in 1x TAE-Puffer erhitzt. Nach Abkühlen wurde Ethidiumbromid (f.c. 1µg/ml) hinzugegeben und das Gemisch in eine Flachgelkammer gegossen. Die Geltaschen wurden durch das Einsetzen verschiedener Käme erhalten. Als Laufpuffer diente 1x TAE-Puffer. Die mit 1/10 Volumen Probenpuffer gemischten DNA-Proben wurden in die Geltaschen pipettiert und anschließend eine Spannung von 50-180 V angelegt. Aufgrund der Interkalation von Ethidiumbromid in die DNA konnten die DNA-Fragmente anschließend auf einem UV-Illuminator sichtbar gemacht werden. Als Größenmarker wurden 70-1350 bp Marker (Promega) verwendet.

### 2.14.5 Genotypisierung mithilfe der *TaqMan-RealTime-PCR*

Die *TaqMan-RealTime-PCR* wurde ursprünglich für mRNA-Expressionsanalysen auf der Basis von cDNA entwickelt, die Methode wird unter 2.15 mRNA-Expressionsanalyse beschrieben. Diese Methode kann jedoch auch verwendet werden, um die Anzahl an Genkopien in genomischer DNA zu quantifizieren. Homozygote PMD-Mäuse weisen im Vergleich zu heterozygoten Tieren doppelt so viele Kopien des transgenen *PLP1* auf. Das *Neuregulin 1* wurde als *Housekeeping*-Gen zur Kontrolle verwendet.

## 2.15 Quantifizierung der mRNA-Expression

### 2.15.1 Isolation von RNA

Die Gehirnhälften, die bei -80°C eingefroren waren, wurden mit dem Gewebehomogenisierer Ultraturrax zerkleinert. Die anschließende Isolation von mRNA erfolgte mithilfe des RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Quiagen) nach Protokoll des Herstellers. Die Konzentration der RNA wurde spektrometrisch bei OD260 gemessen. Um degradierte und kontaminierte Proben auszuschließen, wurde die Qualität der gewonnenen RNA mit dem *Agilent Bioanalyzer* mit dem *RNA 6000 Nano Assay* untersucht. Die RNA wurde bei -80 °C gelagert.



## Material und Methoden

### 2.15.2 Synthese komplementärer DNA (cDNA)

Die Quantifizierung von RNA-Transkripten ist nur indirekt durch Messung der cDNA möglich. Die cDNA muss daher zunächst durch reverse Transkription aus RNA hergestellt werden. cDNA wurde mit dem Superscript III Reverse Transcriptase Kit (Invitrogen, Karlsruhe) nach Angaben des Herstellers synthetisiert. Zu 2 µg isolierter RNA in einem sterilen Eppendorfgefäß wurden 40 U Ribonuklease (RNase)-Inhibitor RNasin und 100 pmol zufällige *Nonamerprimer* gegeben und dann bei 70 °C für 10 min inkubiert und anschließend auf Eis für 2 min gekühlt. Es folgte die Zugabe von:

8 µl 5x Erststrangpuffer,

10 µl 2,5 mM dNTP-Mix,

4 µl 0,1 M DTT und

1 µl (1 U) des Enzyms Superscript III RT reverse Transkriptase.

Verwendet wurde folgendes Inkubationschema: 10 min bei 25 °C, 50 min bei 42 °C, 15 min bei 70 °C und ca. 5 min auf Eis. Anschließend wurden 2 µl DNase freie RNaseH addiert und 20 min auf 37 °C erwärmt. Die fertige cDNA wurde auf ein Gesamtvolumen von 100 µl mit bidestilliertem Wasser aufgefüllt.

### 2.15.3 Quantitative *RealTime-PCR* (*qRT-PCR*)

Die *qRT-PCR* wurde mit Hilfe des ABI Prism 7700 Sequence Detection System durchgeführt. Dabei wurden zwei verschiedene Methoden die *TaqMan-RealTime-PCR* (Holland et al. 1991; Lee et al. 1993) und die *SYBR-Green-RealTime-PCR* (Huang et al. 1995) nach Angaben der Hersteller verwendet. Die PCR-Reaktion erfolgte in einer 96-Loch-Platte. Alle Reaktionen erfolgten als Triplikate, deren Amplifikationskurven nahezu identisch waren. Alle quantitativen *RealTime-PCRs* wurden zweimalig durchgeführt und der Mittelwert der Expression beider Ergebnisse wurde für die weitere Interpretation verwendet.

Für die Durchführung der *TaqMan- RealTime-PCR* wurden verwendet:

5 µl *Mastermix* (Eurogentec)

1 µl *Forwardprimer* (f.c. 900nM)

1 µl *Reverseprimer* (f.c. 900nM)

0,5 µl *TaqMan-Probe* (f.c. 250nM)

0,5 µl H<sub>2</sub>O

2 µl Proben cDNA

Für die Durchführung der *SYBR-Green- RealTime-PCR* wurden verwendet:

5 µl *SYBR-Green Master Mix*

0,1 µl *Forwardprimer* (10 pmol/µl)

0,1 µl *Reverseprimer* (10 pmol/µl)

## Material und Methoden

4,8 µl cDNA

Die *TaqMan- RealTime-PCR*-Reaktionen wurden unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt: Präinkubation für 2 min bei 50 °C und 10 min bei 95 °C zur Aktivierung der HotStart AmpliTaq Gold Taq Polymerase folgend 40 Zyklen mit einem Denaturierungsschritt für 15 Sekunden bei 95 °C und einem kombinierten *Annealing-/ Extension*sschritt für 60 Sekunden bei 60 °C. Für alle *SYBR-PCR- RealTime*-Reaktionen wurde folgendes Amplifikationsprotokoll verwendet: 10 min 95°C, 40 Zyklen: 15 s 95°C, 20 s 60°C, 40 s 72°C. Die *SYBR-Green*-Fluoreszenz wurde bei 72°C gemessen. Die relative RNA-Menge wurde in Bezug auf die jeweiligen *Housekeeping*-Gene (*Exon1B; Neuregulin 1*) berechnet.

## 2.16 Histologische Auswertung

### 2.16.1 Ganzkörperfixierung von Mäusen durch Perfusion

Anschließend an die Tötung der Versuchstiere und Präparation von Hirn und Rückenmark (siehe 2.13.11) wurde die Ganzkörperfixierung der Mäuse nach Karlsson und Schulz (1965) durchgeführt. Hierzu wurde in der Medianlinie zunächst das Abdomen, dann das *Diaphragma* und die Thoraxwand eröffnet und das Herz frei präpariert. Danach wurde ein Schnitt in den rechten Vorhof gesetzt und eine Kanüle in den linken Herzventrikel eingeführt. Über ein Infusionssystem wurde mit einer Peristaltikpumpe (Flussrate 2-5 ml/min) zunächst mit 25 ml HBSS und dann mit 50 ml Fixierlösung perfundiert. Zur Nachfixierung wurde der gesamte Körper für 24h in Fixans gelegt.

### 2.16.2 Immunhistologische Analyse von in Paraffin eingebettetem

#### Rückenmark

##### 2.16.2.1 Paraffineinbettung und Herstellung von Paraffinschnitten

Das zervikale Rückenmark wurde nach Diffusionsfixation (siehe 2.13.11) durch den Gewebeeinfiltrationsautomaten MICROM HMP 110 nach folgendem Programm (Tabelle 11) paraffiniert:

**Tabelle 11: Paraffineinbettung**

Lösung:	Dauer:
50% Ethanol	1h
70% Ethanol	2h
70% Ethanol	2h
96% Ethanol	1h
96% Ethanol	1h
100% Ethanol	1h
100% Ethanol	1h
Isopropanol	1h
Xylol	2h
Xylol	2h
Paraffin	2h
Paraffin	2h

## Material und Methoden

Anschließend wurden die Gewebeproben mithilfe einer Ausgießstation mit Paraffin ausgegossen. Die Paraffinschnitte wurden mit einem Schlittenmikrotom in einer Dicke von 5 µm hergestellt.

### **2.16.2.2 Immunhistochemische Färbung des zervikalen Rückenmarks**

Zur immunhistochemischen Färbung wurde das DAKO-LSAB2 System an Paraffinschnitten verwendet. 5 µm dicke Querschnitte von in Paraffin eingebettetem zervikalem Rückenmark wurden angefertigt, auf beschichtete Objektträger (Histobond) aufgenommen und zum Trocknen über Nacht bei 37°C gelagert. Zur Entparaffinisierung erfolgten eine zehnminütige Inkubation bei 60°C und eine absteigende Alkoholreihe. Danach wurden eine Inkubation über fünf Minuten in Zitratpuffer durchgeführt. Darauffolgend wurden die Schnitte zehn Minuten lang in Zitratpuffer bei 650 Watt in der Mikrowelle erwärmt und zwanzig Minuten lang bei Raumtemperatur abgekühlt. Dann wurden die Schnitte in Tris - Puffer mit 2% Milchpulver inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger in das Coverslip-System (DAKO) eingesetzt und in Tris-Puffer mit 2% Milchpulver gewaschen. Daraufhin wurde die endogene Peroxidase durch fünfminütige Inkubation mit 100 µl 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inaktiviert. Danach wurde Tris-Puffer mit 2% Milchpulver zum Spülen verwendet. Es folgte die Inkubation mit 1:5 verdünntem Ziegen Serum (100 µl) für 10 Minuten, um die unspezifische Hintergrundfärbung zu reduzieren. Das Ziegen Serum wurde abgeegossen und der primäre Antikörper (Mac3, GFAP, CD3, Olig2) in PBS/BSA aufgegeben. Die Schnitte wurden über Nacht bei 4°C inkubiert.

Am Folgetag wurden die Schnitte zunächst mit Tris-Puffer mit 2 % Milchpulver abgespült und dann für zehn Minuten bei Raumtemperatur mit dem biotinylierten Brückenantikörper (DAKO) inkubiert. Es erfolgte ein erneutes Spülen mit Tris-Puffer mit 2% Milchpulver. Schließlich wurde der *Horseradish*-Peroxidase-Streptavidin-Komplex (DAKO) hinzugegeben und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Ein erneutes Spülen mit Tris-Puffer wurde durchgeführt. Um eine hydrophobe Barriere um das Gewebe zu setzen, wurde es mit dem DAKO *Cytomation Pen* umkreist. Schließlich wurde 100 µl Diaminobenzidin (DAB) in Substratpuffer hinzugegeben, welches die enzymhistochemische Reaktion einging. Nach 10 Minuten wurde die DAB-Lösung entfernt. Es folgte zweimaliges Spülen in Wasser. Anschließend wurden die Schnitte für 30 Sekunden in Hämalaun gefärbt, kurz in HCl-Alkohol differenziert und in Scotts-Lösung gefärbt. Zum Schluss wurden die Schnitte durch eine aufsteigende Alkoholreihe dehydriert und mit Eukitt eingedeckt.

### **2.16.3 Einbettung in Kunstharz und Herstellung von Semi- und**

#### **Ultradünnschnitten**

Das zervikale Rückenmark wurde nach der Methode von Luft (1961) mit dem Kunstharz Epon infiltriert und eingebettet. Der Einbettautomat Lynx el führte die Eponinfiltration des Rückenmarks vollautomatisch durch. Hierzu wurde das Gewebe nach folgendem Protokoll (Tabelle 12) in die

## Material und Methoden

entsprechenden Lösungen getaucht:

**Tabelle 12: Einbettung in Epon**

Lösung:	Dauer:	Temperatur:
Phosphatpuffer 0,1M	15 Minuten	4°C
1%-OsO <sub>4</sub> / Osmiumtetroxid	2 Stunden	4°C
Phosphatpuffer 0,1M	20 Minuten	20°C
Phosphatpuffer 0,1M	20 Minuten	20°C
Phosphatpuffer 0,1M	20 Minuten	20°C
30% Ethanol	30 Minuten	20°C
50% Ethanol	30 Minuten	20°C
70% Ethanol	30 Minuten	20°C
90% Ethanol	30 Minuten	20°C
100% Ethanol	15 Minuten	20°C
100% Ethanol	15 Minuten	20°C
100% Ethanol	15 Minuten	20°C
100% Ethanol	15 Minuten	20°C
Isopropanol	15 Minuten	20°C
Propylenoxid	15 Minuten	20°C
Propylenoxid	15 Minuten	20°C
Propylenoxid: Epon 2:1	2 Stunden	20°C
Propylenoxid: Epon 1:1	2 Stunden	20°C
Propylenoxid: Epon 1:2	4 Stunden	20°C
Epon	4 Stunden	20°C

Anschließend an die Infiltration wurde das Rückenmark in eine Ausgießform gelegt, mit flüssigem Epon übergossen und für 24 Stunden bei 60 °C auspolymerisiert. Danach wurde der Eponblock mit einer Fräse an der Spitze zu einer Pyramidenform angeschliffen. Schließlich wurden mit einem Rotationsmikrotom 0,5 µm dicke Semidünnschnitte für die lichtmikroskopische und ca. 60 nm dicke Ultradünnschnitte für die elektronenmikroskopische Analyse hergestellt. Die Semidünnschnitte wurden auf Objektträger aufgenommen und nach Richardson (1960) gefärbt. Hierdurch wurde die Qualität des eingebetteten Gewebes überprüft und der *Tractus corticospinalis* lokalisiert. Die Ultradünnschnitte wurden auf mit Formvar beschichteten Kupfergrids aufgefangen.

### 2.16.4 Befilmen von Kupfernetzen mit Formvar

Gereinigte Objektträger wurden in eine spezielle Glasküvette mit 0,25% Formvar-Lösung gestellt. Wichtig war, dass nach dem Öffnen des Ventils der Küvette, die Formvarlösung gleichmäßig abließ,

## Material und Methoden

um einen ebenmäßigen Formvar-Film zu erhalten. Nach dem Trocknen wurde der Formvar-Film an allen vier Seiten des Objektträgers mit einer Rasierklinge angeritzt. Dann wurde der Objektträger im 45°-Winkel in eine mit Wasser gefüllte Küvette getaucht. Nach Abschwimmen des Formvarfilms wurden die Kupfergrids mit der Unterseite nach oben auf den schwimmenden Film gelegt. Mithilfe eines mit Papier beklebten Objektträgers wurde der Film mit den Grids aufgenommen und zum Trocknen aufgestellt.

### 2.16.5 Kontrastierung von Ultradünnschnitten

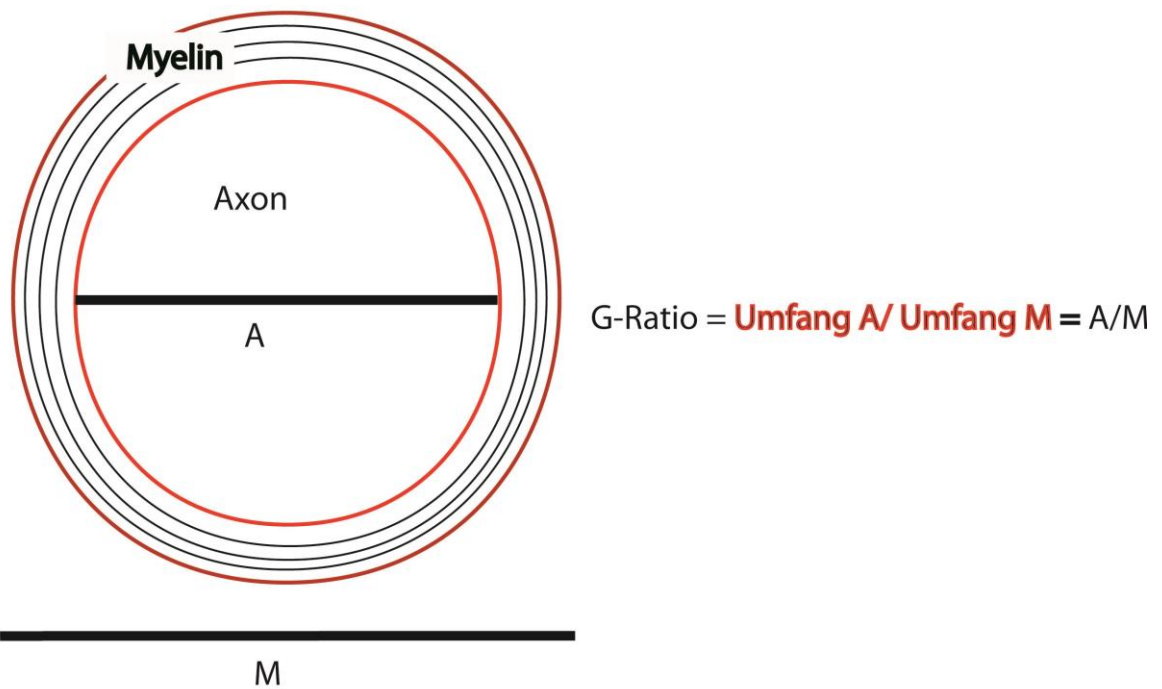
Die Grids mit den Ultradünnschnitten wurden mit einer wässrigen Lösung von zweiprozentigem Uranyl-Acetat für 26 Minuten kontrastiert. Nach dem Waschen mit Wasser erfolgte im zweiten Schritt die Kontrastierung mit Bleicitrat für 6 Minuten nach Reynolds (1963).

### 2.16.6 Quantifizierung und Auswertung der Histologie

Zur Größenberechnung des *Tractus corticospinalis* von PMD-Mäusen wurde von Semidünnschnitten des Rückenmarksquerschnitts lichtmikroskopische Fotografien mit einer Vergrößerung von 160x erstellt und die Einzelbilder mit Photoshop zusammengesetzt. Die Flächenberechnung erfolgte mit ImageJ. Die Fotografien wurden an einem Lichtmikroskop (Leica DM RXA2) mit einer Videomikroskopie-Kamera angefertigt.

Auch bei der Immunhistochemie wurden lichtmikroskopische Fotografien ausgewertet. Diese Aufnahmen wurden mit demselben Lichtmikroskop angefertigt. Bei den immunhistologischen Färbungen wurden vier zufällig ausgewählte Fotografien des *Tractus corticospinalis* in der Höhe des Wirbelkörpers C5 mit einer Vergrößerung von 160x aufgenommen und der Mittelwert der Gesamtanzahl der positiv gefärbten Zellen berechnet.

Zur Quantifizierung myelinisierter und unmyelinisierter Axone und der G-Ratio-Analyse (s.u.) im *Tractus corticospinalis* wurde das Elektronenmikroskop Zeiss EM 900 verwendet. Ausgewertet wurden die Bilder mit den Programmen Photoshop CS4 und dem Plugin Cell Counter von ImageJ. Nach Blindung für die Behandlungsarme wurden myelinisierte Axone auf vier zufällig ausgewählten Aufnahmen bei einer Vergrößerung von 4400x gezählt und die Anzahl addiert. Unmyelinisierte Axone wurden nach Blindung bei einer Vergrößerung von 12000x in vier zufällig ausgewählten, elektronenmikroskopischen Bildern ausgewertet. Die Dicke des Myelins in Relation zum Axondurchmesser wurde durch Analyse von elektronenmikroskopischen Bildern bestimmt. Hierbei wurde der innere und der äußere Umfang des Myelins aller Axone von 3 zufällig ausgewählten Bildern pro Tier im *Tractus corticospinalis* des Rückenmarkes bei einer Vergrößerung von 12000x vermessen. Der Quotient aus dem inneren und dem äußeren Umfang wird als G-Ratio bezeichnet und ist ein dimensionsloses Maß für die Myelindicke (Abb. 7). Der innere Umfang der Myelinscheide entspricht dem Umfang des Axons. Der axonale Durchmesser als Maß für die Axongröße wurde hieraus berechnet.



**Abb. 7: G-Ratio zur Beurteilung der Dicke der Myelinscheide**

Das sogenannte G-ratio ist das numerische Verhältnis zwischen Axondurchmesser und Durchmesser des myelinisierten Axons. Der Quotient aus Axon- (A) und Myelindurchmesser (M) ergibt ein Maß für die Dicke der Myelinscheide. Da Axone und Myelin eine nicht ideal runde Struktur haben, wurde der Quotient aus Axonumfang und Myelinumfang zur G-Ratio-Bestimmung gebildet. Unmyelinisierte Axone haben ein G-Ratio von 1, mit zunehmender Myelindicke werden die G-Ratios kleiner 1.

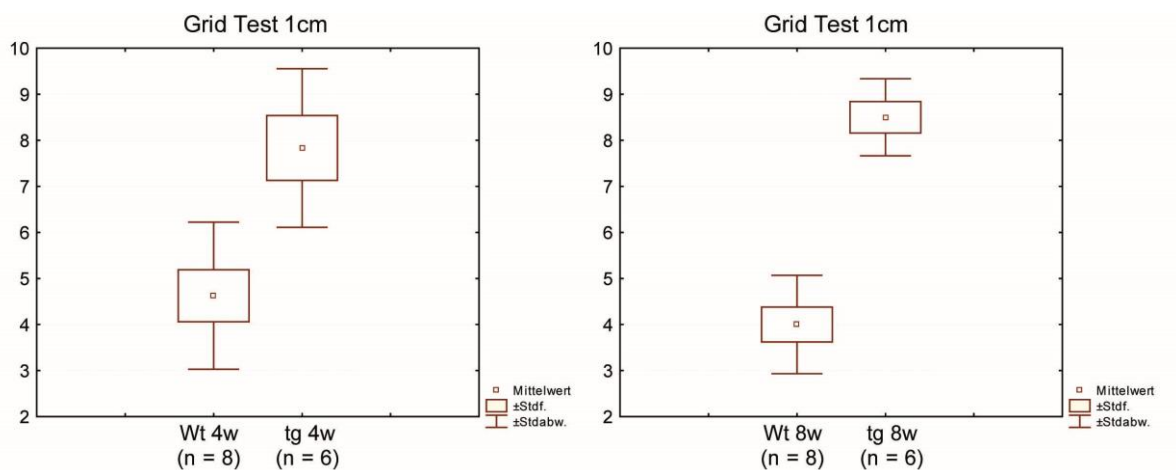
## 3. Ergebnisse

### 3.1 Auswahl eines geeigneten Testverfahrens zur Phänotypisierung

Die Motorik von PMD-Mäusen wurde im *Rotarod*, *Grid Test* und *Bar Test* untersucht, um ein geeignetes Testverfahren zur Messung der Schwere der Beeinträchtigung zu finden. Zur Vorbereitung der Therapiestudie wurden hierzu PMD-Mäuse im Alter von 4 und 8 Wochen mit Wildtyp-Kontrollen verglichen.

#### 3.1.1 *Grid Test* mit 1 cm Abstand zwischen den Gitterstäben

Die Mäuse mussten ein 50 cm langes Gitter mit Gitterstäben im Abstand von 1 cm vier Mal in Folge passieren, um eine Strecke von 2 Metern zu bewältigen. Dabei wurden die Fehlritte gezählt. Die Wildtypen (Anzahl (n) = 8; Mittelwert (MW) = 4,62; Standardfehler (Stdf) = 0,56) schnitten im Alter von 4 Wochen signifikant besser ( $p = 0,0037$ ) ab als die transgenen (tg) Tiere (n = 6; MW = 7,83; Stdf = 0,70). Mit Progress der Erkrankung im Alter von 8 Wochen nahm der Unterschied zwischen Wildtyp-Kontrollen (n = 8; MW = 4,00; SE = 0,38) und PMD-Mäusen (n = 6; MW = 8,50; Stdf = 0,34) zu ( $p = 0,000002$ ) (Abb. 8).



**Abb. 8: *Grid Test* mit 1 cm Abstand zwischen den Gitterstäben**

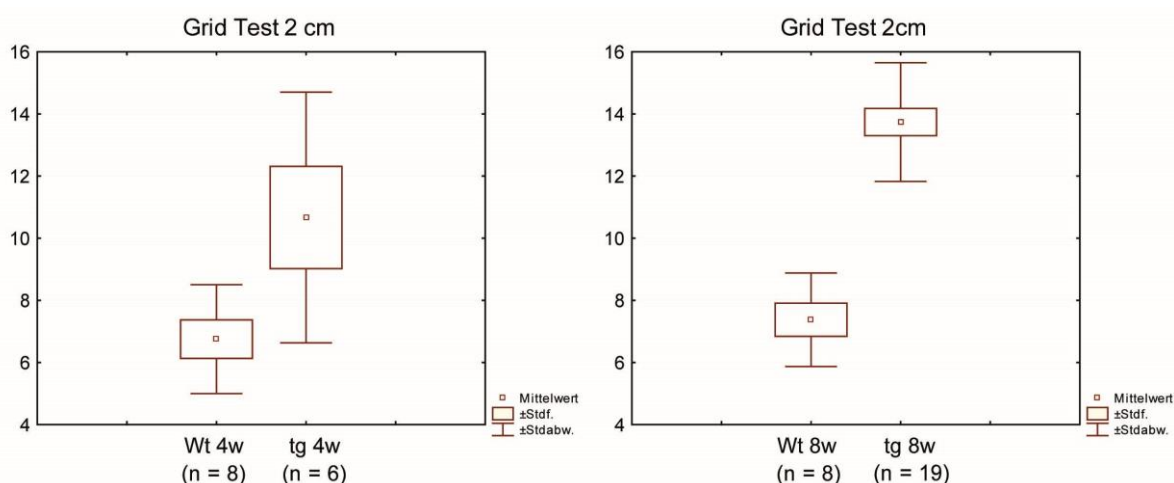
*Grid Test* von Wildtyp-Mäusen (Wt) und transgenen PMD-Mäusen (tg) mit einem Abstand der Gitterstäbe von 1cm im Alter von 4 Wochen (4w) links und 8 Wochen (8w) rechts (Y-Achse: Anzahl der Fehlritte). PMD-Mäuse schnitten zu beiden Zeitpunkten signifikant schlechter ab. Mit zunehmendem Alter und Fortschreiten der Erkrankung wurde der Unterschied größer.

#### 3.1.2 *Grid Test* mit 2 cm Abstand zwischen den Gitterstäben

Wildtyp und PMD-Mäuse mussten vier Mal ein 50 cm langes Gitter mit Abständen von 2 cm

## Ergebnisse

überqueren. Hierbei wurden die Fehlritte gezählt. Die Wildtypen ( $n = 8$ ;  $MW = 6,75$ ;  $Stdf = 0,61$ ) waren im Alter von 4 Wochen signifikant besser ( $p = 0,029$ ) als die transgenen Tiere ( $n = 6$ ;  $MW = 10,67$ ;  $Stdf = 1,65$ ), jedoch war die Standardabweichung deutlich größer und die Tiere benötigten deutlich mehr Zeit und wirkten zögerlicher, als beim *Grid Test* mit 1cm Gitterabstand. Mit Progress der Erkrankung im Alter von 8 Wochen zeigte sich auch hier eine Zunahme des Unterschiedes zwischen Wildtyp-Kontrollen ( $n = 8$ ;  $MW = 7,37$ ;  $Stdf = 0,53$ ) und PMD-Mäusen ( $n = 19$ ;  $MW = 13,74$ ;  $Stdf = 0,44$ ) zu ( $p < 0,05$ ). Allerdings war hier eine höhere Standardabweichung trotz höherer Anzahl an transgenen Tieren als bei 1cm Gitterabstand festzustellen (Abb. 9).



**Abb. 9: Grid Test mit 2 cm Abstand zwischen den Gitterstäben**

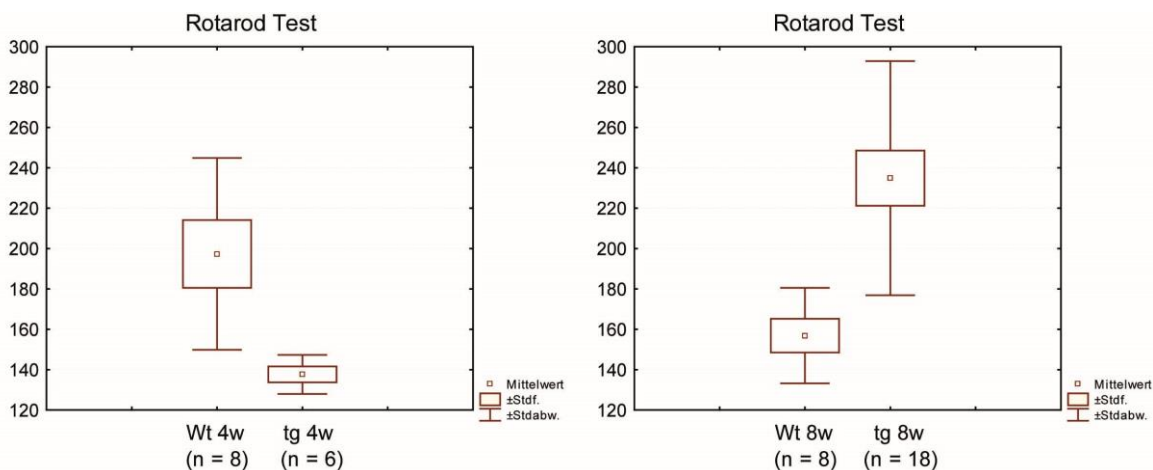
*Grid Test* von Wildtyp-Mäusen (Wt) und PMD-Mäusen (tg) mit einem Abstand der Gitterstäbe von 2cm im Alter von 4 Wochen (4w) links und 8 Wochen (8w) rechts (Y-Achse: Anzahl der Fehlritte). Die transgenen Tiere zeigten eine signifikant erhöhte Anzahl an Fehlritten in beiden Altersgruppen. Im Vergleich zum *Grid Test* mit 1cm Abstand wurde für die Durchführung des Tests deutlich mehr Zeit benötigt und die Standardabweichung war größer.

### 3.1.3 Rotarod Testverfahren

Beim *Rotarod Test* wurde die Zeit in Sekunden automatisch gemessen, bis die Tiere von der rotierenden Walze heruntergefallen oder gesprungen waren. Wildtypen schnitten im Alter von 4 Wochen signifikant besser ab ( $n = 8$ ;  $MW = 197,38s$ ;  $Stdf = 16,79s$ ;  $p < 0,011$ ) als die transgenen Tiere ( $n = 6$ ;  $MW = 137,67s$ ;  $Stdf = 3,94s$ ). Jedoch kehrte sich das Ergebnis im Alter von 8 Wochen um, so dass die Wildtyp-Mäuse kürzere Zeiten aufwiesen ( $n = 8$ ;  $MW = 156,88s$ ;  $Stdf = 8,36s$ ), während die PMD-Mäuse länger oben blieben ( $n = 18$ ;  $MW = 234,89s$ ;  $Stdf = 13,67s$ ) (Abb. 10). Dabei liefen die Wildtypen mühelos auf der Walze mit und sprangen vermutlich absichtlich herunter. Die PMD-Mäuse jedoch hörten auf zu laufen und klammerten sich an der Walze fest, sobald sich das Gerät schneller drehte, um dann schließlich herunterzufallen.



## Ergebnisse



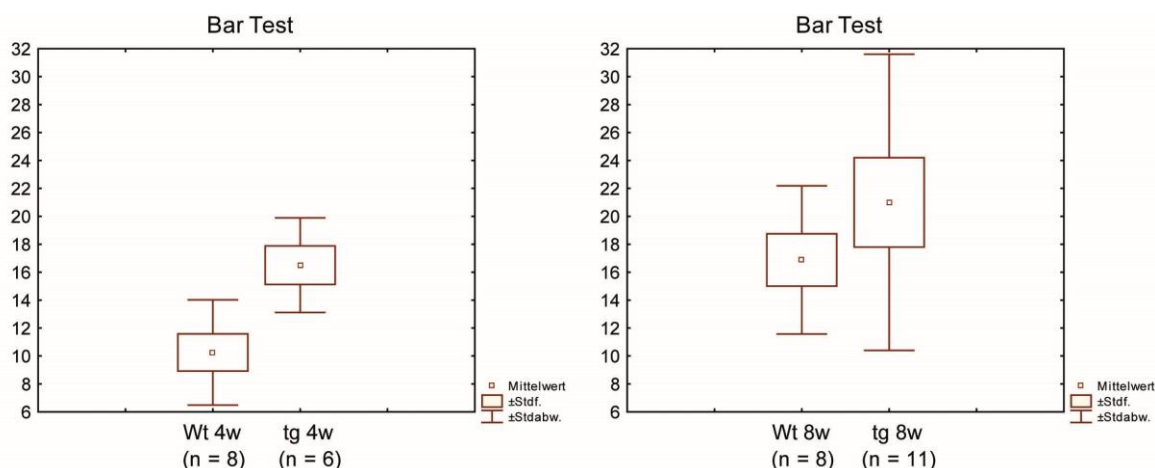
**Abb. 10: Rotarod Test**

*Rotarod Test* von Wildtyp-Mäusen (Wt) und transgenen PMD-Mäusen (tg) im Alter von 4 Wochen (4w) links und 8 Wochen (8w) rechts (Y-Achse: Zeit in Sekunden). Im Alter von 4 Wochen liefen die Wildtypen signifikant länger auf dem *Rotarod* als die PMD-Mäuse. Im Alter von 8 Wochen ergab sich ein paradoxes Ergebnis, da die Wildtyp-Kontrollen spontan vom *Rotarod* heruntersprangen und die PMD-Mäuse sich aufgrund der Bewegungsstörung am *Rotarod* festklammerten und erst später hinunterfielen.

### 3.1.4 Stangenhaltetest (*Bar Test*)

Beim *Bar Test* wurde die Zeit in Sekunden gemessen, die sich die Tiere auf einer Stange festhalten können, bis sie herunterfallen. Hier zeigte sich unerwarteter Weise, dass die Wildtypen (n = 8; MW = 10,25s; Stdf = 3,77s) im Alter von 4 Wochen sich signifikant kürzer ( $p < 0,008$ ) auf der Stange als die transgenen Tiere (n = 6; MW = 16,50s; Stdf = 3,94s) halten konnten. Die Wildtyp-Kontrollen zeigten hierbei deutlich mehr Aktivität, während die transgenen Tiere regungslos auf der Stange verharren, was eine mögliche Störvariable sein könnte. Im Alter von 8 Wochen gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen Wildtyp-Mäusen (n = 8; MW = 16,88s; Stdf = 5,30s) und den PMD-Mäusen (n = 11; MW = 21,00s; Stdf = 10,60s). Hierbei war die Standardabweichung bei PMD-Mäusen größer, obwohl mehr Tiere untersucht wurden (Abb. 11). Erneut bewegten sich die Wildtyp-Kontrollen deutlich mehr als die transgenen Tiere.

## Ergebnisse

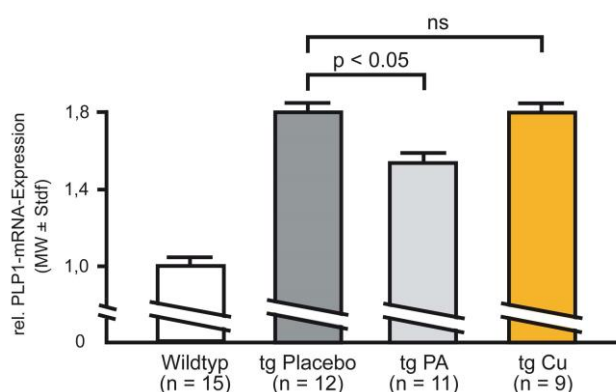


**Abb. 11: Stangentest (*Bar Test*)**

*Bar Test* von Wildtyp-Mäusen (Wt) und PMD-Mäusen (tg) im Alter von 4 Wochen (4w) links und 8 Wochen (8w) rechts (Y-Achse: Zeit in Sekunden). Trotz des motorischen Defizits blieben die PMD-Mäuse im Alter von 4 Wochen signifikant länger auf der Stange. Im Alter von 8 Wochen konnte die Beeinträchtigung der Motorik ebenfalls nicht durch den Stangentest abgebildet werden.

### 3.2 Analyse der *PLP1*-mRNA-Expression im Gesamthirn

Die Expression von *PLP1*-mRNA war im Vergleich zu den Wildtypmäusen (n = 15; MW = 1,00; Stdf = 0,043) bei den PMD-Mäusen (n = 12; MW = 1,78; Stdf = 0,05) um den Faktor 1,78 erhöht. Nach 10 Wochen Behandlung mit dem Progesteronantagonisten Lonaprisan war die mittels qRT-PCR gemessene *PLP1*-Expression im Gehirn um circa 15% reduziert (n = 11; MW = 1,57; Stdf = 0,05; p < 0,005), verglichen mit den Placebo Kontrollen (Abb. 12). Die Curcumingruppe zeigte im Vergleich zur Placebogruppe das gleiche Expressionsniveau (n = 9; MW = 1,80; Stdf = 0,06). Gemessen wurde die *PLP1*-Expression von Gesamthirn in Relation zum ubiquitär exprimierten, steroidunabhängigen *Exon1B* des *PMP22*- Gens.

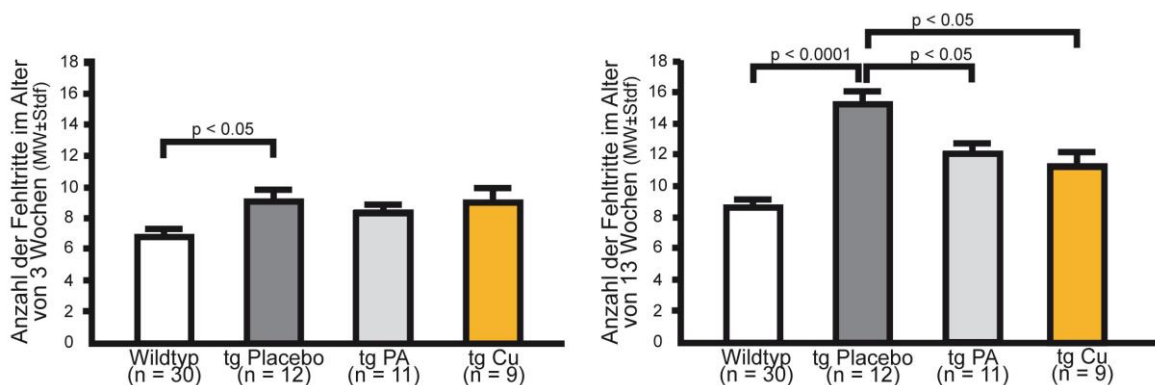


**Abb. 12: Relative *PLP1*-mRNA-Expression im Gesamthirn**

PMD-Mäuse (tg Placebo) exprimierten 1,78-fach *PLP1*-mRNA im Vergleich zu Wildtyp-Kontrollen. Der Progesteronantagonist (PA) Lonaprisan verringerte die toxische Überexpression von *PLP1*-mRNA um circa 15%. Curcumin (Cu) hatte keinen signifikanten Effekt auf die Transkription von *PLP1* (nicht signifikant: ns). (Y-Achse: *PLP1*-mRNA-Expression von Gesamthirn gemessen durch qRT-PCR im Verhältnis zum ubiquitär exprimierten steroidunabhängigen *Exon1B* des *PMP22*-Gens).

### 3.3 Positiver Effekt auf den Phänotyp durch Lonaprisan und Curcumin

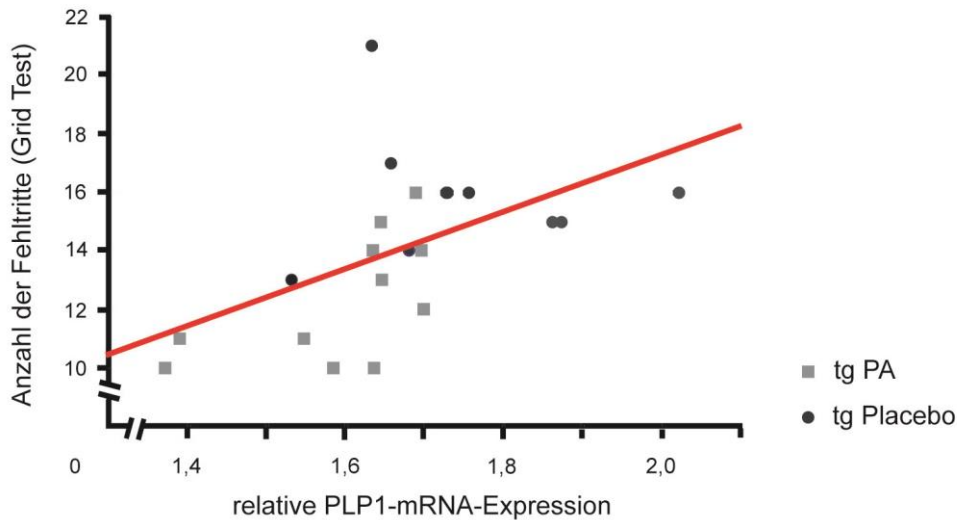
Die Störung der Bewegungskoordination (Ataxie) wurde mit dem *Gridtest* gemessen. Im Alter von 3 Wochen schnitten die Wildtypen ( $n = 30$ ; MW = 6,77; Stdf = 0,39;  $p < 0,05$ ) deutlich besser ab als die transgenen Tiere (Placebogruppe (tg Placebo):  $n = 12$ ; MW = 8,67; Stdf = 0,58;  $p < 0,05$  / Lonaprisangruppe (tg PA):  $n = 11$ ; MW = 8,36; Stdf = 0,53;  $p < 0,05$  / Curcumingruppe (tg Cu):  $n = 9$ ; MW = 9,11; Stdf = 0,90), während klinische Symptome bei den PMD-Mäusen nicht sichtbar waren (Abb. 13, vgl. Abb. 15). Am Ende der Therapiestudie, das Alter der Tiere betrug 13 Wochen, zeigten die mit Lonaprisan behandelten PMD-Mäuse eine signifikant bessere Motorikleistung ( $n = 11$ ; MW = 12,36; Stdf = 0,65;  $p < 0,01$ ) als die Placebo-gruppe ( $n = 12$ ; MW = 15,25; Stdf = 0,71). Auch die PMD-Mäuse, die mit Curcumin gefüttert wurden, waren signifikant besser ( $n = 9$ ; MW = 11,33; Stdf = 0,88;  $p < 0,01$ ) als die Kontroll-gruppe. Die Behandlungs-gruppen erreichten jedoch nicht Wildtypniveau ( $n = 30$ ; MW = 8,63; Stdf = 0,54). Die Ergebnisse des *Grid Tests* korrelierten in den Behandlungsgruppen Placebo und Lonaprisan mit der *PLP1*-mRNA-Expression im Gehirn ( $r^2 = 0,2676$ ;  $r = 0,5173$ ;  $p < 0,05$ ; Abb. 14), was einen direkten Gen-Dosis-Effekt auf den klinischen Phänotyp demonstrierte (Abb. 14).



**Abb. 13: Grid Test zu Beginn und am Ende der Studie**

Die Motorik der Wildtypmäuse war signifikant besser als die der transgenen Tiere, bereits zu Studienbeginn im Alter von 3 Wochen (links). Am Ende der Behandlung, im Alter von 13 Wochen (rechts), zeigten die Lonaprisan- (tg PA) und die Curcumingruppe (tg Cu) eine Verbesserung der Koordinationsstörung im Vergleich zu Placebo (tg Placebo), erreichten jedoch nicht Wildtypniveau.

## Ergebnisse



**Abb. 14: Gen-Dosis-Effekt auf den Phänotyp**

Hierzu wurden ausschließlich die Behandlungsgruppen Placebo (tg Placebo) und Lonaprisan (tg PA) herangezogen. Die Anzahl der Fehlritte gemessen im *Grid Test* (Y-Achse) am Ende der Studie im Alter von 13 Wochen korrelierte mit der *PLP1*-mRNA-Expression (x-Achse: *PLP1*-mRNA in Relation zu *Exon1B* des *PMP22*-Gens).

Darüber hinaus wurde eine klinische Bewertungsskala (*Clinical Score*) angewendet, um den therapeutischen Effekt der Behandlungen mit einem zweiten klinischen Test zu überprüfen (Abb. 15). Am Anfang der Studie konnten keine Unterschiede zwischen Wildtypen, Placebo- und Behandlungsgruppen festgestellt werden. Nach 10 Wochen Behandlung verbesserte Lonaprisan den Prozentsatz von *PLP1*-transgenen Mäusen mit einem Skalenwert 2 (ataktischer Gang) oder besser signifikant (tg PA = 90,91%; n = 11; MW = 2,18; Stdf = 0,18; p = 0,027) verglichen mit Placebo-Kontrollen (tg pl = 50% n = 12; MW = 2,5; Stdf = 0,15). Die Gabe von Curcumin verbesserte ebenfalls den Prozentsatz des *Clinical Score* signifikant (tg Cu = 88,89%; n = 9; MW = 2,0; Stdf = 0,17; P = 0,015). Wildtyp-Mäuse erreichten konstant einen Wert von 1 (WT = 100%; n = 30; MW = 1; Stdf = 0).

## Ergebnisse

Klinische Bewertungsskala:

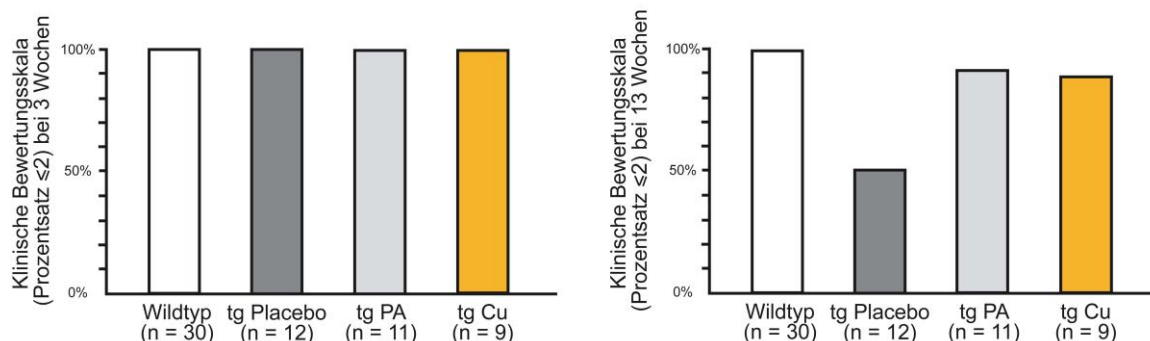
1 = Motorik unauffällig

2 = ataktischer Gang

3 = Tremor

4 = Krampfanfälle

5 = vorzeitiger Tod



**Abb. 15: Klinische Bewertungsskala am Anfang und am Endpunkt der Studie**

Anhand der oben genannten Kriterien wurden die Tiere untersucht. Am Anfang der Studie (links, Alter 3 Wochen) konnten keine Unterschiede festgestellt werden. Am Ende der Untersuchung (rechts, Alter 13 Wochen) zeigte sich der größte Unterschied zwischen den Skalenwerten 2 (ataktischer Gang) und 3 (Tremor). Die Lonaprisan- (tg PA) und Curcumingabe (tg Cu) erhöhten den Prozentsatz der Tiere mit einem Skalenwert von  $\leq 2$ , reduzierten folglich das Auftreten von Tremor.

### 3.4 Einfluss der Therapien auf das Körpergewicht

Bereits bei Beginn der Studie war das Gewicht der transgenen Mäuse gegenüber den Wildtypen (n = 30; MW = 11,14g Stdf = 1,09g;  $p < 0,005$ ) signifikant reduziert. Placebo-Kontrollen (n = 12; MW = 9,65g; Stdf = 0,88g), Lonaprisan- (n = 11; MW = 10,10g; Stdf = 1,62g) und Curcumin-Gruppe (n = 9; MW = 10,08g; Stdf = 1,28g) unterschieden sich am Anfang der Behandlung nicht (Abb. 16A, links).

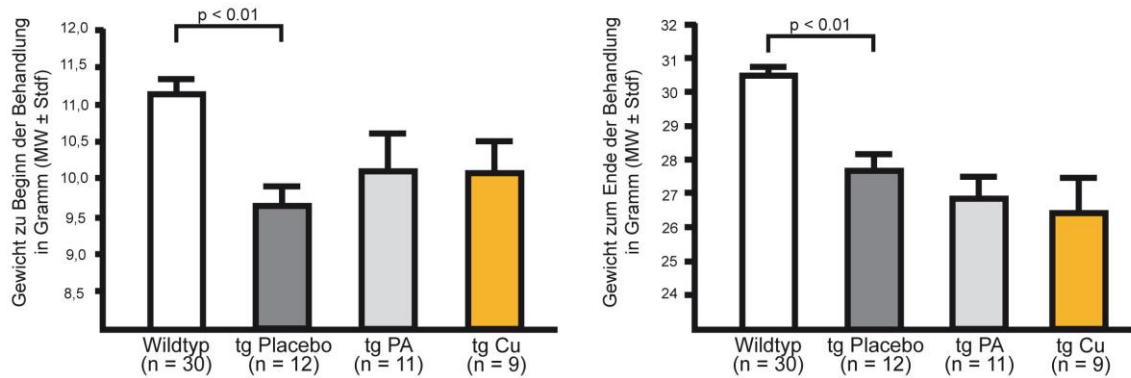
Am Ende der Behandlung waren die Wildtyp-Kontrollen weiterhin signifikant schwerer als die transgenen Tiere (n = 30; MW = 30,45g Stdf = 1,72g;  $p < 0,005$ ). Placebo Kontrollen (n = 12; MW = 27,65g; Stdf = 1,69g) unterschieden sich nicht von mit Lonaprisan behandelten Tieren (n = 11; MW = 26,84g; Stdf = 2,08g) und mit Curcumin behandelten PMD-Mäusen (n = 9; MW = 26,45g; Stdf = 3,03g) (Abb. 16A, rechts).

Mit Curcumin behandelte Mäuse hatten im Alter von 7 Wochen tendenziell im Durchschnitt ein geringeres Gewicht (n = 9; MW = 19,26g; Stdf = 1,93g) als Placebo-Kontrollen (n = 12; MW = 21,02g; Stdf = 2,64g) und mit Lonaprisan behandelte Tiere (n = 11; MW = 21,49g; Stdf = 2,24g), jedoch nicht signifikant (Cu vs pl:  $p > 0,11$  bzw Cu vs PA:  $p > 0,66$ ) (Abb. 16B). Einige Tiere in der Curcumin-Gruppe hatten ein niedrigeres Gewicht verglichen mit den anderen Mäusen innerhalb dieser Gruppe. Um einen Effekt des niedrigen Gewichts auf die Verbesserung des Phänotyps und den Verlauf der PMD auszuschließen, wurde die Leistung der mit Curcumin gefütterten Tiere beim *Grid Test* untersucht (Abb. 17). Die schwerere Hälfte der Tiere (über dem Mittelwert; n = 4; MW =

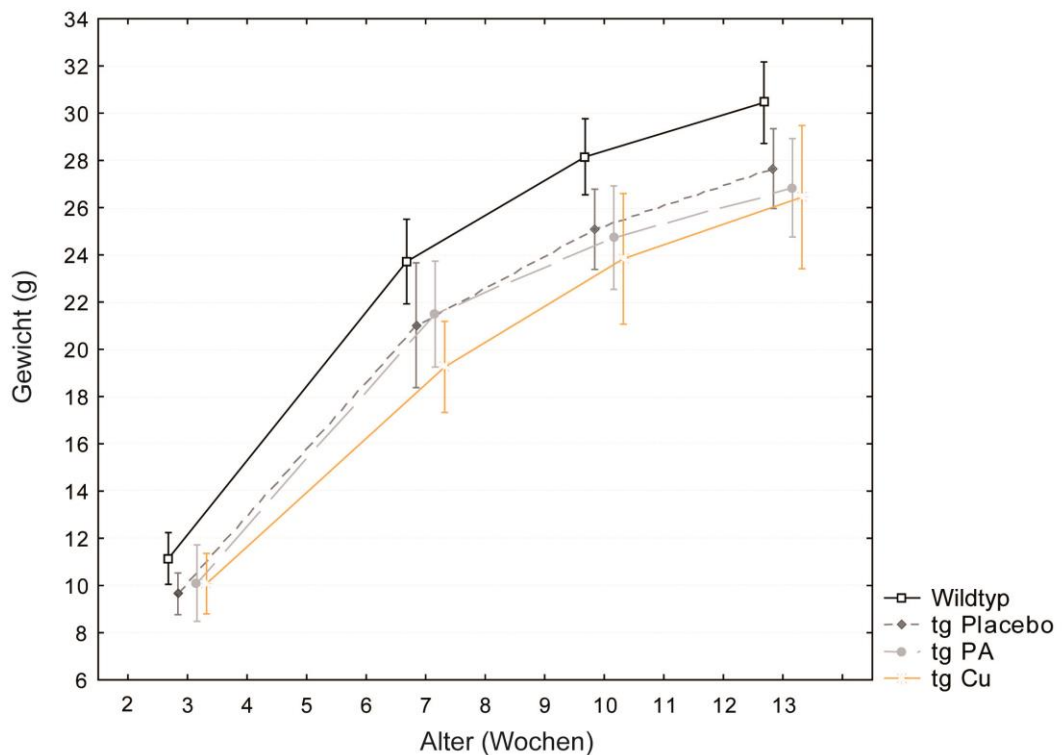
## Ergebnisse

7,5 Fehlritte; Stdf = 0,96 Fehlritte) wurde mit der leichteren Hälfte (unter dem Mittelwert; n = 5; MW = 9 Fehlritte; Stdf = 0,95 Fehlritte) verglichen. Hieraus ergab sich kein Unterschied der Motorikleistung ( $p = 0,31$ ).

A



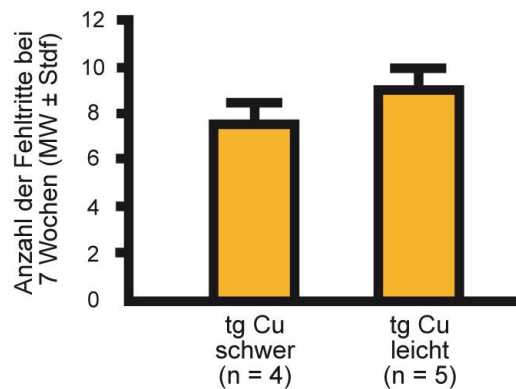
B



**Abb. 16: Körpergewichtsmessung im Verlauf**

(A) Gewichtsmessung in Gramm zum Anfang (links) und Ende (rechts) der Untersuchung zeigten bekannte, signifikante Unterschiede zwischen Wildtyp-Tieren und transgenen Mäusen. Mit Curcumin behandelte Tiere nehmen zunächst im Mittel weniger schnell zu als die Placebo-Gruppe, holen diesen nicht signifikanten Unterschied im Verlauf aber wieder auf (B).

## Ergebnisse



**Abb. 17: Auswirkungen des Gewichts auf die Motorik der mit Curcumin gefütterten Tiere**

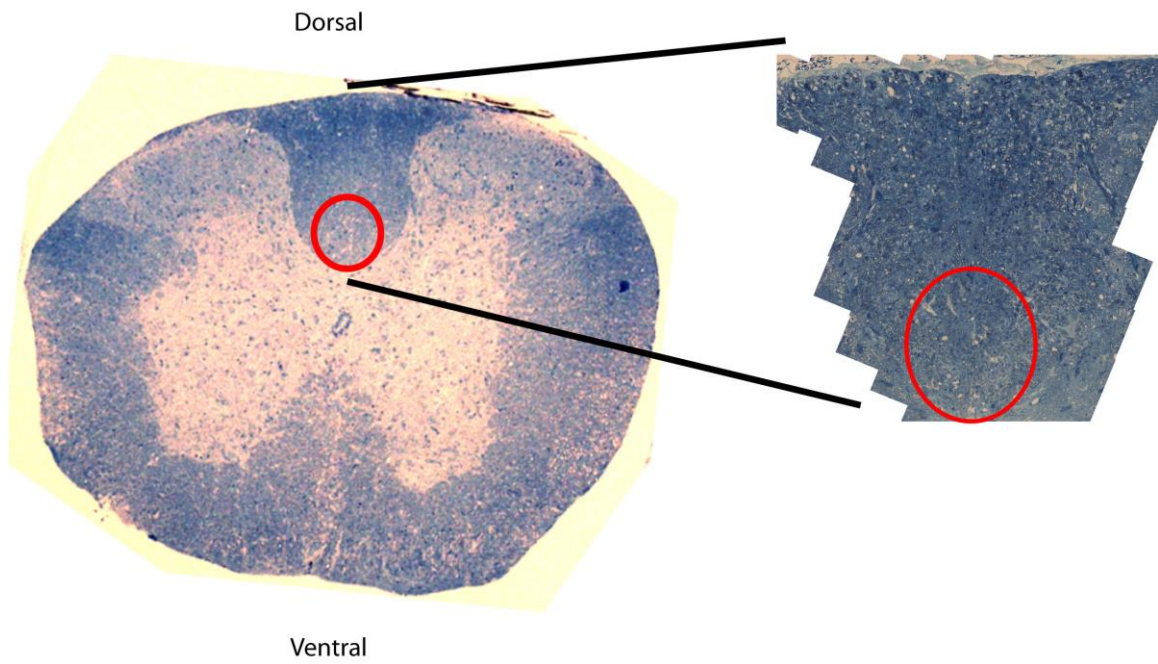
*Grid Test* im Alter von 7 Wochen. Um einen Effekt des niedrigen Gewichts auf die Verbesserung des Phänotyps und den Verlauf der PMD auszuschließen, wurde die Koordinationsfähigkeit, der mit Curcumin gefütterten Tiere beim *Grid Test* untersucht. Die schwerere Hälfte der Tiere (über dem Mittelwert, links; n = 4) wurde mit der leichteren Hälfte (rechts; n = 5) verglichen. Hieraus ergab sich kein Unterschied der Motorikordination ( $p = 0,31$ ).

### 3.5 Quantitative elektronenmikroskopische Analyse des *Tractus corticospinalis*

#### 3.5.1 Erhalt myelinisierter Axone durch Lonaprisan und Curcumin

Um den strukturellen Effekt der Behandlungen im ZNS-Gewebe zu evaluieren, wurde eine Region ausgewählt, die von der PMD stark beeinträchtigt wird. Der *Tractus corticospinalis* als eine klar begrenzte Region im zervikalen Rückenmark (Abb. 18) wurde für eine quantitative, elektronenmikroskopische Analyse untersucht. Vier elektronenmikroskopische Bilder mit einer Vergrößerung von 4400x (Abb. 19) wurden zufällig ausgewählt, um die myelinisierten Axone zu zählen (Abb. 20). Wildtyp-Mäuse (n = 3; MW = 1258,33; Stdf = 42,98) hatten durchschnittlich 1258 myelinisierte Axone pro Fläche. In der PMD-Situation (Placebo: n = 10; MW = 297,20; Stdf = 23,10) ist die Anzahl drastisch reduziert auf 297 ( $p < 0,0001$ ). Erstaunlicherweise konnten durch die Lonaprisanbehandlung circa 30% mehr myelinisierte Axone erhalten werden ( $p < 0,05$ ; n = 11; MW = 380,82; Stdf = 23,60). Durch die Gabe von Curcumin konnten sogar circa 37% myelinisierte Axone erhalten werden ( $p < 0,05$ ; n = 9; MW = 408,22; Stdf = 27,48).

## Ergebnisse

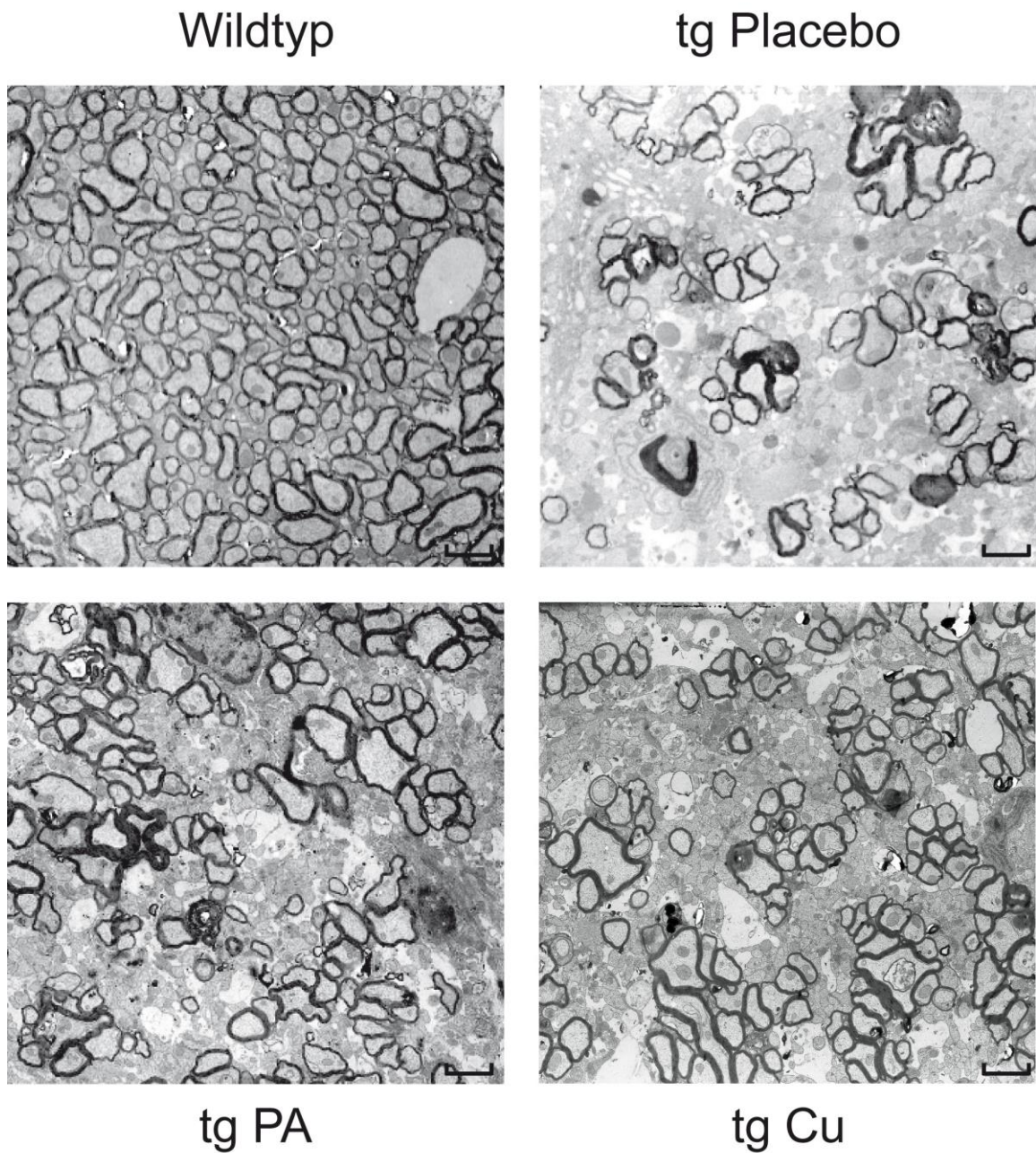


**Abb. 18: Lichtmikroskopische Darstellung des *Tractus corticospinalis***

Querschnitt durch das zervikale Rückenmark einer Maus (links, Vergrößerung 20x) und lichtmikroskopische Vergrößerung der Hinterstränge (Vergrößerung zunächst 160x, nachträglich zusammengesetzt mit Adobe Photoshop). Der *Tractus corticospinalis* ist rot gekennzeichnet. (Methylenblau-Azur-II-Färbung).



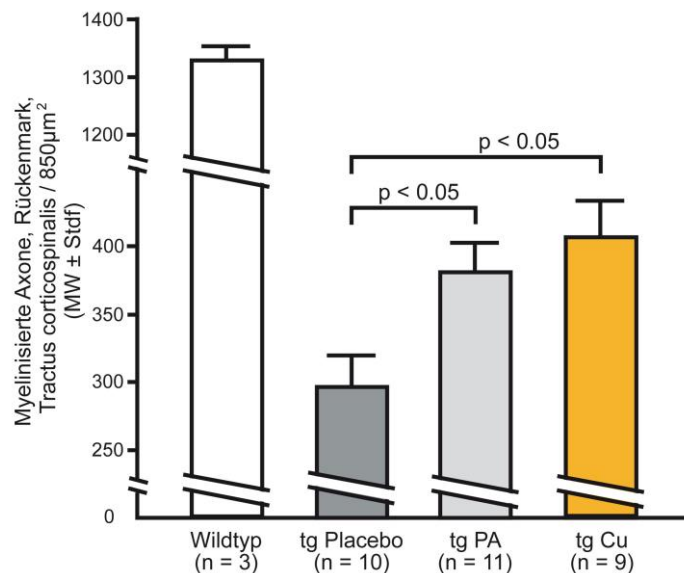
## Ergebnisse



**Abb. 19: Tractus corticospinalis bei elektronenmikroskopischer Vergrößerung von 4400x**

Beispielausschnitte elektronenmikroskopischer Bilder des zervikalen Rückenmarks mit einer Vergrößerung von 4400x (der Balken entspricht 1,7 $\mu$ m). Auffällig sind die dicht gepackten Axone in den Wildtyp-Tieren im Gegensatz zu den transgenen Mäusen. Durch die PMD gehen viele Axone zugrunde, sind demyelinisiert oder angeschwollen. Lonaprisan- und Curcumingabe verringerten den Verlust von myelinisierten Axonen.

## Ergebnisse



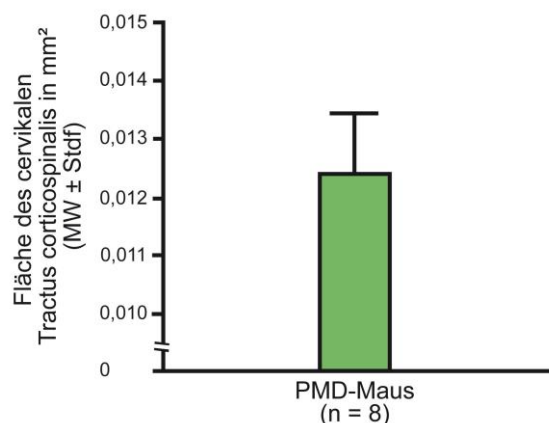
**Abb. 20: Quantifizierung der myelinisierten Axone im *Tractus corticospinalis***

Ausgewertet wurden jeweils vier zufällig ausgewählte, elektronenmikroskopische Bilder im *Tractus corticospinalis* des zervikalen Rückenmarks pro Tier bei einer Vergrößerung von 4400x. Die PMD verursacht einen massiven Verlust von myelinisierten Axonen. Lonaprisan und Curcumin können diesen Verlust reduzieren. (Y-Achse: Anzahl myelinisierter Axone/ 850µm<sup>2</sup>  $\pm$  4 elektronenmikroskopischen Bildern)

### 3.5.2 Berechnung der elektronenmikroskopisch untersuchten Fläche

Um eine Einschätzung der elektronenmikroskopisch analysierten Fläche im Verhältnis zum Gesamtquerschnitt des *Tractus corticospinalis* im zervikalen Rückenmark der PMD-Mäuse zu erlangen, wurde lichtmikroskopisch bei einer Vergrößerung von 160x die Gesamtfläche des *Tractus corticospinalis* bei PMD-Mäusen gemessen. Hierzu wurden die einzelnen Bilder mit der *Merge*-Funktion von Photoshop zusammengefügt und dann mit ImageJ vermessen. Es wurden 8 Tiere aus allen transgenen Gruppen verwendet (tg Placebo: n = 5; tg PA: n = 3; tg Cu: n = 1). Bei PMD-Mäusen betrug der Gesamtquerschnitt auf Höhe C7 durchschnittlich 0,012373mm<sup>2</sup> (Abb. 21) (n = 8; MW = 0,012373mm<sup>2</sup>; Stdf = 0,001101mm<sup>2</sup>). Elektronenmikroskopisch wurde eine Fläche von 850µm<sup>2</sup> analysiert, was somit circa 6,8% der Gesamtfläche entspricht.

## Ergebnisse



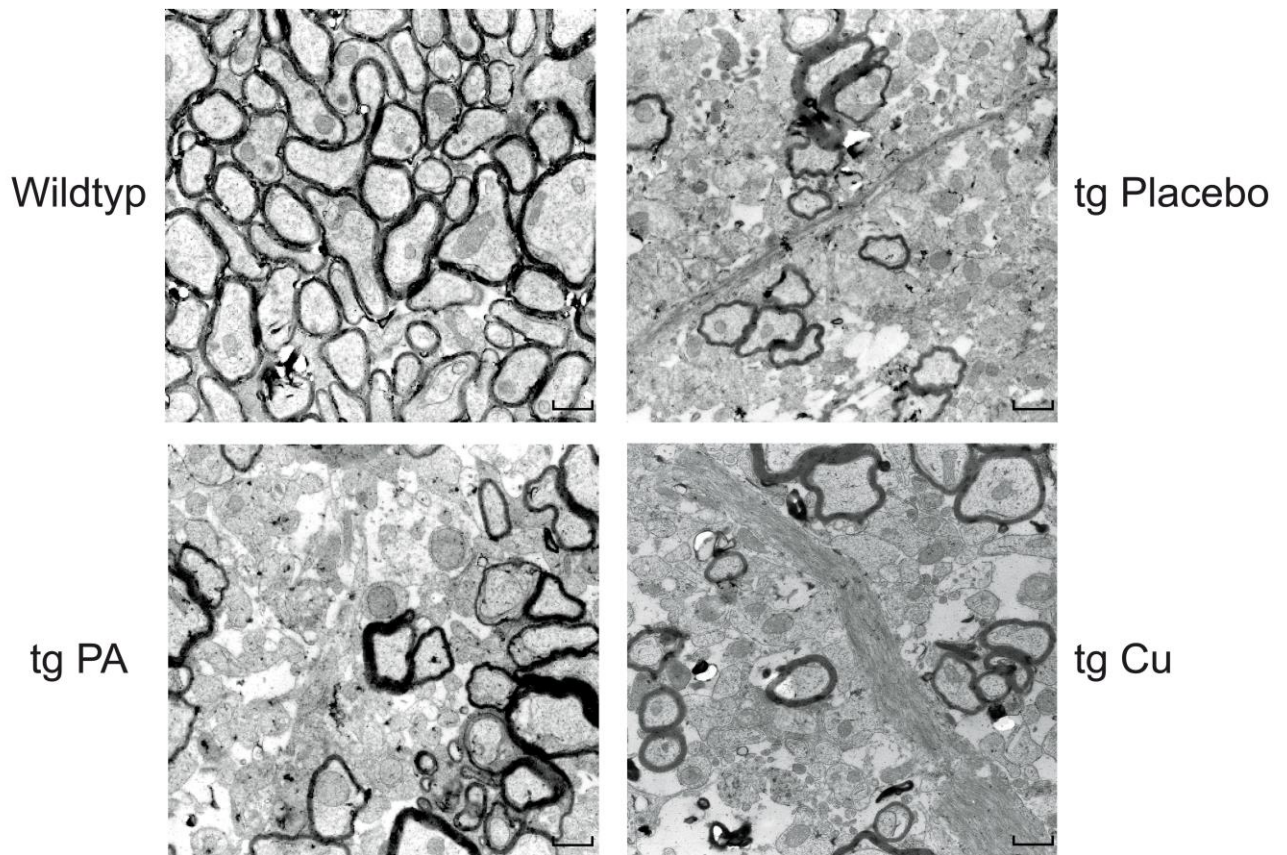
**Abb. 21: Messung der Gesamtfläche (in mm<sup>2</sup>) des *Tractus corticospinalis* des zervikalen Rückenmarks bei PMD-Mäusen**

Hierzu wurde das Rückenmark lichtmikroskopisch von 8 transgenen Tieren aus allen Gruppen analysiert (tg Placebo: n = 5; tg PA: n = 3; tg Cu: n = 1). Bei einer Vergrößerung von 160x wurden die Hinterstränge abfotografiert, mit Photoshop zusammengesetzt und mit ImageJ abgemessen.

### **3.5.3 Quantifizierung unmyelinisierter Axone im *Tractus corticospinalis***

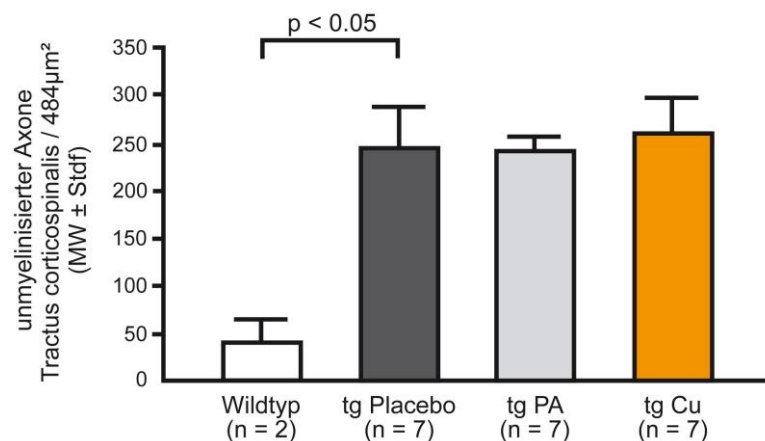
Die Anzahl der unmyelinisierten Axone war erhöht bei der PMD und wurde durch die Behandlungen nicht beeinflusst. Unmyelinisierte Axone wurden bei einer Vergrößerung von 12000x in 4 zufällig ausgewählten, elektronenmikroskopischen Bildern des *Tractus corticospinalis* des zervikalen Rückenmarks gezählt, was einer Fläche von 484µm<sup>2</sup> entspricht (Abb. 22). Wildtyp-Mäuse (n = 3) zeigten 42 unmyelinisierte Axone (Stdf = 26,5). Diese Zahl war bei den PMD Tieren deutlich erhöht ( $p < 0,05$ ). Placebo (n = 7) wiesen 246 unmyelinisierte Axone pro Fläche (Stdf = 43,5) auf. Die Gabe von Lonaprisan (n = 7; 246 unmyelinisierte Axone; Stdf = 15,48) und Curcumin (n = 7; 261 unmyelinisierte Axone; Stdf = 37,18) hatten keinen Effekt auf die Anzahl der unmyelinisierten Axone (Abb. 23).

## Ergebnisse



**Abb. 22: *Tractus corticospinalis* bei elektronenmikroskopischer Vergrößerung von 12000x**

Beispielausschnitte elektronenmikroskopischer Bilder mit einer Vergrößerung von 12000x (der Balken entspricht  $0,7\mu\text{m}$ ) des zervikalen Rückenmarks. Bei den Wildtyp-Tieren sind kaum unmyelinisierte Axone vorhanden. Auffallend ist der ausgeprägte Zelluntergang, die Dysmyelinisierung und reaktive Gliose bei den transgenen Tieren (tg).



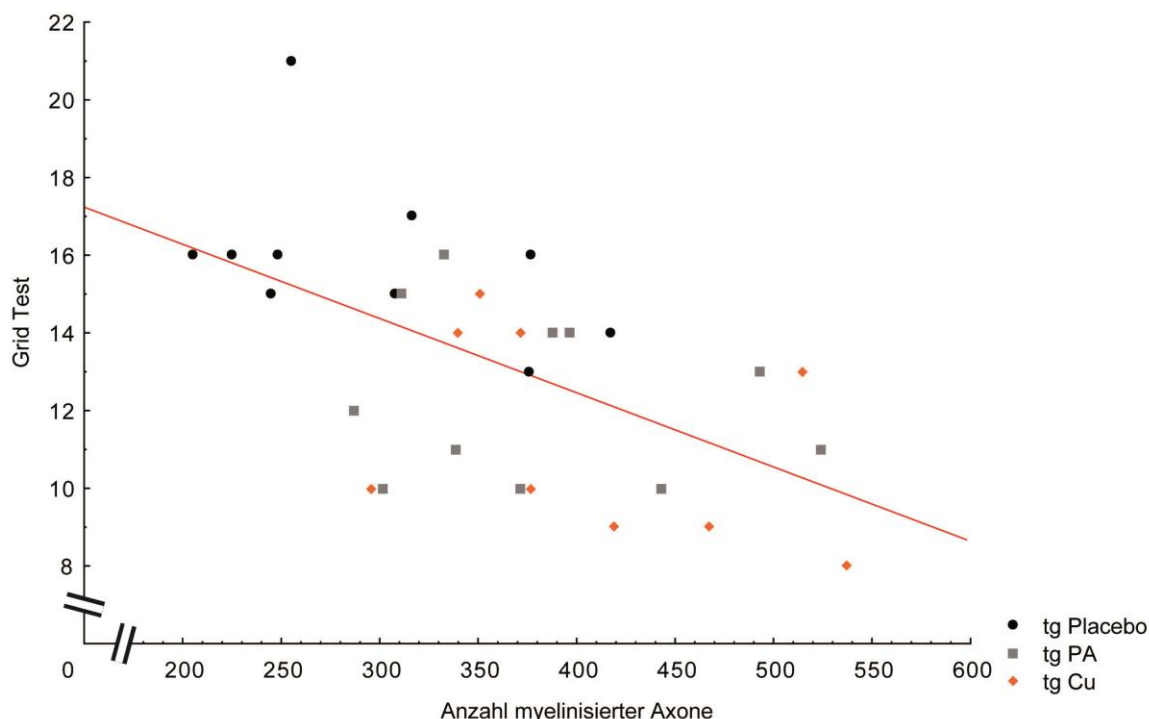
**Abb. 23: Quantifizierung unmyelinisierter Axone im *Tractus corticospinalis***

Quantifizierung der Anzahl unmyelinisierter Axone im *Tractus corticospinalis* des zervikalen Rückenmarks in vier elektronenmikroskopischen Bildern bei einer Vergrößerung von 12000x (Y-Achse: Anzahl unmyelinisierter Axone/  $484\mu\text{m}^2 \cong 4$  elektronenmikroskopischen Bildern). Bei den Wildtyp-Mäusen war der Anteil an unmyelinisierten Axonen sehr gering. Die transgenen Tiere (tg) hatten einen erhöhten Anteil an unmyelinisierten Axonen. Die Therapien beeinflussten die Anzahl unmyelinisierter Axone nicht.

## Ergebnisse

### 3.5.4 Korrelation der Anzahl myelinisierter Axone mit dem Phänotyp

Die Anzahl myelinisierter Axone im *Tractus corticospinalis* korrelierte negativ mit der Anzahl der Fehlritte im *Grid Test* ( $r^2 = 0,3207$ ;  $r = -0,5663$ ,  $p < 0,05$ ) (Abb. 24). Je mehr myelinisierte Axone erhalten blieben, um so besser war die Koordinationsfähigkeit der PMD-Mäuse. Somit ist es wahrscheinlich, dass die motorischen Defizite unter anderem auf der Schädigung des *Tractus corticospinalis* des Rückenmarks beruhen und für die histologische Auswertung eine klinisch relevante Region des ZNS herangezogen wurde.



**Abb. 24: Korrelation von Phänotyp und Axonanzahl im *Tractus corticospinalis***

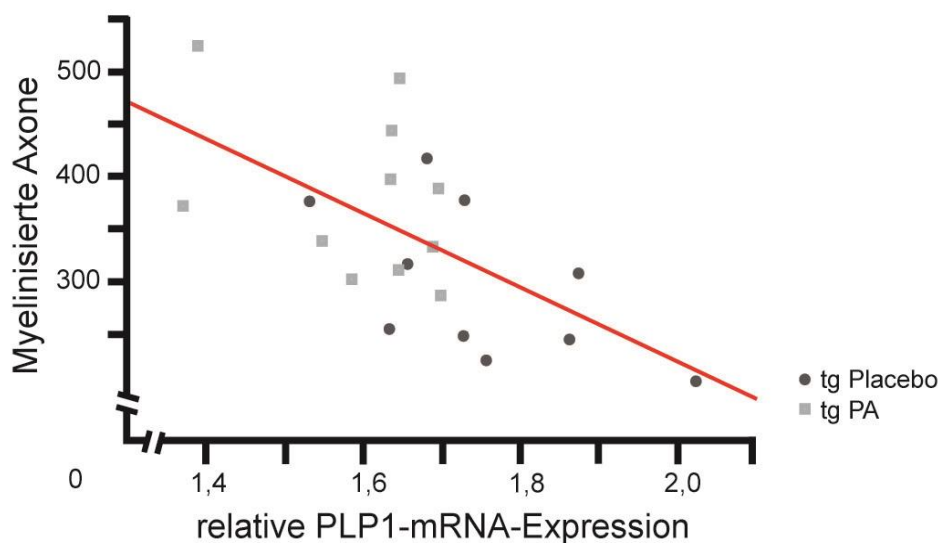
Je mehr myelinisierte Axone im *Tractus corticospinalis* erhalten blieben, desto besser war die Leistung der PMD-Mäuse im *Grid Test*. Die elektronenmikroskopische Quantifizierung spiegelte die Koordinationsfähigkeit wider. (X-Achse: Anzahl myelinisierter Axone im *Tractus corticospinalis*, des zervikalen Rückenmarkes; Y-Achse: Anzahl der Fehlritte auf 2m Distanz im *Grid Test*.)

### 3.5.5 Korrelation von *PLP1*-mRNA-Expression mit der Anzahl myelinisierter Axone

In den Gruppen Placebo und Lonaprisan korrelierte die Anzahl myelinisierter Axone direkt mit dem *PLP1*-Expressionsniveau ( $r^2 = 0,3693$ ;  $r = -0,6077$ ;  $p < 0,005$ ). Mit steigender *PLP1*-Expression kam es zum Axonverlust. Wie in der Phänotypanalyse (Abb. 14) ist die Schwere der PMD Erkrankung in unserem Tiermodell eine Funktion des *PLP1*-Expressionsniveaus (Abb. 25). Bei der Curcumingruppe konnte keine Korrelation der Axonanzahl mit dem Expressionsniveau festgestellt werden ( $n = 9$ ;  $r^2 = 0,0195$ ;  $r = -0,1396$ ,  $p = 0,72012$ ) (Abb. 26). Dies deutet auf einen von der Transkription von *PLP1* unabhängigen, protektiven Mechanismus hin. Gemessen wurde

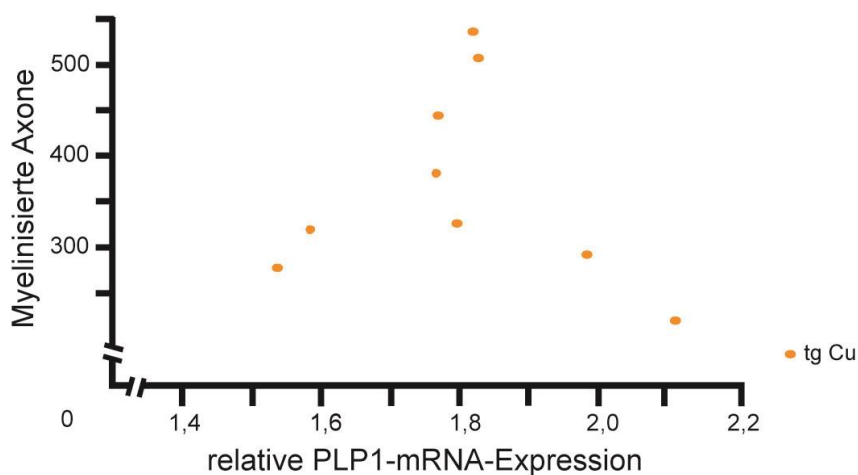
## Ergebnisse

die *PLP1*-Expression von Gesamthirn im Vergleich zum ubiquitär exprimierten, steroidunabhängigen *Exon1B* des *PMP22*-Gens.



**Abb. 25: Korrelation der myelinisierten Axone mit der *PLP1*-mRNA-Expression**

Mit steigender *PLP1*-mRNA-Expression kam es zum Axonverlust. Dargestellt wurden ausschließlich die Gruppen Placebo und Lonaprisan. X-Achse: relative *PLP1*-mRNA-Expression im Gehirn (in Bezug auf *Exon1B* des *PMP22*-Gens); Y-Achse: Anzahl myelinisierter Axone im *Tractus corticospinalis* des Rückenmarks.



**Abb. 26: Keine Korrelation myelinisierter Axone mit der *PLP1*-mRNA-Expression in der Curcumingruppe**

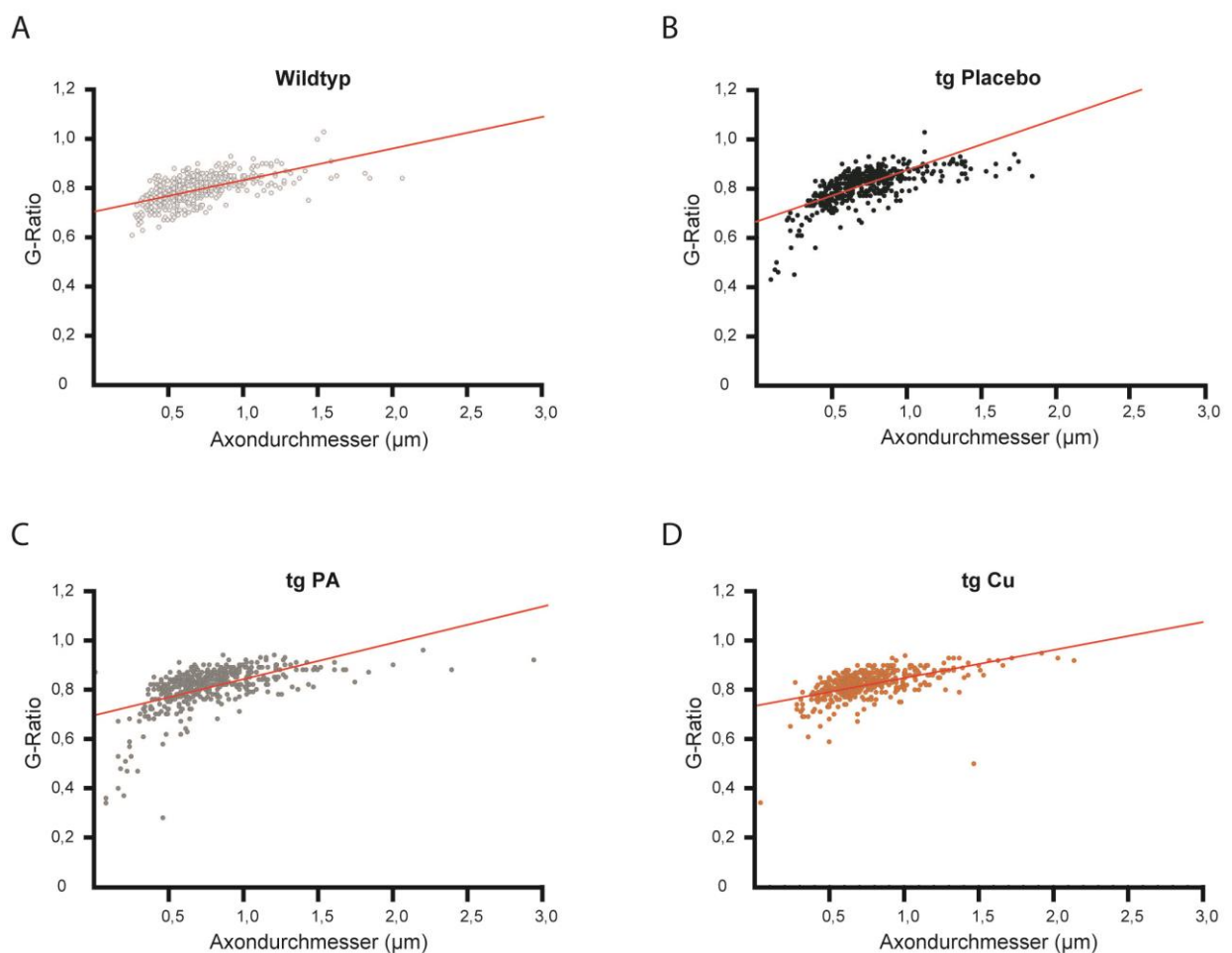
In der Curcumingruppe wurde keine Korrelation der *PLP1*-mRNA-Expression mit der Axonanzahl im *Tractus corticospinalis* festgestellt. Dies deutet auf einen von der *PLP1*-mRNA-Expression unabhängigen, protektiven Mechanismus hin.

### 3.5.6 Untersuchung der Myelinbeschaffenheit

G-Ratio Analysen der myelinisierten Axone im *Tractus corticospinalis* im zervikalen Rückenmark

## Ergebnisse

zeigten keine Auswirkungen von Lonaprisan oder Curcumin auf die Myelindicke. Die G-Ratio der Wildtyp-Tiere wurde bei 0,79 ermittelt ( $n = 3$ ; MW = 9,79; Stdf = 0,003). Die Myelindicken der transgenen Mäuse unterlagen wegen hypo- und hypermyelinisierten Axonen stärkeren Schwankungen. Die durchschnittliche Myelindicke von Placebo Kontrollen betrug 0,80 ( $n = 4$ ; MW = 0,80; Stdf = 0,03), während mit Lonaprisan behandelte Tiere eine G-Ratio von 0,81 ( $n = 4$ ; MW = 0,81; Stdf = 0,01;  $p = 0,60$ ) hatten. Die G-Ratio der Curcumingruppe betrug 0,81 ( $n = 5$ ; MW = 0,81; Stdf = 0,005;  $p = 0,6$ ) (Abb. 27). Vermessen wurden alle myelinisierten Axone von 3 zufällig ausgewählten Bildern pro Tier im *Tractus corticospinalis* des Rückenmarkes in der Vergrößerung von 12000x.



**Abb. 27: Messung der G-Ratio im *Tractus corticospinalis***

Transgene Mäuse (B) zeigten aufgrund von Hypo- und Hypermyelinisierung eine breitere Streuung der Myelindicke als Wildtypmäuse (A) auf. Die Behandlungen (C) und (D) hatten keinen Einfluss auf die G-Ratio im *Tractus corticospinalis* des zervikalen Rückenmarks.

### 3.6 Quantitative immunhistochemische Untersuchung des *Tractus corticospinalis*

Zur näheren Untersuchung des oben beschriebenen Zelluntergangs wurden weitere bekannte

## Ergebnisse

Charakteristika der PMD i.e. Inflammation, Astrogliose und Oligodendrozytenanzahl lichtmikroskopisch analysiert. Immunhistochemische Färbungen des *Tractus corticospinalis* des zervikalen Rückenmarks wurden mit den Antikörpern Mac-3 Antigen (Mac3) für Mikroglia, saures Gliafaserprotein (GFAP) für Astrozyten, *Cluster of Differentiation 3* (CD3) für Lymphozyten und *Oligodendrocyte transcription factor 2* (Olig2) für Oligodendrozyten durchgeführt. Die Quantifizierung stellt positive Zellen pro Fläche (30.000µm<sup>2</sup>) dar:

Mac3 wird von mononukleären Phagozyten exprimiert und entspricht am ehesten dem lysosomal assoziierten Membranprotein 2 (CD107b). Wildtyp-Kontrollen (n = 3) zeigten erwartungsgemäß nur wenige Mikroglia im *Tractus cortico-spinalis* (n = 3; MW = 5; Stdf = 1,2). In Placebo behandelten PMD-Mäusen (n = 6), wurden 91,8 Mac3 positive Zellen detektiert (Stdf = 15,2; p < 0,01). Die Behandlung mit Lonaprisan führte zu einer Reduktion auf 31 Mac3 positive Zellen pro Fläche (n = 6). Dies war signifikant (p < 0,01) mehr als in den Wildtyp-Kontrollen, aber auch signifikant (p < 0,01) weniger als in den mit Placebo behandelten PMD-Mäusen. Die Curcumingruppe (n = 7) zeigte mit 33,6 Mac3 positiven Zellen signifikant (p < 0,01) weniger als die Placebo-Kontrollen und signifikant (p < 0,01) mehr als die Wildtyp-Kontrollen (Abb. 28).

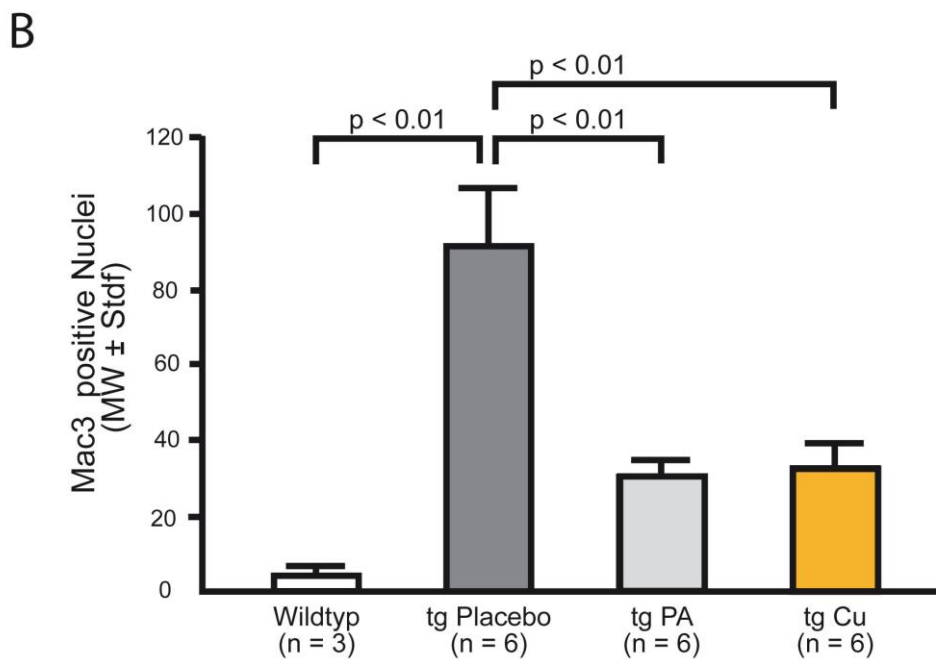
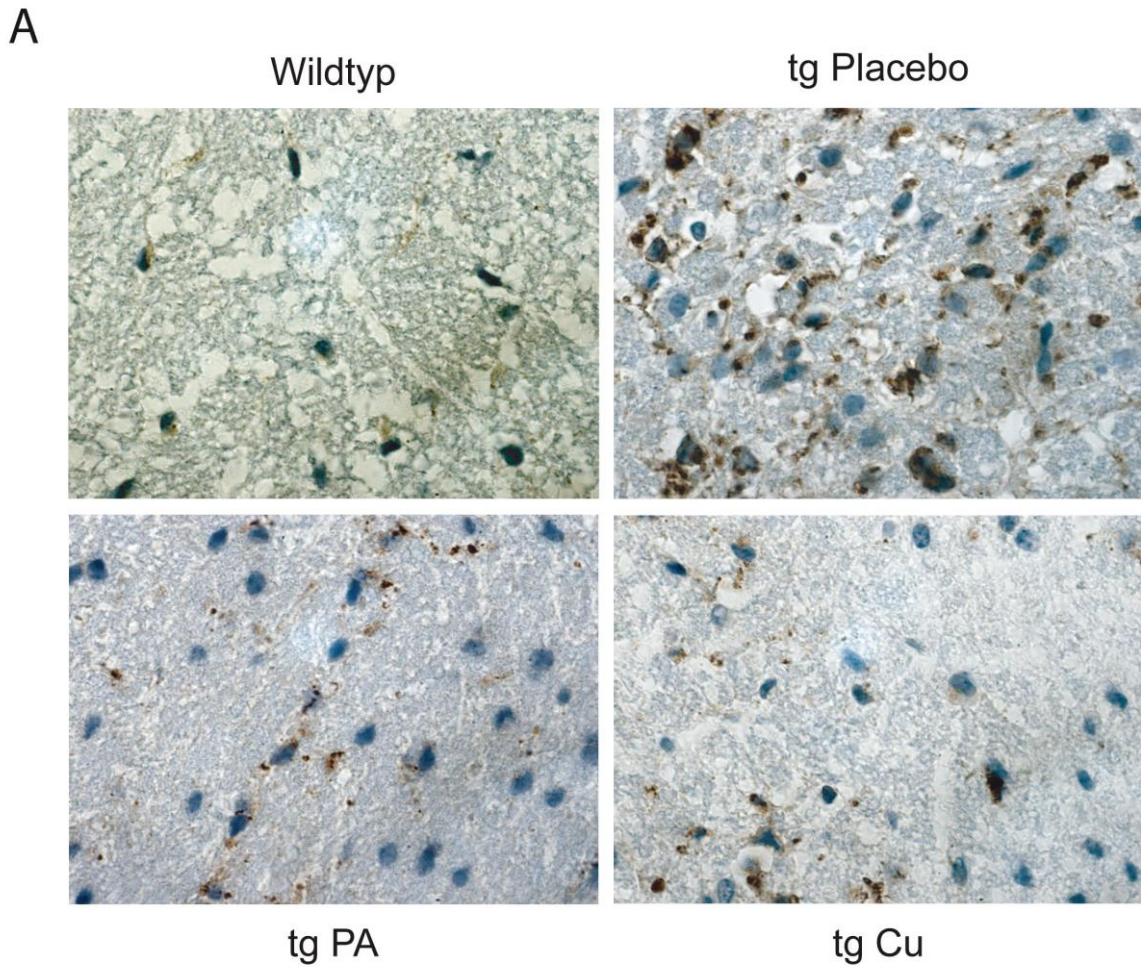
Die Astrozytenanzahl war im Rückenmark Placebo behandelter Tiere signifikant erhöht (n = 6; MW = 11; Stdf = 1,1; p < 0,05) im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollen (n = 3; MW = 5; Stdf = 1,5). Mit Lonaprisan behandelte Tiere zeigten signifikant (p < 0,05) weniger GFAP positive Zellen (n = 6; MW = 7,5; Stdf = 0,8) als Placebo behandelte PMD-Mäuse, wobei ein signifikanter Unterschied zu Wildtyp-Mäusen nicht bestand (p = 0,14). Auch Curcumin konnte das Auftreten von GFAP positiven Zellen signifikant senken (n = 6; MW = 7,05; Stdf = 0,6; p < 0,05) (Abb. 29).

Mit CD3 Antikörpern konnten bei Wildtyp-Tieren im *Tractus corticospinalis* keine Zellen angefärbt werden (n = 3; MW = 0). Bei Placebo-Kontrollen zeigten sich 3,2 positive Lymphozyten (n = 6; Stdf = 0,78; p < 0,05). Nach 10 Wochen der Lonaprisanbehandlung wurden signifikant (p < 0,01) weniger positive Zellen (n = 6; MW = 0,67; Stdf = 0,47) detektiert. Die Curcumingruppe zeigte ebenfalls einen signifikanten (p < 0,01) Rückgang mit 0,6 CD3 positiven Lymphozyten (n = 7; Stdf = 0,23) (Abb. 30).

Die Dichte der Oligodendrozyten war um mehr als 50% reduziert bei den PMD-Mäusen, wie die Zählung der Olig-2-positiven Zellen ergab (tg Placebo: n = 6; MW = 7; Stdf = 0,7; p < 0,001). Lonaprisangabe reduzierte den Verlust von Oligodendrozyten signifikant, ohne jedoch Wildtyp-Niveau zu erreichen (tg PA: n = 6; MW = 11; Stdf = 1,4; p < 0,05) (Abb. 31). Das Füttern mit Curcumin (n = 6; MW = 13; Stdf = 1,5; p < 0,01) jedoch führte zur vollständigen Erholung bis auf die Oligodendrozytenanzahl der Wildtyp-Mäuse (n = 3; MW = 16; Stdf = 0,9; p < 0,001).



## Ergebnisse

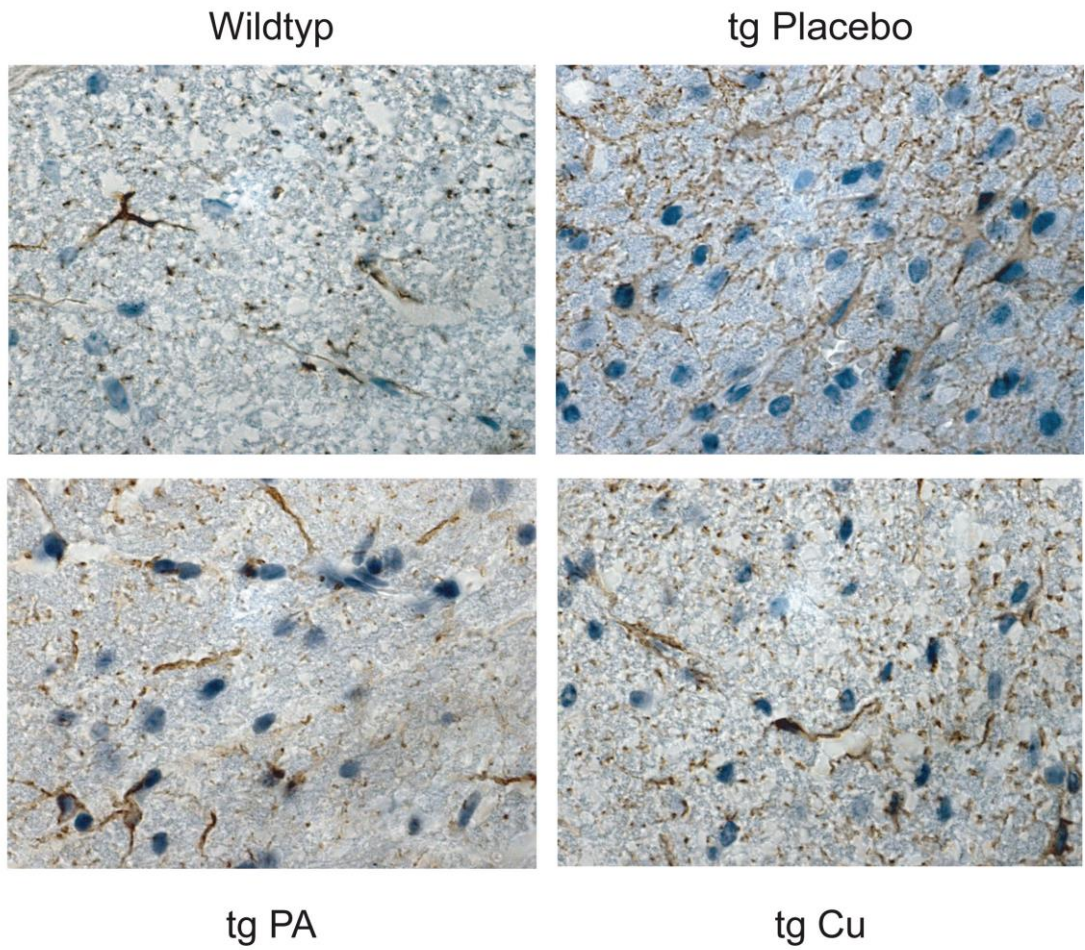


**Abb. 28: MAC3 positive Zellen pro 30.000 $\mu$ m<sup>2</sup>**

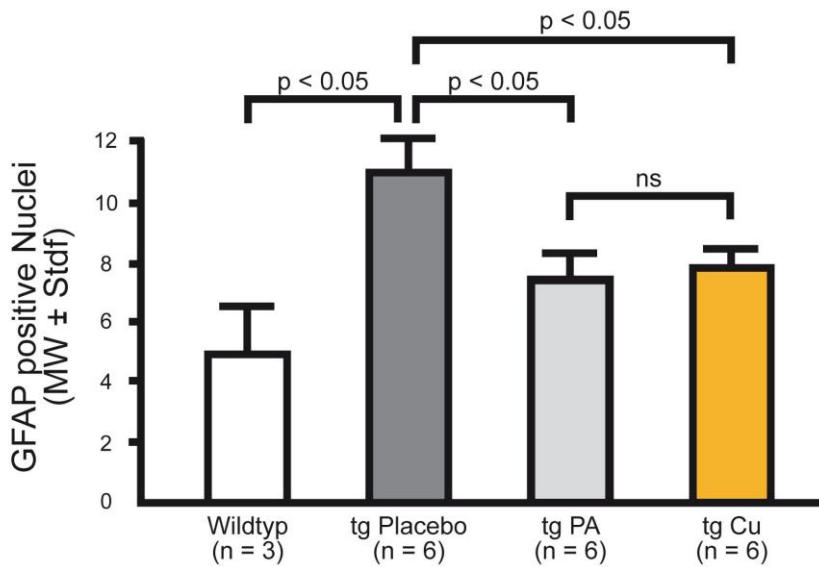
Repräsentative Ausschnitte des *Tractus corticospinalis* des zervikalen Rückenmarks (A). PMD-Mäuse demonstrierten einen deutlich erhöhten Anteil an Mikroglia (B). Dieser wurde durch Lonaprisan und Curcumin deutlich reduziert, erreichte jedoch nicht Wildtypniveau.

# Ergebnisse

## A



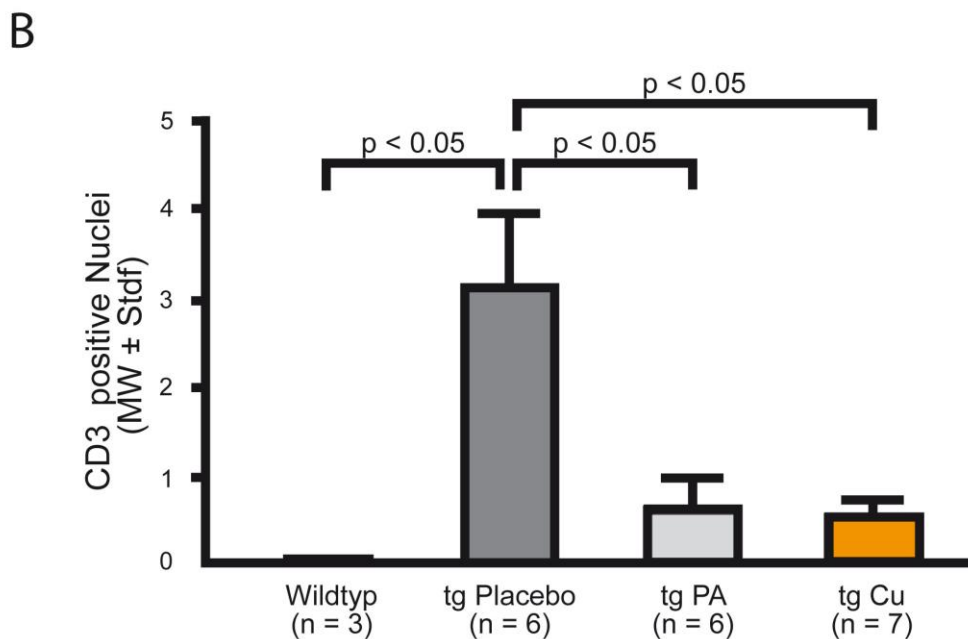
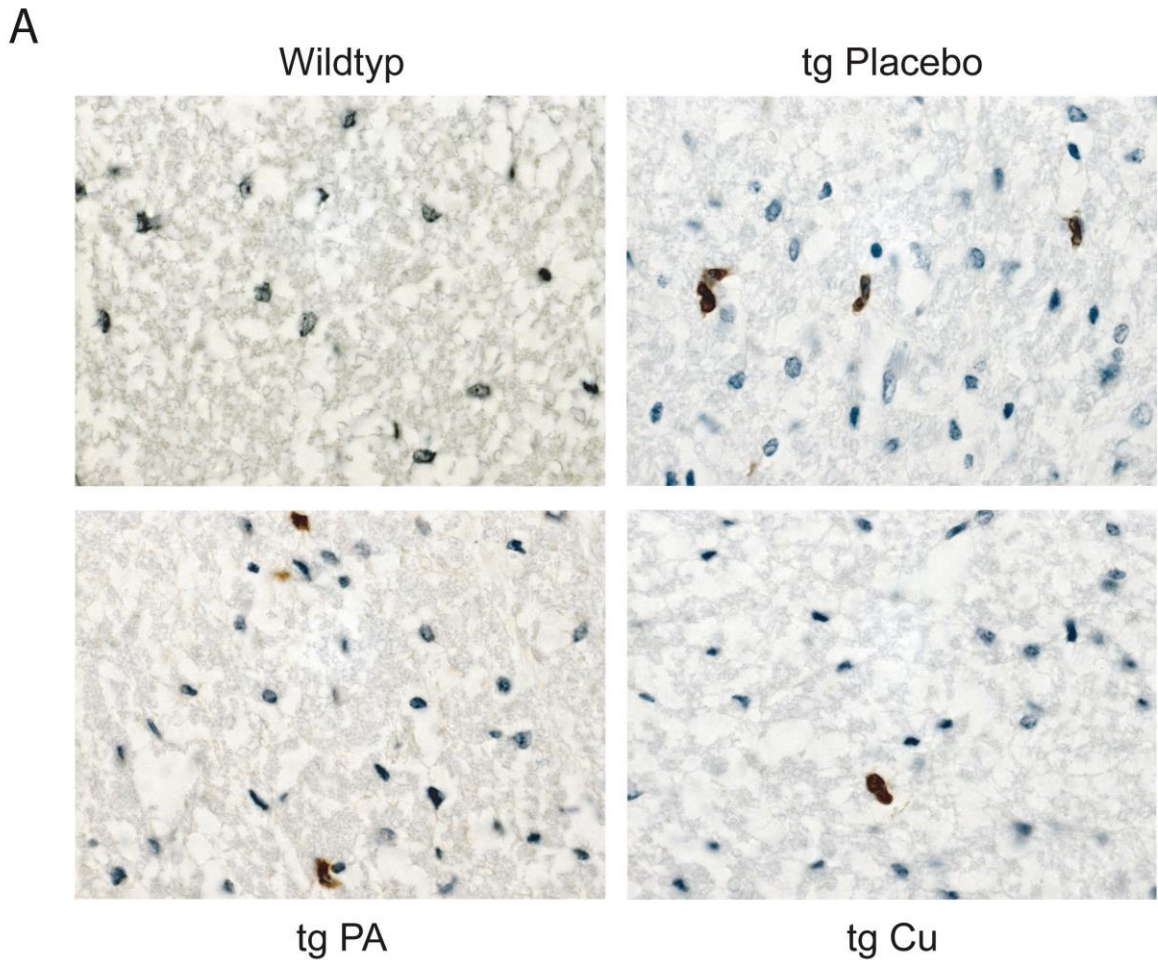
## B



**Abb. 29: GFAP positive Zellen pro 30.000μm<sup>2</sup>**

Repräsentative Ausschnitte des *Tractus corticospinalis* des zervikalen Rückenmarks (A). PMD-Mäuse hatten einen signifikant erhöhten Anteil an Astrozyten (B). Dieser wurde durch Lonaprisan und Curcumin signifikant gesenkt.

## Ergebnisse

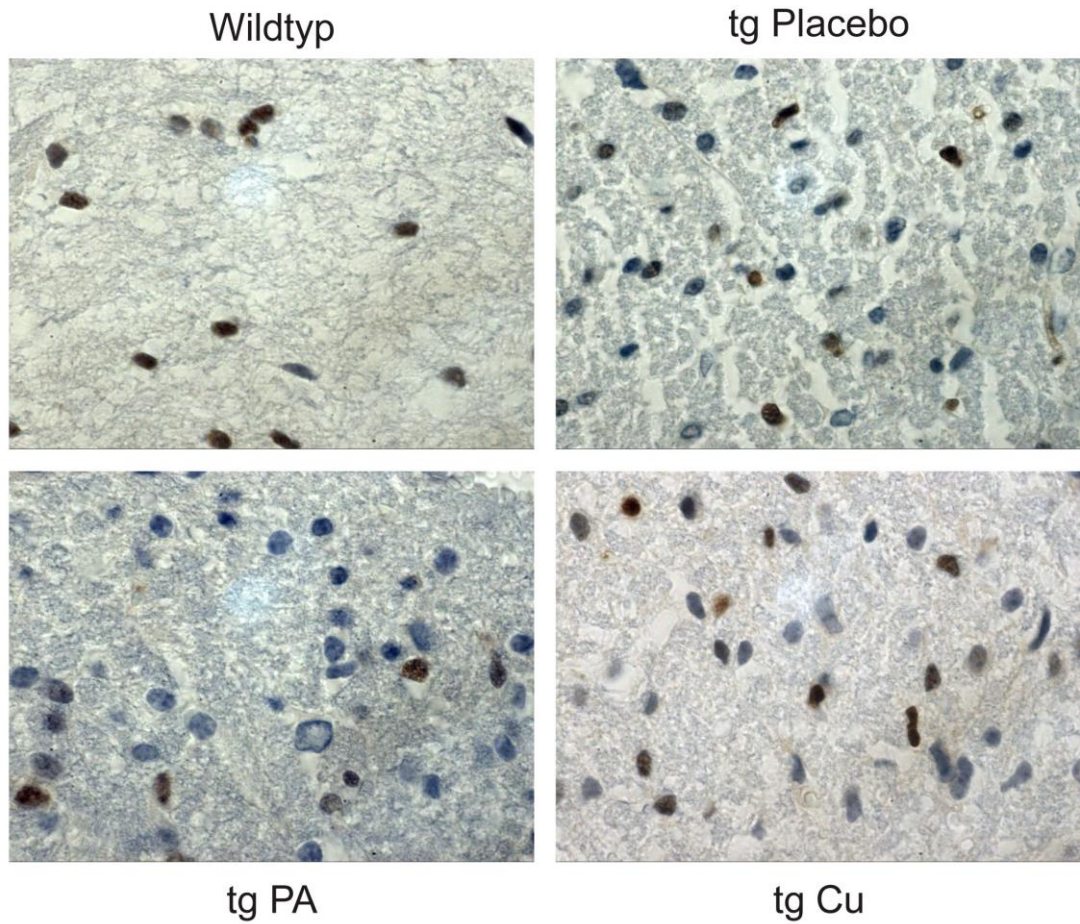


**Abb. 30: CD3 positive Zellen pro 30.000 $\mu$ m<sup>2</sup>**

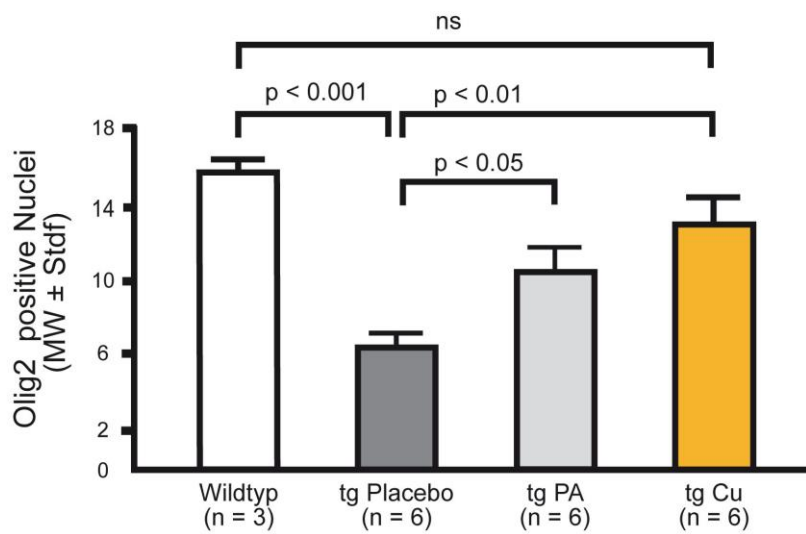
Repräsentative Ausschnitte des *Tractus corticospinalis* des zervikalen Rückenmarks (A). Bei den Wildtyp-Tieren wurden keine Lymphozyten im ZNS vorgefunden. PMD-Mäuse zeigten hingegen eine Lymphozyteninfiltration (B). Diese wurde durch Lonaprisan und Curcumin deutlich reduziert, erreichte jedoch nicht Wildtypniveau.

# Ergebnisse

A



B

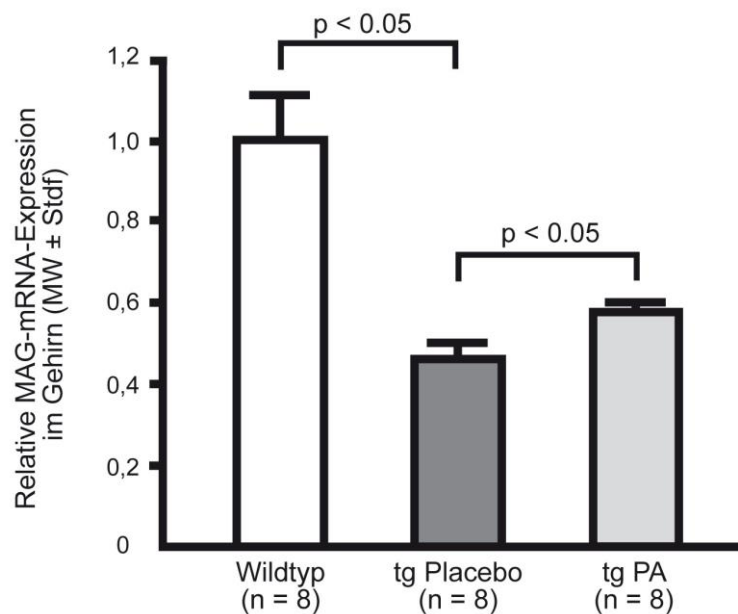


**Abb. 31: Olig2 positive Zellen pro 30.000μm<sup>2</sup>**

Repräsentative Ausschnitte des *Tractus corticospinalis* des zervikalen Rückenmarks (A). PMD-Mäuse wiesen eine deutlich reduzierte Anzahl an Oligodendrozyten (B) auf. Diese erhöhte sich durch Lonaprisan signifikant. Unter Curcumineinfluss erreichte die Oligodendrozytenanzahl sogar Wildtypniveau.

## 3.7 Analyse der mRNA-Expression weiterer Myelinproteine

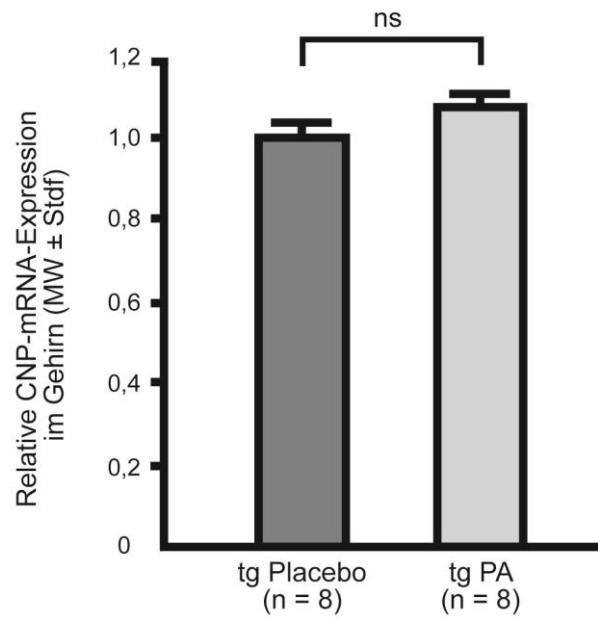
Die mRNA-Expression von *MAG* war bei PMD-Mäusen (n = 8; MW = 0,463; Stdf = 0,03; p < 0.01) um 53% reduziert im Vergleich zu den Wildtypen (n = 8; MW = 1,00; Stdf = 0,11; p < 0.01). Lonaprisan verringerte diese Reduktion der Transkription von *MAG* signifikant (n = 8; MW = 0,58; Stdf = 0,02; p < 0,05), so dass im Verhältnis zu Placebo 24% mehr *MAG*-mRNA exprimiert wurde (Abb. 32). Gemessen wurde die *MAG*-Expression von Gesamthirn im Vergleich zum ubiquitär exprimierten, steroidunabhängigen Exon1B des *PMP22*- Gens. Einen Einfluss von Lonaprisan auf die mRNA-Expression von *CNP*, einem Myelinprotein, welches sich ebenfalls im unkompaktierten Myelin befindet, zeigte sich jedoch nicht (tg Placebo: n = 8; MW = 1,005; Stdf = 0,003; tg PA: n = 8; MW = 1,073; Stdf = 0,004; p > 0,18) (Abb. 33).



**Abb. 32: Effekt von Lonaprisan auf die *MAG*-mRNA-Expression**

Standard war das ubiquitär exprimierte, steroidunabhängige Exon1B des *PMP22*- Gens. PMD-Mäuse exprimierten weniger als 50% *MAG*-mRNA im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollen. Der Progesteron-antagonist erhöhte die Expression von *MAG*-mRNA signifikant.

## Ergebnisse



**Abb. 33: CNP-mRNA-Expression nach Lonaprisangabe**

Standard war das ubiquitär exprimierte, steroidunabhängige Exon1B des *PMP22*-Gens. Der Progesteron-antagonist hatte keinen Einfluss auf die Expression der *CNP*-mRNA. Die relativen Werte sind auf die Placebogruppe normiert.

### 4. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war den Effekt von zwei potentiell förderlichen Substanzen Lonaprisan und Curcumin auf das Mausmodell der PMD zu untersuchen. Da ein Mausmodell vorhanden war, welches die menschliche PMD gut nachahmt (Readhead et al. 1994; Anderson et al. 1998), wurden zeitaufwendige Zellkulturexperimente übersprungen, um direkt in vivo Strategien zu entwickeln. Diese Therapieansätze sollten schließlich zu einer Behandlung von an PMD erkrankten Patienten führen, die eine *PLP1*-Duplikation im Erbgut tragen. Bekannt war, dass Lonaprisan bei subkutaner Applikation das ZNS erreicht und dort die mRNA-Expression von *PLP1* in einer Kurzzeitstudie dosisabhängig reduziert (Prukop 2008). In Vorbereitung auf die Studie wurde zunächst ein geeignetes Testverfahren zur Charakterisierung des Phänotyps etabliert.

#### 4.1 Förderung der axonalen Unterstützung durch Oligodendrozyten und Induktion der mRNA-Expression von MAG durch Lonaprisan

Im Fall von Lonaprisan wurde die Hypothese geprüft, ob eine Reduktion der toxischen Überexpression von *PLP1* durch einen Progesteronantagonisten, den Verlauf der PMD im Mausmodell positiv beeinflussen kann.

Eine Reihe von Transkriptionsfaktoren, die die Myelingenexpression aktivieren, wurden in Zellkulturexperimenten identifiziert. Hierzu zählen unter anderen Transkriptionsfaktor Yin Yang 1, *Homeobox protein Nkx-2.2*, *Oligodendrocyte transcription factor 1* und *Myelin Gene Regulatory Factor* (He et al. 2007; Wegner 2008; Meijer et al. 2012; Emery et al. 2009). Sobald die Myelinisierung initiiert wurde, wird sie über den Phosphatidylinositol-3-Kinase-Proteinkinase B-Signaltransduktionsweg und den MAP-Kinase-Signalweg angetrieben (Flores et al. 2008; Goebels et al. 2010; Ishii et al. 2012). Neben bekannten Transkriptionsfaktoren wurden verschiedene potentielle Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren oder *Enhancer*-Elemente in der 5'-Region (Nave und Lemke 1991; Janz und Stoffel 1993; Berndt et al. 2001) und im Intron 1 des Mausgens (Dobretsova et al. 2004; Tuason et al. 2008) nachgewiesen.

Ein weithin verbreiteter Transkriptionsfaktor, der in Oligodendrozyten exprimiert (Jung-Testas et al. 1999) und pharmakologisch adressiert werden kann, ist der nukleäre Progesteronrezeptor. Er ist ein durch Liganden aktiviertes Zinkfingerprotein, das durch Progesteron aktiviert wird und durch bestimmte synthetische Antagonisten inhibiert werden kann. Der nukleäre Progesteronrezeptor ist Teil der deutlich größeren Steroidrezeptor-Familie, die an palindromische Sequenzen, sogenannte *Response*-Elemente in den Promotorregionen steroidresponsiver Gene bindet (Blaustein 2003). Progesteron wird im Gehirn von Neuronen und Gliazellen synthetisiert (Baulieu und Schumacher 1997; Schumacher et al. 2004) und der Progesteronrezeptor wird durch Nervenzellen und Oligo-

## Diskussion

dendrozyten exprimiert (Labombarda et al. 2009; Jung-Testas et al. 1999; MacLusky und McEwen 1980; Lauber et al. 1991; Hagihara et al. 1992). Steroidresponsive Elemente inklusive Progesteronrezeptor-Bindungsstellen (Beato et al. 1989; Beato und Klug 2000; Sandelin und Wasserman 2005) können in der Promotorregion des *PLP1*-Gens vorhergesagt werden (Prukop et al. 2014). Zudem steigern tägliche Injektionen von Progesteron die Expression von *PLP1*-mRNA im Nervus ischiadicus der Ratte (Sereda et al. 2003). Im PNS ist der aktivierende Effekt von Progesteron auf Schwannzellendifferenzierung und transkriptionelle Aktivierung von den Myelinenen *Pmp22* und *Myelinprotein Null (P0, MPZ)* bekannt (Martini et al. 2003; Schumacher et al. 2001). Der Progesteronrezeptorantagonist Onapriston und das später entwickelte Lonaprisan, inhibieren spezifisch den Effekt von Progesteron bei der Aktivierung der Transkription (Fuhrmann et al. 2000). Allerdings gibt es keine Daten über die funktionelle Rolle des Progesteronrezeptors bei der *Pp1*-Transkription.

Lonaprisan ist ein selektiver Progesteronantagonist und besitzt keine partiell agonistische Aktivität im Vergleich zu anderen Progesteronantagonisten (Afhüppe et al. 2010). Es besitzt ein günstiges Nebenwirkungsprofil, so dass eine tatsächliche Anwendung bei Patienten realistisch ist (Jonat et al. 2013). Lonaprisan überwindet die Blut-Hirn-Schranke und führte in der zehntägigen Dosis-Findungs-Studie bei 125 mg/kg zu einer Reduktion der *PLP1*-Überexpression von 1,8 um ca. 37 Prozent auf 1,5 (Prukop et al. 2014). Sogar nach einer zehnwöchigen Behandlung betrug die relative *PLP1*-Überexpression lediglich 1,6. Weil *PLP1* im ZNS vor allem durch Oligodendrozyten exprimiert wird und *PLP1*-transgene Mäuse keine ektope *PLP1*- Expression zeigen (Readhead et al. 1994), ist die Reduktion vor allem auf die Oligodendrozyten zurückzuführen.

Eine Quantifizierung des PLP-Proteins wurde nicht durchgeführt, da die *PLP1*-Dosis die Myelinisierung direkt beeinflusst (Readhead et al. 1994). Bei den transgenen Mäusen ist das PLP-Protein umso niedriger je höher die *PLP1*-Dosis ist (Readhead et al. 1994). Histologisch wurde nach Behandlung eine erhöhte Anzahl erhaltener myelinisierter Axone im Rückenmark nachgewiesen. Eine Messung von Proteinen würde deshalb wahrscheinlich eine im Verhältnis erhöhte Expression von Myelinproteinen und deshalb auch PLP-Protein ergeben und folglich zu einem paradoxen Ergebnis führen.

Unter der Gabe von Lonaprisan reduzierte sich die Zunahme der Koordinationsstörung im *Grid Test* um circa 50%. In der klinischen Bewertungsskala (*Clinical score*) zeigte sich eine geringere Beeinträchtigung. Analog hierzu reduzierte der Progesteronantagonist den Verlust myelinisierter Axone, so dass circa 30% mehr myelinisierte Axone im *Tractus corticospinalis* erhalten blieben. Hierbei korrelierten die Anzahl myelinisierter Axone mit der Leistung im *Grid Test*. Ein negativer noch höherer Korrelationskoeffizient zeigte sich für die Anzahl myelinisierter Axone in Vergleich mit der *PLP1*-mRNA-Expression. Dies bestätigte die Beobachtungen von Anderson et al. (1998), dass die Schwere der PMD Erkrankung in unserem Tiermodell eine Funktion des *PLP1*-Expressionsniveaus ist. Diese Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung der Regulation der Transkription von *PLP1*. Sie unterstützen die Hypothese, dass eine Verringerung der toxischen



## Diskussion

Überexpression von *PLP1* der Wirkmechanismus für den positiven Effekt von Lonaprisan sein könnte.

Die Anzahl unmyelinisierter Axone jedoch blieb unverändert. Auch die Dicke der Myelinscheide zeigte sich nicht alteriert. Es kam zu keiner Veränderung der Anzahl von Myelinpathologien im Sinne von Hyper- oder Hypomyelinisierung oder Schwellung der Myelinscheide (Dyer 2002; Merrill und Scolding 1999).

Diese Beobachtungen zeigen analoge Ergebnisse wie sie bei einer Therapiestudie mit einem Progesteronantagonisten bei einer Gendosis assoziierten Erkrankung des PNS, der CMT1A, gefunden wurden (Sereda et al. 2003; Meyer zu Horste et al. 2007). Die CMT1A wird durch eine Duplikation des Gens für das periphere Myelinprotein 22 (PMP22) ausgelöst und führt zu einer Demyelinisierung der Axone peripherer Nerven. Das PMP22 Protein ist als hydrophobes Protein mit vier Transmembrandomänen strukturell sehr ähnlich dem PLP und ist Teil des Myelins von Schwannzellen. Die Gabe des Progesteronantagonisten Onapriston verminderte die Überexpression von *PMP22*, reduzierte den axonalen Verlust und verbesserte den klinischen Phänotyp von einem transgenen Tiermodell für die CMT1A, der CMT1A-Ratte. Analog zu der vorliegenden Arbeit zeigte sich auch hier ein verminderter Verlust von Axonen, ohne dass Onapriston einen Effekt auf die Stärke der Myelinscheide hatte. Die Schlussfolgerung hieraus war, dass der Progesteronantagonist die toxische Überexpression von *Pmp22* soweit reduzierte, dass der axosupportive Effekt der Schwannzellen, jedoch nicht die Myelinisierung beeinflusst wurden.

Inflammation im Sinne von Aktivierung von Mikroglia, Infiltration des ZNS durch Lymphozyten und Astroglie sind beschriebene Pathologien bei PMD-Mäusen (Readhead et al. 1994; Anderson et al. 1998; Anderson et al. 1999; Cerghet et al. 2001). Lonaprisan reduzierte signifikant die Anzahl von Mikroglia, Lymphozyten und Astrozyten im *Tractus corticospinalis*. Dies könnte als Sekundäreffekt ein Hinweis auf eine Abnahme von Pathologien und damit verminderter Krankheitsaktivität sein, da Mäuse ohne funktionalen Progesteronrezeptor Zeichen einer aktivierten Entzündung zeigten (Tait et al. 2008).

Aus Studien mit zu Funktionsverlust führenden Mutationen des *PLP1*-Gens (Gruenenfelder et al. 2011; Klugmann et al. 1997) ist bekannt, dass diese zu axonalen Pathologien führen, ohne den Aufbau der Myelinstruktur zu stören. Daher scheint die Aufgabe von PLP eher die Unterstützung der axonalen Funktionen zu sein und nicht die Myelinisierung. Die Verminderung der Überexpression von *PLP1* durch Lonaprisan ist somit ein Therapieansatz, der es den Oligodendrozyten ermöglicht, die ummantelten Axone besser, am ehesten metabolisch, zu unterstützen.

Es existieren bislang nur wenige Therapieansätze, bei denen eine Verringerung der Krankheitsaktivität und eine positive Wirkung auf den Verlauf der Erkrankung erzielt worden sind. Eine cholesterinreiche Diät, die die Akkumulation von PLP intrazellulär reduziert und gleichzeitig den Transport und die Aufnahme in die Myelinschicht erhöht, zeigte therapeutische Effekte (Saher et al. 2012). Hier wurde auf den weiteren Synthese- und Transportweg von PLP Einfluss genommen, unter der Vorstellung, dass ein Missverhältnis der einzelnen Bestandteile des Myelins zur Patho-

## Diskussion

genese beiträgt.

Anderson et al. (1999) berichteten von einer abnormalen, intrazellulären Verteilung von Myelinproteinen, vor allem PLP, MAG und Myelin/Oligodendrozytenspezifisches Protein (MOSP) in homozygoten, *PLP1*-überexprimierenden Mäusen der Linie 66. Diese befinden sich vor allem im Zellsoma anstatt in der Myelinmembran. Karim et al. (2007) machten die Beobachtung, dass in PMD-Mäusen der Linie 66 andere Myelinproteine in Abhängigkeit von der *PLP1*-Gendosis in reduzierter Menge synthetisiert werden. So sank mit steigender *PLP1*-Gendosis die mRNA- und die Proteinkonzentration der Myelinproteine MBP, CNP und MAG bei myelinisierenden Oligodendrozyten. Kleinere Gendosen führten zu einer vorübergehenden Erhöhung des PLP-Proteins im Zellsoma ohne die Proteinzusammensetzung und Struktur des Myelins zu beeinflussen. Hypomyelinisierung und pathologische Alterationen in der intrazellulären Verteilung des PLP-Proteins traten nur bei hoher *PLP1* Gendosis auf. MAG Protein war hierbei nur bei Mäusen, die eine hohe Gendosis an *PLP1* hatten, erniedrigt, während MBP und CNP auch bei geringeren Gendosen erniedrigt waren. Die Autoren berichten von einem transitorischen Effekt auf mRNA-Ebene, der bei P60 nicht mehr messbar war. In der vorliegenden Arbeit bei PMD-Mäusen der Linie 72 wurde eine Reduktion der *MAG*-mRNA bei P91 auf 46% festgestellt, die unter Lonaprisangabe auf 58% der Expression der Wildtypen anstieg. *MAG* ist für seine axoprotektive Rolle bekannt (Yin et al. 1998; Lassmann et al. 1997; Weiss et al. 2000). Interessanterweise war für das Myelinprotein CNP keine Änderung auf mRNA-Ebene messbar, entgegen den Ergebnissen von Jung-Testas und Baulieu (1998), die eine Steigerung der CNP-Expression unter Progesteron feststellten. Dies spricht für eine differenzielle Regulation der mRNA-Expression von Myelinen unter Lonaprisan. Ein direkter Effekt von Progesteron auf die Transkription von *MAG* wurde zumindest unter bestimmten Bedingungen wie traumatischer ZNS-Schädigung beschrieben (Tyagi et al., 2014). Es könnte sich daher anstatt um ein Epiphänomen, eher um einen direkten Effekt des PA handeln.

Elitt et al. (2020) zeigten bei Mäusen mit einer *PLP1*-Punktmutation, dass sowohl auf zellulärer Ebene als auch in vivo eine Suppression der *PLP1*-mRNA-Expression mittels CRISPR/Cas-Methode (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats-Endonuklease Cas9) oder eine massive Reduktion der *PLP1*-mRNA-Translation mit Antisense oligonucleotides (ASOs) gelingen kann. Dies führte zu einer Verbesserung des Phänotyps und einer erheblich längeren Lebensspanne.

### **4.2 Curcumin verlangsamt den Progress der PMD im Mausmodell**

Curcumin ist im Vergleich zu Lonaprisan ein Stoff, der im PMD-Modell eher unspezifisch wirkte. Es hatte keinen Effekt auf die Expression von *PLP1*-mRNA. Hier wurden keine Rezeptoren direkt

## Diskussion

angesprochen, sondern die Expression bestimmter Gene, am ehesten der Signalwege für oxidativen Stress, Zellzykluskontrolle und Pentosephosphat, in Neuroglia induziert (Panchal et al. 2008).

Curcumin verbesserte die Bewegungskoordination der transgenen Mäuse im Vergleich zur Placebo-Gruppe gemessen mit dem *Grid Test*. Im *Tractus corticospinalis* waren am Endpunkt der Studie mehr myelinisierte Axone erhalten. Als wichtige Kontrolle zeigte sich, dass trotz bekannter Anfälligkeiten von Phänotyp-Untersuchungen, die Anzahl myelinisierter Axone direkt mit dem Koordinationsvermögen der Tiere korrelierte. Die Anzahl pathologisch unmyelinisierter Axone blieb hingegen unverändert. Die Dicke der Myelinscheide wurde von Curcumin nicht beeinflusst. Der verminderte Untergang myelinisierter Axone und nicht die Beschaffenheit des Myelins war am ehesten für die Verbesserung der Koordinationsdefizite der PMD-Mäuse verantwortlich. Hier zeigte sich erneut, dass die Funktion des Oligodendrozyten Axone zu erhalten, am ehesten getrennt ist von der Fähigkeit Myelin korrekt zu bilden.

Die Gabe von Curcumin verminderte auch die bekannte inflammatorische Reaktion und Narbenbildung in der weißen Substanz, nämlich die Aktivierung von Mikroglia, die Lymphozyteninfiltration und die Astrogliose. Curcumin ist für seine antiinflammatorische Wirkung durch Beeinflussung des Arachidonsäuremetabolismus unter anderem durch Hemmung der Cyclooxygenase 2 (Plummer et al. 1999; Hong et al. 2004) bekannt. Unklar ist jedoch, ob es sich hierbei um eine direkte Wirkung von Curcumin auf Entzündungszellen und -Faktoren handelt oder diese Beobachtung das Resultat einer insgesamt weniger starken Inflammation ist, da mehr Gewebe erhalten blieb. Da auch unter der Behandlung mit Lonaprisan oder durch cholesterinreiche Ernährung (Saher et al. 2012), die keine direkte immunmodulatorische Wirkung haben, eine ähnliche Abnahme von inflammatorischer Aktivität festgestellt wurde, ist am ehesten von einem Sekundäreffekt auszugehen.

Oligodendrozyten versorgen Axone mit Energiesubstraten. Sie können dazu abhängig von der Aktivität des Axons über eigene NMDA- Rezeptoren die Glycolyse steigern, um Laktat zu generieren, welches sie den Axonen zur Verfügung stellen, um auf diese Weise den axonalen Energiestoffwechsel zu unterstützen (Saab et al. 2016). Anderson et al. (1999) postulierten einen „metabolischen Burnout“ bei *PLP1*-Überexpression als Folge der konstant erhöhten Syntheseleistung und damit metabolischen Aktivität der Oligodendrozyten bei der PMD. Oligodendrozyten müssen zum Zeitpunkt der Myelinisierung massiv Myelinmembranen herstellen (Garbern 2007) und gleichzeitig aktivitätsabhängig Energiesubstrate dem Axon zur Verfügung stellen. Diese Fähigkeit könnte in der PMD-Situation verringert sein und gerade in den langen und aktiven Axonen, die vermehrt Energiesubstrate benötigen, zu metabolischer Unterversorgung führen. Demnach könnte abgesehen von der Dysmyelinisierung die „metabolische Überforderung“ des Oligodendrozyten zur oxidativen Imbalance führen. Gleichzeitig könnte auf diese Weise nicht nur eine Störung der saltatorischen Erregungsleitung, sondern ein Energiedefizit für die Störung der neuronalen Aktivität sein und schließlich auch zur Apoptose von Axonen führen. Ruiz et al. (2018) zeigten den Zusammenhang zwischen metabolischer Homöostase und Fehlfunktionen in

## Diskussion

Redoxsystemen der Mitochondrien bei der PMD auf.

Die Curcumingabe zeigte bereits bei Mäusen mit einer *PLP1*-Punktmutation eine Verlängerung der Lebenszeit um 25% und eine geringere Anzahl an apoptotischen Oligodendrozyten (Yu et al. 2012). Jedoch konnte kein molekularer Mechanismus, insbesondere keine Auswirkung auf die bei der Punktmutation als pathogenetisch ursächliche Akkumulation von fehlgebildetem PLP im endoplasmatischen Retikulum festgestellt werden. Dies lässt auch hier den Schluss auf eine eher allgemeine Wirkung als Antioxidans zu.

Curcumin wurde aufgrund seiner verschiedenen, potentiell pharmakologischen Eigenschaften in einer Fülle von humanen Studien bereits eingesetzt und zeigte sich in einem weiten Dosisbereich als gut verträglich (Sharma et al. 2005). Deshalb ist ein Einsatz bei der humanen PMD denkbar, dem steht jedoch eine geringe systemische Bioverfügbarkeit bei oraler Einnahme gegenüber (Sharma et al. 2007).

Unter Curcumingabe kam es zu einer verringerten Gewichtszunahme einzelner Tiere im Vergleich zu Placebo (Abb. 16). Um auszuschließen, dass Hungern oder Gewichtsabnahme den Verlauf der Erkrankung möglicherweise positiv beeinflussen, wurden die leichteren Tiere der Curcumingruppe mit den schwereren verglichen. Es zeigte sich kein Unterschied in der Bewegungskoordination im *Grid Test* (Abb. 17), so dass diese Abweichung am ehesten keine Störvariable für die Untersuchung darstellt.

### 4.3 Ausblick

Derzeit sind mehrere Therapiestudien bei PMD-Mäusen veröffentlicht (Prukop et al. 2014; Saher et al. 2012; Epplen et al. 2015), die ihren Angriffspunkt an jeweils unterschiedliche Zielstrukturen haben und deshalb unterschiedliche Stoffwechselprozesse im Oligodendrozyten beeinflussen. Zudem führt jede Therapie für sich nur zu einer Verlangsamung des Fortschreitens der Erkrankung. Aus diesem Grunde erscheint eine Kombination der einzelnen Therapieansätze sinnvoll, um ein besseres Ergebnis für die Patienten und einen möglichen additiven oder potenzierenden Effekt zu erzielen.

Für die Kombinationsbehandlung von Curcumin und Lonaprisan konnten jedoch ebensolche positiven Effekte nicht gezeigt werden. Hierfür könnte eine Interaktion beim hepatischen Metabolismus verantwortlich sein: Curcumin induziert das Cytochrom P450 3A4 (Cyp3A4) (Hsieh et al. 2014). Lonaprisan wird maßgeblich von Cyp3A4 abgebaut, da die Behandlung mit Cyp3A4-Inhibitoren ein Ausschlusskriterium für eine Behandlung mit Lonaprisan ist (ClinicalTrials.gov), so dass bei gleichzeitiger Gabe Lonaprisan schneller abgebaut wird und wahrscheinlich keinen ausreichenden Wirkspiegel aufbauen kann.

In Microarray-Untersuchungen (Prukop et al. 2014), die nicht Teil dieser Arbeit sind, wurde nach Lonaprisanbehandlung eine verringerte C-Jun- Expression festgestellt. Immunhistochemisch zeigen sich bei der PMD viele proliferierende Zellen, wie mit dem Proliferationsmarker Ki67 demonstriert

## Diskussion

wurde (Prukop et al. 2014). Durch Lonaprisangabe verringerte sich die Anzahl proliferierender Zellen auf Wildtyp-Niveau. C-Jun-Expression ist ein Charakteristikum für undifferenzierte Oligodendrozyten (Schreiner et al. 2015; Vardimon et al. 1999; Santra et al. 2016). Durch Runterregulation der *PLP1*-Expression durch Lonaprisan könnte die verminderte Expression von C-Jun ein Maß für die vermehrte Differenzierung von Oligodendrozyten sein. Die Differenzierung schließt bei Oligodendrozyten auch Myelinisierung mit ein. Ob C-Jun bei Oligodendrozyten aber wie bei Schwannzellen als negativer Regulator der Myelinisierung (Parkinson et al. 2008; Salzer 2008) wirken kann, ist bisher nicht bekannt.

Weitere Experimente, die nicht Teil dieser Arbeit sind, zeigten, dass bei PMD-Mäusen ein oxidatives Ungleichgewicht herrscht, da erhöhte Gluthationkonzentrationen in der weißen Substanz festgestellt wurden (Epplen et al. 2015). Diese Imbalance konnte durch die Gabe von Curcumin als Antioxidans ausgeglichen werden. Welche molekularen Mechanismen jedoch hierfür verantwortlich sind, ist weiter unklar.

Bei der Maus ist die Myelinisierung im Alter von 60 Tagen abgeschlossen, im Alter von 21 Tagen hat sie bereits den Zenit erreicht. Oligodendrozyten-Vorläufer-Zellen machen ca. 5-10% aller Glia des adulten Gehirns aus (Trotter et al. 2010). Bei der vorliegenden Arbeit wurde mit der Behandlung im Alter von 21 Tagen begonnen, einem Alter, in dem verschiedene Pathologien bereits vorhanden sind (Readhead et al. 1994; Anderson et al. 1998). Um den therapeutischen Effekt zu vergrößern, wäre die Gabe von Lonaprisan und Curcumin zu einem früheren Zeitpunkt möglicherweise mit einem Effekt auf die Dysmyelinisierung zu untersuchen.

Um die mögliche Anwendung beim Menschen vorzubereiten, wäre eine intrathekale Applikation von Lonaprisan im Mausmodell in einer Kurzzeitstudie denkbar. Hiermit könnte die eingesetzte Menge an Lonaprisan reduziert und die systemischen Nebenwirkungen deutlich verringert werden. Problematisch bei der Gabe von Progesteronantagonisten an PMD-Patienten könnte das mögliche Herabsenken der Krampfschwelle sein (Shiono et al. 2019), eine unerwünschte Arzneimittelwirkung, die durch intrathekale Gabe jedoch nicht verhindert werden kann.

Die intrathekale Gabe von *Antisense oligonucleotides* wie sie bei Mäusen mit einer *PLP1*-Punktmutation erfolgreich angewendet wurde (Elitt et al. 2020), könnte auch bei *PLP1*-Überexpression untersucht werden. Gerade aufgrund der massiven Reduktion der *PLP1*-mRNA-Expression, verglichen mit der vorliegenden Studie, könnte der therapeutische Effekt entsprechend größer sein.

# 5. Zusammenfassung

Mit der vorliegenden Arbeit wurde der Effekt von zwei potentiell protektiven Substanzen, Lonaprisan und Curcumin, auf ein Mausmodell für die Pelizaeus-Merzbacher-Erkrankung (PMD) untersucht. Die PMD ist eine hereditäre Leukodystrophie, für die es derzeit keine kausale Therapie gibt. Die PMD wird X-chromosomal meist durch eine Duplikation des *PLP1*-Gens vererbt (Mimault et al. 1999), was zu einer toxischen mRNA-Überexpression des *PLP1*-Gens führt, in dessen Folge Oligodendrozyten nicht mehr in der Lage sind, ausreichend funktionsfähiges Myelin zu bilden. Oligodendrozyten bilden mit den ummantelten Axonen nicht nur eine funktionelle Einheit, sie unterstützen diese auch unter anderem metabolisch, weswegen bei der PMD auch eine axonale Degeneration erfolgt. Dies führt bei den betroffenen Patienten zu kognitiver Einschränkung, epileptischen Anfällen, Ataxie, Dystonie, Nystagmus und vorzeitigem Tod. Das Mausmodell der PMD nach Readhead et al. (1994) ahmt den Verlauf der menschlichen PMD sehr gut nach. Es enthält zusätzliche Kopien des gesamten *PLP1*-Gens der Maus inklusive der 3,5 kb der 5'-regulatorischen Region, welche zu einer toxischen Überexpression des *PLP1*-Gens auf mRNA-Ebene mit dem Faktor von circa 1,8 in Hirngewebe von homozygoten Tieren der Linie 72 führen. Durch tägliche, subkutane Injektionen von Lonaprisan über 10 Wochen konnte die toxische Überexpression von *PLP1*-mRNA um 15% gesenkt werden. Die Motorik der mit Lonaprisan behandelten Tiere, gemessen mit dem *Grid Test*, verbesserte sich verglichen mit den Placebo-Kontrollen, erreichte jedoch nicht Wildtyp-Niveau. Ebenso demonstrierte die klinische Bewertungsskala, dass die Mäuse nach Lonaprisangabe weniger stark betroffen waren. Lonaprisan konservierte den Erhalt myelinisierter Axone im *Tractus corticospinalis*, wie die quantitative, elektronenmikroskopische Analyse ergab, ohne die Myelindicke zu beeinflussen. Immunhistochemisch untersuchte Kennzeichen der Pathologie der PMD wurden durch Lonaprisan verbessert: Die Immunantwort war abgeschwächt aufgrund der reduzierten Anzahl an Mikroglia und T-Lymphozyten. Zudem war die Astrogliose weniger stark ausgeprägt und die Anzahl an Oligodendrozyten nahm im Vergleich zu Placebo zu. Die Ergebnisse der *PLP1*-mRNA-Expression, des *Grid Test*verfahrens und der myelinisierten Axone im *Tractus corticospinalis* korrelierten miteinander signifikant, was die Hypothese über den Wirkmechanismus von Lonaprisan stützt.

Bei der Gabe von Curcumin hingegen ergab sich keine Korrelation der Expressionsdaten mit dem Phänotyp oder der elektronenmikroskopischen Auswertung. Die Wirkung von Curcumin ist eher mit einer Reduktion der anfallenden Radikale bei metabolischer Überforderung der Oligodendrozyten bei der PMD zu erklären. Die tägliche Gabe von Curcumin über 10 Wochen reduzierte die Ataxie gemessen mit dem *Grid Test* im Vergleich zu Placebo. Curcumin führte zu einem signifikanten Erhalt myelinisierter Axone im *Tractus corticospinalis* des Rückenmarks. Die Astrogliose, gemessen durch GFAP-positive Zellen, wurde durch Curcumin ebenso wie die Inflammation, analysiert durch CD3 und MAC3-Färbung, gemindert. Olig-2-positive Zellen zeigten sich durch Curcuminfütterung vermehrt im Vergleich zu Placebo.

## Zusammenfassung

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass sowohl Lonaprisan als auch Curcumin vielversprechende Ansätze zur Behandlung der PMD bieten.

## 6. Literaturverzeichnis

- Afhüppe W, Beekman JM, Otto C, Korr D, Hoffmann J, Fuhrmann U, Möller C (2010): In vitro characterization of ZK 230211--A type III progesterone receptor antagonist with enhanced antiproliferative properties. *J Steroid Biochem Mol Biol* 119, 45–55
- Aggarwal BB, Kumar A, Bharti AC (2003): Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies. *Anticancer Res* 23, 363–398
- Allan GF, Leng X, Tsai SY, Weigel NL, Edwards DP, Tsai MJ, O'Malley BW (1992): Hormone and antihormone induce distinct conformational changes which are central to steroid receptor activation. *J Biol Chem* 267, 19513–19520
- Anderson TJ, Schneider A, Barrie JA, Klugmann M, McCulloch MC, Kirkham D, Kyriakides E, Nave KA, Griffiths IR (1998): Late-onset neurodegeneration in mice with increased dosage of the proteolipid protein gene. *J Comp Neurol* 394, 506–519
- Anderson TJ, Klugmann M, Thomson CE, Schneider A, Readhead C, Nave KA, Griffiths IR (1999): Distinct Phenotypes Associated with Increasing Dosage of the PLP Gene: Implications for CMT1A Due to PMP22 Gene Duplication. *Ann N Y Acad Sci* 883, 234–246
- Andrews H, White K, Thomson C, Edgar J, Bates D, Griffiths I, Turnbull D, Nichols P (2006): Increased axonal mitochondrial activity as an adaptation to myelin deficiency in the Shiverer mouse. *J Neurosci Res* 83, 1533–1539
- Apisariyakul A, Vanittanakom N, Buddhasukh D (1995): Antifungal activity of turmeric oil extracted from *Curcuma longa* (Zingiberaceae). *J Ethnopharmacol* 49, 163–169
- Bansal R, Kumar M, Murray K, Morrison RS, Pfeiffer SE (1996): Regulation of FGF receptors in the oligodendrocyte lineage. *Mol Cell Neurosci* 7, 263–275
- Barres BA, Raff MC, Gaese F, Bartke I, Dechant G, Barde YA (1994): A crucial role for neurotrophin-3 in oligodendrocyte development. *Nature* 367, 371–375
- Baulieu E, Schumacher M (2000): Progesterone as a neuroactive neurosteroid, with special reference to the effect of progesterone on myelination. *Steroids* 65, 605–612
- Baulieu EE, Schumacher M (1997): Neurosteroids, with special reference to the effect of progesterone on myelination in peripheral nerves. *Mult Scler* 3, 105–112
- Baum L, Ng A (2004): Curcumin interaction with copper and iron suggests one possible mechanism of action in Alzheimer's disease animal models. *J Alzheimers Dis* 6, 367–377; discussion 443-449
- Baumann N, Pham-Dinh D (2001): Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiol Rev* 81, 871–927
- Beato M, Klug J (2000): Steroid hormone receptors: an update. *Hum Reprod Update* 6, 225–236
- Beato M, Chalepakis G, Schauer M, Slater EP (1989): DNA regulatory elements for steroid hormones. *J Steroid Biochem* 32, 737–747
- Berndt JA, Kim JG, Tosic M, Kim C, Hudson LD (2001): The transcriptional regulator Yin Yang 1 activates the myelin PLP gene. *J Neurochem* 77, 935–942
- Blaustein JD (2003): Progestin receptors: neuronal integrators of hormonal and environmental stimulation. *Ann N Y Acad Sci* 1007, 238–250
- Blomgren K, Hagberg H (2006): Free radicals, mitochondria, and hypoxia-ischemia in the developing brain. *Free Radic Biol Med* 40, 388–397
- Boison D, Stoffel W (1994): Disruption of the compacted myelin sheath of axons of the central nervous system in proteolipid protein-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 11709–11713
- Bonkowsky JL, Nelson C, Kingston JL, Filloux FM, Mundorff MB, Srivastava R (2010): The burden of inherited leukodystrophies in children. *Neurology* 75, 718–725



## Literaturverzeichnis

- Brady ST, Witt AS, Kirkpatrick LL, de Waegh SM, Readhead C, Tu PH, Lee VM (1999): Formation of compact myelin is required for maturation of the axonal cytoskeleton. *J Neurosci* 19, 7278–7288
- Braun PE, Horvath E, Yong VW, Bernier L (1990): Identification of GTP-binding proteins in myelin and oligodendrocyte membranes. *J Neurosci Res* 26, 16–23
- Brinton RD, Thompson RF, Foy MR, Baudry M, Wang J, Finch CE, Morgan TE, Pike CJ, Mack WJ, Stanczyk FZ, Nilsen J (2008): Progesterone receptors: form and function in brain. *Front Neuroendocrinol* 29, 313–339
- Budde H, Schmitt S, Fitzner D, Opitz L, Salinas-Riester G, Simons M (2010): Control of oligodendroglial cell number by the miR-17-92 cluster. *Development* 137, 2127–2132
- Cai XZ, Wang J, Li XD, Wang GL, Liu FN, Cheng MS, Li F (2009): Curcumin suppresses proliferation and invasion in human gastric cancer cells by downregulation of PAK1 activity and cyclin D1 expression. *Cancer Biol Ther* 8, 1360–1368
- Campagnoni AT, Macklin WB (1988): Cellular and molecular aspects of myelin protein gene expression. *Mol Neurobiol* 2, 41–89
- Campbell GR, Mahad DJ (2011): Mitochondria as crucial players in demyelinated axons: lessons from neuropathology and experimental demyelination. *Autoimmune Dis* 2011, 262847
- Cashion AB, Smith MJ, Wise PM (2003): The morphometry of astrocytes in the rostral preoptic area exhibits a diurnal rhythm on proestrus: relationship to the luteinizing hormone surge and effects of age. *Endocrinology* 144, 274–280
- Cerghet M, Bessert DA, Nave KA, Skoff RP (2001): Differential expression of apoptotic markers in jimpy and in Plp overexpressors: evidence for different apoptotic pathways. *J Neurocytol* 30, 841–855
- Chen RW, Qin ZH, Ren M, Kanai H, Chalecka-Franaszek E, Leeds P, Chuang DM (2003): Regulation of c-Jun N-terminal kinase, p38 kinase and AP-1 DNA binding in cultured brain neurons: roles in glutamate excitotoxicity and lithium neuroprotection. *J Neurochem* 84, 566–575
- ClinicalTrials.gov (2011); Sponsor: Bayer ; Information provided by (Responsible Party): Bayer ; United States National Library of Medicine at the National Institutes of Health; ZK 230211 in Postmenopausal Woman With Metastatic Breast Cancer; (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00555919>; abgerufen am 16.01.2022“)
- de Waegh SM, Lee VM, Brady ST (1992): Local modulation of neurofilament phosphorylation, axonal caliber, and slow axonal transport by myelinating Schwann cells. *Cell* 68, 451–463
- Delaunay D, Heydon K, Cumano A, Schwab MH, Thomas JL, Suter U, Nave KA, Zalc B, Spassky N (2008): Early neuronal and glial fate restriction of embryonic neural stem cells. *J Neurosci* 28, 2551–2562
- D'Eustachio P, Colman DR, Salzer JL (1988): Chromosomal location of the mouse gene that encodes the myelin-associated glycoproteins. *J Neurochem* 50, 589–593
- Dhaunchak AS, Nave KA (2007): A common mechanism of PLP/DM20 misfolding causes cysteine-mediated endoplasmic reticulum retention in oligodendrocytes and Pelizaeus-Merzbacher disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 17813–17818
- Diehl HJ, Schaich M, Budzinski RM, Stoffel W (1986): Individual exons encode the integral membrane domains of human myelin proteolipid protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 9807–9811
- Dobretsova A, Kokorina NA, Wight PA (2004): Potentiation of myelin proteolipid protein (Plp) gene expression is mediated through AP-1-like binding sites. *J Neurochem* 90, 1500–1510
- Douglas AJ, Fox MF, Abbott CM, Hinks LJ, Sharpe G, Povey S, Thompson RJ (1992): Structure and chromosomal localization of the human 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase gene. *Ann Hum Genet* 56, 243–254
- Dugas JC, Cuellar TL, Scholze A, Ason B, Ibrahim A, Emery B, Zamanian JL, Foo LC, McManus MT, Barres BA (2010): Dicer1 and miR-219 Are required for normal oligodendrocyte differentiation and myelination. *Neuron* 65, 597–611
- Dyer CA (2002): The structure and function of myelin: from inert membrane to perfusion pump. *Neurochem Res* 27, 1279–1292
- Edgar JM, Nave KA (2009): The role of CNS glia in preserving axon function. *Curr Opin Neurobiol* 19, 498–504

## Literaturverzeichnis

- Edgar JM, McLaughlin M, Yool D, Zhang SC, Fowler JH, Montague P, Barrie JA, McCulloch MC, Duncan ID, Garbern J, et al. (2004): Oligodendroglial modulation of fast axonal transport in a mouse model of hereditary spastic paraplegia. *J Cell Biol* 166, 121–131
- Edwards DP, DeMarzo AM, Oñate SA, Beck CA, Estes PA, Nordeen SK (1991): Mechanisms controlling steroid receptor binding to specific DNA sequences. *Steroids* 56, 271–278
- Elitt MS, Barbar L, Shick HE, Powers BE, Maeno-Hikichi Y, Madhavan M, Allan KC, Nawash BS, Gevorgyan AS, Hung S, et al. (2020): Suppression of proteolipid protein rescues Pelizaeus-Merzbacher disease. *Nature*. 585, 397–403
- Emery B, Agalliu D, Cahoy JD, Watkins TA, Dugas JC, Mulinyawe SB, Ibrahim A, Ligon KL, Rowitch DH, Barres BA (2009): Myelin gene regulatory factor is a critical transcriptional regulator required for CNS myelination. *Cell* 138, 172–185
- Epplen DB, Prukop T, Nientiedt T, Albrecht P, Arlt FA, Stassart RM, Kassmann CM, Methner A, Nave KA, Werner HB, Sereda MW (2015): Curcumin therapy in a Plp1 transgenic mouse model of Pelizaeus-Merzbacher disease. *Ann Clin Transl Neurol* 2, 787–796
- Epstein J, Sanderson IR, Macdonald TT (2010): Curcumin as a therapeutic agent: the evidence from in vitro, animal and human studies. *Br J Nutr* 103, 1545–1557
- Fancy SPJ, Baranzini SE, Zhao C, Yuk DI, Irvine KA, Kaing S, Sanai N, Franklin RJM, Rowitch DH (2009): Dysregulation of the Wnt pathway inhibits timely myelination and remyelination in the mammalian CNS. *Genes Dev* 23, 1571–1585
- Feng XQ, Dong Y, Fu YM, Zhu YH, Sun JL, Wang Z, Sun FY, Zheng P (2004): Progesterone inhibition of dopamine-induced increase in frequency of spontaneous excitatory postsynaptic currents in rat prelimbic cortical neurons. *Neuropharmacology* 46, 211–222
- Flores AI, Narayanan SP, Morse EN, Shick HE, Yin X, Kidd G, Avila RL, Kirschner DA, Macklin WB (2008): Constitutively active Akt induces enhanced myelination in the CNS. *J Neurosci* 28, 7174–7183
- Fuhrmann U, Hess-Stumpp H, Cleve A, Neef G, Schwede W, Hoffmann J, Fritzscheier KH, Chwalisz K (2000): Synthesis and biological activity of a novel, highly potent progesterone receptor antagonist. *J Med Chem* 43, 5010–5016
- Fünfschilling U, Supplie LM, Mahad D, Boretius S, Saab AS, Edgar J, Brinkmann BG, Kassmann CM, Tzvetanova ID, Möbius W, Diaz F, Meijer D, Suter U, Hamprecht B, Sereda MW, Moraes CT, Frahm J, Goebbels S, Nave KA (2012): Glycolytic oligodendrocytes maintain myelin and long-term axonal integrity. *Nature* 485, 517–521
- Garbern JY (2007): Pelizaeus-Merzbacher disease: Genetic and cellular pathogenesis. *Cell Mol Life Sci* 64, 50–65
- Gautam SC, Xu YX, Pindolia KR, Janakiraman N, Chapman RA (1998): Nonselective inhibition of proliferation of transformed and nontransformed cells by the anticancer agent curcumin (diferuloylmethane). *Biochem Pharmacol* 55, 1333–1337
- Ghoumari AM, Ibanez C, El-Etr M, Leclerc P, Eychenne B, O'Malley BW, Baulieu EE, Schumacher M (2003): Progesterone and its metabolites increase myelin basic protein expression in organotypic slice cultures of rat cerebellum. *J Neurochem* 86, 848–859
- Giachino C, Galbiati M, Fasolo A, Peretto P, Melcangi R (2003): Neurogenesis in the subependymal layer of the adult rat: a role for neuroactive derivatives of progesterone. *Ann N Y Acad Sci* 1007, 335–339
- Giachino C, Galbiati M, Fasolo A, Peretto P, Melcangi RC (2004): Effects of progesterone derivatives, dihydroprogesterone and tetrahydroprogesterone, on the subependymal layer of the adult rat. *J Neurobiol* 58, 493–502
- Gibbs RB (2000): Long-term treatment with estrogen and progesterone enhances acquisition of a spatial memory task by ovariectomized aged rats. *Neurobiol Aging* 21, 107–116
- Goebbels S, Oltrogge JH, Kemper R, Heilmann I, Bormuth I, Wolfer S, Wichert SP, Möbius W, Liu X, Lappe-Siefke C, et al. (2010): Elevated phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in glia triggers cell-autonomous membrane wrapping and myelination. *J Neurosci* 30, 8953–8964
- Gould E, Woolley CS, Frankfurt M, McEwen BS (1990): Gonadal steroids regulate dendritic spine density in hippocampal pyramidal cells in adulthood. *J Neurosci* 10, 1286–1291
- Gow A, Lazzarini RA (1996): A cellular mechanism governing the severity of Pelizaeus-Merzbacher disease. *Nat Genet* 13, 422–428

## Literaturverzeichnis

- Gow A, Friedrich VL, Lazzarini RA (1994): Intracellular transport and sorting of the oligodendrocyte transmembrane proteolipid protein. *J Neurosci Res* 37, 563–573
- Gravel M, Peterson J, Yong VW, Kottis V, Trapp B, Braun PE (1996): Overexpression of 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase in transgenic mice alters oligodendrocyte development and produces aberrant myelination. *Mol Cell Neurosci* 7, 453–466
- Griffiths I, Klugmann M, Anderson T, Yool D, Thomson C, Schwab MH, Schneider A, Zimmermann F, McCulloch M, Nadon N, Nave KA (1998): Axonal swellings and degeneration in mice lacking the major proteolipid of myelin. *Science* 280, 1610–1613
- Groh J, Friedman HC, Orel N, Ip CW, Fischer S, Spahn I, Schäffner E, Hörner M, Stadler D, Buttman M, et al. (2016): Pathogenic inflammation in the CNS of mice carrying human PLP1 mutations. *Hum Mol Genet* 25, 4686–4702
- Groshong SD, Owen GI, Grimison B, Schauer IE, Todd MC, Langan TA, Sclafani RA, Lange CA, Horwitz KB (1997): Biphasic regulation of breast cancer cell growth by progesterone: role of the cyclin-dependent kinase inhibitors, p21 and p27(Kip1). *Mol Endocrinol* 11, 1593–1607
- Gruenenfelder FI, Thomson G, Penderis J, Edgar JM (2011): Axon-glia interaction in the CNS: what we have learned from mouse models of Pelizaeus-Merzbacher disease. *J Anat* 219, 33–43
- Gudz TI, Schneider TE, Haas TA, Macklin WB (2002): Myelin proteolipid protein forms a complex with integrins and may participate in integrin receptor signaling in oligodendrocytes. *J Neurosci* 22, 7398–7407
- Guerra-Araiza C, Reyna-Neyra A, Salazar AM, Cerbón MA, Morimoto S, Camacho-Arroyo I (2001): Progesterone receptor isoforms expression in the prepuberal and adult male rat brain. *Brain Res Bull* 54, 13–17
- Habib P, Beyer C (2015): Regulation of brain microglia by female gonadal steroids. *J Steroid Biochem Mol Biol* 146, 3–14
- Hagihara K, Hirata S, Osada T, Hirai M, Kato J (1992): Distribution of cells containing progesterone receptor mRNA in the female rat di- and telencephalon: an in situ hybridization study. *Brain Res Mol Brain Res* 14, 239–249
- He L, Chen HJ, Qian L, Chen G, Buzby JS (2010): Curcumin protects pre-oligodendrocytes from activated microglia in vitro and in vivo. *Brain Res* 1339, 60–69
- He Y, Dupree J, Wang J, Sandoval J, Li J, Liu H, Shi Y, Nave KA, Casaccia-Bonnel P (2007): The transcription factor Yin Yang 1 is essential for oligodendrocyte progenitor differentiation. *Neuron* 55, 217–230
- Hegde ML, Hegde PM, Rao KS, Mitra S (2011): Oxidative genome damage and its repair in neurodegenerative diseases: function of transition metals as a double-edged sword. *J Alzheimers Dis* 24 Suppl 2, 183–198
- Hildebrand C, Remahl S, Persson H, Bjartmar C (1993): Myelinated nerve fibres in the CNS. *Prog Neurobiol* 40, 319–384
- Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH (1991): Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 7276–7280
- Hong J, Bose M, Ju J, Ryu JH, Chen X, Sang S, Lee MJ, Yang CS (2004): Modulation of arachidonic acid metabolism by curcumin and related beta-diketone derivatives: effects on cytosolic phospholipase A(2), cyclooxygenases and 5-lipoxygenase. *Carcinogenesis* 25, 1671–1679
- Hsieh YW, Huang CY, Yang SY, Peng YH, Yu CP, Chao PDL, Hou YC (2014): Oral intake of curcumin markedly activated CYP 3A4: in vivo and ex-vivo studies. *Sci Rep* 4, 6587
- Huang SK, Yi M, Palmer E, Marsh DG (1995): A dominant T cell receptor beta-chain in response to a short ragweed allergen, Amb a 5. *J Immunol* 154, 6157–6162
- Inoue K (2005): PLP1-related inherited dysmyelinating disorders: Pelizaeus-Merzbacher disease and spastic paraplegia type 2. *Neurogenetics* 6, 1–16
- Ireson C, Orr S, Jones DJ, Verschoye R, Lim CK, Luo JL, Howells L, Plummer S, Jukes R, Williams M, et al. (2001): Characterization of metabolites of the chemopreventive agent curcumin in human and rat hepatocytes and in the rat in vivo, and evaluation of their ability to inhibit phorbol ester-induced prostaglandin E2 production. *Cancer Res* 61, 1058–1064

## Literaturverzeichnis

- Ishii A, Fyffe-Maricich SL, Furusho M, Miller RH, Bansal R (2012): ERK1/ERK2 MAPK signaling is required to increase myelin thickness independent of oligodendrocyte differentiation and initiation of myelination. *J Neurosci* 32, 8855–8864
- Jahn O, Tenzer S, Werner HB (2009): Myelin proteomics: molecular anatomy of an insulating sheath. *Mol Neurobiol* 40, 55–72
- Janz R, Stoffel W (1993): Characterization of a brain-specific Sp1-like activity interacting with an unusual binding site within the myelin proteolipid protein promoter. *Biol Chem Hoppe Seyler* 374, 507–517
- Jin CY, Lee JD, Park C, Choi YH, Kim GY (2007): Curcumin attenuates the release of pro-inflammatory cytokines in lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglia. *Acta Pharmacol Sin* 28, 1645–1651
- Jonat W, Bachelot T, Ruhstaller T, Kuss I, Reimann U, Robertson JFR (2013): Randomized phase II study of lonaprisan as second-line therapy for progesterone receptor-positive breast cancer. *Ann Oncol* 24, 2543–2548
- Jung-Testas I, Baulieu EE (1998): Steroid hormone receptors and steroid action in rat glial cells of the central and peripheral nervous system. *J Steroid Biochem Mol Biol* 65, 243–251
- Jung-Testas I, Do Thi A, Koenig H, Désarnaud F, Shazand K, Schumacher M, Baulieu EE (1999): Progesterone as a neurosteroid: synthesis and actions in rat glial cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 69, 97–107
- Kagawa T, Ikenaka K, Inoue Y, Kuriyama S, Tsujii T, Nakao J, Nakajima K, Aruga J, Okano H, Mikoshiba K (1994): Glial cell degeneration and hypomyelination caused by overexpression of myelin proteolipid protein gene. *Neuron* 13, 427–442
- Karlsson U, Schultz RL (1965): Fixation of the central nervous system for electron microscopy by aldehyde perfusion: I. Preservation with aldehyde perfusates versus direct perfusion with osmium tetroxide with special reference to membranes and the extracellular space. *J Ultrastruct Res* 12, 160–186
- Kato J, Hirata S, Nozawa A, Mouri N (1993): The ontogeny of gene expression of progesterin receptors in the female rat brain. *J Steroid Biochem Mol Biol* 47, 173–182
- Kim JY, Shen S, Dietz K, He Y, Howell O, Reynolds R, Casaccia P (2010): HDAC1 nuclear export induced by pathological conditions is essential for the onset of axonal damage. *Nat Neurosci* 13, 180–189
- Kim T, Pfeiffer SE (1999): Myelin glycosphingolipid/cholesterol-enriched microdomains selectively sequester the non-compact myelin proteins CNP and MOG. *J Neurocytol* 28, 281–293
- Kitagawa K, Sinoway MP, Yang C, Gould RM, Colman DR (1993): A proteolipid protein gene family: expression in sharks and rays and possible evolution from an ancestral gene encoding a pore-forming polypeptide. *Neuron* 11, 433–448
- Klintsova A, Levy WB, Desmond NL (1995): Astrocytic volume fluctuates in the hippocampal CA1 region across the estrous cycle. *Brain Res* 690, 269–274
- Klugmann M, Schwab MH, Pühhöfer A, Schneider A, Zimmermann F, Griffiths IR, Nave KA (1997): Assembly of CNS myelin in the absence of proteolipid protein. *Neuron* 18, 59–70
- Knapp PE (1996): Proteolipid protein: is it more than just a structural component of myelin? *Dev Neurosci* 18, 297–308
- Kuttan G, Kumar KBH, Guruvayoorappan C, Kuttan R (2007): Antitumor, anti-invasion, and antimetastatic effects of curcumin. *Adv Exp Med Biol* 595, 173–184
- Labombarda F, Guennoun R, Gonzalez S, Roig P, Lima A, Schumacher M, De Nicola AF (2000): Immunocytochemical evidence for a progesterone receptor in neurons and glial cells of the rat spinal cord. *Neurosci Lett* 288, 29–32
- Labombarda F, González SL, Lima A, Roig P, Guennoun R, Schumacher M, de Nicola AF (2009): Effects of progesterone on oligodendrocyte progenitors, oligodendrocyte transcription factors, and myelin proteins following spinal cord injury. *Glia* 57, 884–897
- Lappe-Siefke C, Goebbels S, Gravel M, Nicksch E, Lee J, Braun PE, Griffiths IR, Nave KA (2003): Disruption of Cnpl uncouples oligodendroglial functions in axonal support and myelination. *Nat Genet* 33, 366–374
- Lassmann H, Bartsch U, Montag D, Schachner M (1997): Dying-back oligodendroglial pathology: a late sequel of myelin-associated glycoprotein deficiency. *Glia* 19, 104–110

## Literaturverzeichnis

- Lauber AH, Romano GJ, Pfaff DW (1991): Sex difference in estradiol regulation of progesterin receptor mRNA in rat mediobasal hypothalamus as demonstrated by in situ hybridization. *Neuroendocrinology* 53, 608–613
- Lee HS, Jung KK, Cho JY, Rhee MH, Hong S, Kwon M, Kim SH, Kang SY (2007): Neuroprotective effect of curcumin is mainly mediated by blockade of microglial cell activation. *Pharmazie* 62, 937–942
- Lee LG, Connell CR, Bloch W (1993): Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucleic Acids Res* 21, 3761–3766
- Lees MB, Smith FI, Dyer CA, Greer JM, Pakaski M (1995): Expression of myelin proteolipid protein in oligodendrocytes and transfected cells. *Prog Brain Res* 105, 295–303
- Leonelli E, Bianchi R, Cavaletti G, Caruso D, Crippa D, Garcia-Segura LM, Lauria G, Magnaghi V, Roglio I, Melcangi RC (2007): Progesterone and its derivatives are neuroprotective agents in experimental diabetic neuropathy: a multimodal analysis. *Neuroscience* 144, 1293–1304
- Leonhardt SA, Boonyaratanakornkit V, Edwards DP (2003): Progesterone receptor transcription and non-transcription signaling mechanisms. *Steroids* 68, 761–770
- Li H, Swiercz R, Englander EW (2009): Elevated metals compromise repair of oxidative DNA damage via the base excision repair pathway: implications of pathologic iron overload in the brain on integrity of neuronal DNA. *J Neurochem* 110, 1774–1783
- Lim GP, Chu T, Yang F, Beech W, Frautschy SA, Cole GM (2001): The curry spice curcumin reduces oxidative damage and amyloid pathology in an Alzheimer transgenic mouse. *J Neurosci* 21, 8370–8377
- Luft JH (1961): Improvements in epoxy resin embedding methods. *J Biophys Biochem Cytol* 9, 409–414
- Mackenzie GG, Queisser N, Wolfson ML, Fraga CG, Adamo AM, Oteiza PI (2008): Curcumin induces cell-arrest and apoptosis in association with the inhibition of constitutively active NF-kappaB and STAT3 pathways in Hodgkin's lymphoma cells. *Int J Cancer* 123, 56–65
- Macklin WB, Campagnoni CW, Deininger PL, Gardinier MV (1987): Structure and expression of the mouse myelin proteolipid protein gene. *J Neurosci Res* 18, 383–394
- MacLusky NJ, McEwen BS (1980): Progesterin receptors in the developing rat brain and pituitary. *Brain Res* 189, 262–268
- Madison DL, Krueger WH, Cheng D, Trapp BD, Pfeiffer SE (1999): SNARE complex proteins, including the cognate pair VAMP-2 and syntaxin-4, are expressed in cultured oligodendrocytes. *J Neurochem* 72, 988–998
- Martini L, Magnaghi V, Melcangi RC (2003): Actions of progesterone and its 5alpha-reduced metabolites on the major proteins of the myelin of the peripheral nervous system. *Steroids* 68, 825–829
- Mazaheri M, Moosavi-Movahedi AA, Saboury AA, Khodagholi F, Shaerzadeh F, Sheibani N (2015): Curcumin Protects  $\beta$ -Lactoglobulin Fibril Formation and Fibril-Induced Neurotoxicity in PC12 Cells. *PloS One* 10, e0133206
- Meijer DH, Kane MF, Mehta S, Liu H, Harrington E, Taylor CM, Stiles CD, Rowitch DH (2012): Separated at birth? The functional and molecular divergence of OLIG1 and OLIG2. *Nat Rev Neurosci* 13, 819–831
- Merrill JE, Scolding NJ (1999): Mechanisms of damage to myelin and oligodendrocytes and their relevance to disease. *Neuropathol Appl Neurobiol* 25, 435–458
- Merzbacher L: Eine eigenartige familiär-hereditäre Erkrankungsform (Aplasia axialis extracorticalis congenita). In: Alzheimer A, Gaupp R, Lewandowsky M, Wilmanns K (Hrsg.): *Zeitschrift für die gesamte Neurologie und Psychiatrie*. Verlag von Julius Springer, Berlin 1910, Band 3, Artikel 1
- Meyer zu Horste G, Prukop T, Liebetanz D, Mobius W, Nave KA, Sereda MW (2007): Antiprogestone therapy uncouples axonal loss from demyelination in a transgenic rat model of CMT1A neuropathy. *Ann Neurol* 61, 61–72
- Meyer-Franke A, Shen S, Barres BA (1999): Astrocytes induce oligodendrocyte processes to align with and adhere to axons. *Mol Cell Neurosci* 14, 385–397
- Mimault C, Giraud G, Courtois V, Cailloux F, Boire JY, Dastugue B, Boespflug-Tanguy O (1999): Proteolipoprotein gene analysis in 82 patients with sporadic Pelizaeus-Merzbacher Disease: duplications, the major cause of the disease, originate more frequently in male germ cells, but point mutations do not. The Clinical European Network on Brain Demyelinating Disease. *Am J Hum Genet* 65, 360–369

## Literaturverzeichnis

- Morin D, Barthélémy S, Zini R, Labidalle S, Tillement JP (2001): Curcumin induces the mitochondrial permeability transition pore mediated by membrane protein thiol oxidation. *FEBS Lett* 495, 131–136
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986): Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1, 263–273
- Mythri RB, Harish G, Dubey SK, Misra K, Bharath MMS (2011): Glutamoyl diester of the dietary polyphenol curcumin offers improved protection against peroxynitrite-mediated nitrosative stress and damage of brain mitochondria in vitro: implications for Parkinson's disease. *Mol Cell Biochem* 347, 135–143
- Nadon NL, West M (1998): Myelin proteolipid protein: function in myelin structure is distinct from its role in oligodendrocyte development. *Dev Neurosci* 20, 533–539
- Naito M, Wu X, Nomura H, Kodama M, Kato Yuriko, Kato Yoji, Osawa T (2002): The protective effects of tetrahydrocurcumin on oxidative stress in cholesterol-fed rabbits. *J Atheroscler Thromb* 9, 243–250
- Nave KA, Lemke G (1991): Induction of the myelin proteolipid protein (PLP) gene in C6 glioblastoma cells: functional analysis of the PLP promoter. *J Neurosci* 11, 3060–3069
- Nave KA, Salzer JL (2006): Axonal regulation of myelination by neuregulin 1. *Curr Opin Neurobiol* 16, 492–500
- Nave KA, Trapp BD (2008): Axon-glia signaling and the glial support of axon function. *Annu Rev Neurosci* 31, 535–561
- Nave KA, Lai C, Bloom FE, Milner RJ (1986): Jimpy mutant mouse: a 74-base deletion in the mRNA for myelin proteolipid protein and evidence for a primary defect in RNA splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 9264–9268
- Negi PS, Jayaprakasha GK, Jagan Mohan Rao L, Sakariah KK (1999): Antibacterial activity of turmeric oil: a byproduct from curcumin manufacture. *J Agric Food Chem* 47, 4297–4300
- Okada K, Wangpoengtrakul C, Tanaka T, Toyokuni S, Uchida K, Osawa T (2001): Curcumin and especially tetrahydrocurcumin ameliorate oxidative stress-induced renal injury in mice. *J Nutr* 131, 2090–2095
- Owen GI, Richer JK, Tung L, Takimoto G, Horwitz KB (1998): Progesterone regulates transcription of the p21(WAF1) cyclin- dependent kinase inhibitor gene through Sp1 and CBP/p300. *J Biol Chem* 273, 10696–10701
- Pal R, Miranda M, Narayan M (2011): Nitrosative stress-induced Parkinsonian Lewy-like aggregates prevented through polyphenolic phytochemical analog intervention. *Biochem Biophys Res Commun* 404, 324–329
- Panchal HD, Vranizan K, Lee CY, Ho J, Ngai J, Timiras PS (2008): Early anti-oxidative and anti-proliferative curcumin effects on neuroglioma cells suggest therapeutic targets. *Neurochem Res* 33, 1701–1710
- Park SK, Miller R, Krane I, Vartanian T (2001): The erbB2 gene is required for the development of terminally differentiated spinal cord oligodendrocytes. *J Cell Biol* 154, 1245–1258
- Parkinson DB, Bhaskaran A, Arthur-Farraj P, Noon LA, Woodhoo A, Lloyd AC, Feltri ML, Wrabetz L, Behrens A, Mirsky R, Jessen KR (2008): c-Jun is a negative regulator of myelination. *J Cell Biol* 181, 625–637
- Payne HR, Hemperly JJ, Lemmon V (1996): N-cadherin expression and function in cultured oligodendrocytes. *Brain Res Dev Brain Res* 97, 9–15
- Pelizaeus F (1885): Ueber eine eigenthümliche Form spastischer Lähmung mit Cerebralerscheinungen auf hereditärer Grundlage. (Multiple Sklerose). *Arch Psychiatr Nervenkr* 16, 698–710
- Perry MC, Demeule M, Régina A, Moundjian R, Béliveau R (2010): Curcumin inhibits tumor growth and angiogenesis in glioblastoma xenografts. *Mol Nutr Food Res* 54, 1192–1201
- Pfeiffer SE, Warrington AE, Bansal R (1993): The oligodendrocyte and its many cellular processes. *Trends Cell Biol* 3, 191–197
- Pfriegeer FW, Barres BA (1995): What the fly's glia tell the fly's brain. *Cell* 83, 671–674
- Piaton G, Gould RM, Lubetzki C (2010): Axon-oligodendrocyte interactions during developmental myelination, demyelination and repair. *J Neurochem* 114, 1243–1260
- Plummer SM, Holloway KA, Manson MM, Munks RJ, Kaptein A, Farrow S, Howells L (1999): Inhibition of cyclo-

## Literaturverzeichnis

- oxygenase 2 expression in colon cells by the chemopreventive agent curcumin involves inhibition of NF-kappaB activation via the NIK/IKK signalling complex. *Oncogene* 18, 6013–6020
- Poltorak M, Sadoul R, Keilhauer G, Landa C, Fahrig T, Schachner M (1987): Myelin-associated glycoprotein, a member of the L2/HNK-1 family of neural cell adhesion molecules, is involved in neuron-oligodendrocyte and oligodendrocyte-oligodendrocyte interaction. *J Cell Biol* 105, 1893–1899
- Prukop T: Tierexperimentelle Studien zur Behandlung der axonalen Degeneration bei primär glialen Gendosisdefekten des zentralen und peripheren Nervensystems. Med. Diss. Göttingen, 2008
- Prukop T, Epplen DB, Nientiedt T, Wichert SP, Fledrich R, Stassart RM, Rossner MJ, Edgar JM, Werner HB, Nave KA, Sereda MW (2014): Progesterone antagonist therapy in a Pelizaeus-Merzbacher mouse model. *Am J Hum Genet* 94, 533–546
- Purkayastha S, Berliner A, Fernando SS, Ranasinghe B, Ray I, Tariq H, Banerjee P (2009): Curcumin blocks brain tumor formation. *Brain Res* 1266, 130–138
- Qian X, Davis AA, Goderie SK, Temple S (1997): FGF2 concentration regulates the generation of neurons and glia from multipotent cortical stem cells. *Neuron* 18, 81–93
- Rao CV (2007): Regulation of COX and LOX by curcumin. *Adv Exp Med Biol* 595, 213–226
- Readhead C, Schneider A, Griffiths I, Nave KA (1994): Premature arrest of myelin formation in transgenic mice with increased proteolipid protein gene dosage. *Neuron* 12, 583–595
- Reddy AC, Lokesh BR (1994): Studies on the inhibitory effects of curcumin and eugenol on the formation of reactive oxygen species and the oxidation of ferrous iron. *Mol Cell Biochem* 137, 1–8
- Reuter S, Charlet J, Juncker T, Teiten MH, Dicato M, Diederich M (2009): Effect of curcumin on nuclear factor kappaB signaling pathways in human chronic myelogenous K562 leukemia cells. *Ann N Y Acad Sci* 1171, 436–447
- Reynolds ES (1963): The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol* 17, 208–212
- Richardson KC, Jarett L, Finke EH (1960): Embedding in epoxy resins for ultrathin sectioning in electron microscopy. *Stain Technol* 35, 313–323
- Richer JK, Lange CA, Manning NG, Owen G, Powell R, Horwitz KB (1998): Convergence of progesterone with growth factor and cytokine signaling in breast cancer. Progesterone receptors regulate signal transducers and activators of transcription expression and activity. *J Biol Chem* 273, 31317–31326
- Rosenbluth J, Nave KA, Mierzwa A, Schiff R (2006): Subtle myelin defects in PLP-null mice. *Glia* 54, 172–182
- Rosenbluth J, Schiff R, Lam P (2009): Effects of osmolality on PLP-null myelin structure: implications re axon damage. *Brain Res* 1253, 191–197
- Saab AS, Tzvetavona ID, Trevisiol A, Baltan S, Dibaj P, Kusch K, Möbius W, Goetze B, Jahn HM, Huang W, et al. (2016): Oligodendroglial NMDA Receptors Regulate Glucose Import and Axonal Energy Metabolism. *Neuron* 91, 119–132
- Saher G, Rudolphi F, Corthals K, Ruhwedel T, Schmidt KF, Löwel S, Dibaj P, Barrette B, Möbius W, Nave KA (2012): Therapy of Pelizaeus-Merzbacher disease in mice by feeding a cholesterol-enriched diet. *Nat Med* 18, 1130–1135
- Salzer JL (2008): Switching myelination on and off. *J Cell Biol* 181, 575–577
- Salzer JL, Holmes WP, Colman DR (1987): The amino acid sequences of the myelin-associated glycoproteins: homology to the immunoglobulin gene superfamily. *J Cell Biol* 104, 957–965
- Sandelin A, Wasserman WW (2005): Prediction of nuclear hormone receptor response elements. *Mol Endocrinol* 19, 595–606
- Santra M, Chopp M, Santra S, Nallani A, Vyas S, Zhang ZG, Morris DC (2016): Thymosin beta 4 up-regulates miR-200a expression and induces differentiation and survival of rat brain progenitor cells. *J Neurochem* 136, 118–132
- Satoskar RR, Shah SJ, Shenoy SG (1986): Evaluation of anti-inflammatory property of curcumin (diferuloyl methane) in patients with postoperative inflammation. *Int J Clin Pharmacol* 24, 651–654

## Literaturverzeichnis

- Schneider A, Montague P, Griffiths I, Fanarraga M, Kennedy P, Brophy P, Nave KA (1992): Uncoupling of hypomyelination and glial cell death by a mutation in the proteolipid protein gene. *Nature* 358, 758–761
- Schneider A, Länder H, Schulz G, Wolburg H, Nave KA, Schulz JB, Simons M (2005): Palmitoylation is a sorting determinant for transport to the myelin membrane. *J Cell Sci* 118, 2415–2423
- Schreiner B, Ingold-Heppner B, Pehl D, Locatelli G, Berrit-Schönthaler H, Becher B (2015): Deletion of Jun proteins in adult oligodendrocytes does not perturb cell survival, or myelin maintenance in vivo. *PLoS One* 10, e0120454
- Schumacher M, Guennoun R, Mercier G, Désarnaud F, Lacor P, Bénavides J, Ferzaz B, Robert F, Baulieu EE (2001): Progesterone synthesis and myelin formation in peripheral nerves. *Brain Res Brain Res Rev* 37, 343–359
- Schumacher M, Guennoun R, Robert F, Carelli C, Gago N, Ghoumari A, Gonzalez Deniselle MC, Gonzalez SL, Ibanez C, Labombarda F, et al. (2004): Local synthesis and dual actions of progesterone in the nervous system: neuroprotection and myelination. *Growth Horm IGF Res* 14 Suppl A, S18-33
- Schumacher M, Guennoun R, Ghoumari A, Massaad C, Robert F, El-Etr M, Akwa Y, Rajkowski K, Baulieu EE (2007a): Novel perspectives for progesterone in hormone replacement therapy, with special reference to the nervous system. *Endocr Rev* 28, 387–439
- Schumacher M, Guennoun R, Stein DG, De Nicola AF (2007b): Progesterone: therapeutic opportunities for neuroprotection and myelin repair. *Pharmacol Ther* 116, 77–106
- Seitelberger F (1954): Die Pelizaeus-Merzbacher'sche Krankheit. Klinische-anatomische Untersuchung zum Problem ihrer Stellung unter den diffusen Sklerosen. *Wien Z Nervenheilkd Grenzgeb* 9, 228–289
- Seitelberger F: Pelizaeus-Merzbacher disease. In: Vinken PJ, Bruyn GW (Hrsg.): *Handbook of Clinical Neurology*. Elsevier, Amsterdam (NL) 1970, Band 10, 150–202
- Sereda MW, Meyer zu Hörste G, Suter U, Uzma N, Nave KA (2003): Therapeutic administration of progesterone antagonist in a model of Charcot-Marie-Tooth disease (CMT-1A). *Nat Med* 9, 1533–1537
- Sharma RA, Gescher AJ, Steward WP (2005): Curcumin: the story so far. *Eur J Cancer* 41, 1955–1968
- Sharma RA, Steward WP, Gescher AJ (2007): Pharmacokinetics and pharmacodynamics of curcumin. *Adv Exp Med Biol* 595, 453–470
- Shin JY, Fang ZH, Yu ZX, Wang CE, Li SH, Li XJ (2005): Expression of mutant huntingtin in glial cells contributes to neuronal excitotoxicity. *J Cell Biol* 171, 1001–1012
- Shiono S, Williamson J, Kapur J, Joshi S (2019): Progesterone receptor activation regulates seizure susceptibility. *Ann Clin Transl Neurol* 6, 1302–1310
- Sikora E, Bielak-Zmijewska A, Piwocka K, Skierski J, Radziszewska E (1997): Inhibition of proliferation and apoptosis of human and rat T lymphocytes by curcumin, a curry pigment. *Biochem Pharmacol* 54, 899–907
- Simons M, Nave KA (2015): Oligodendrocytes: Myelination and Axonal Support. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 8, a020479
- Simons M, Krämer EM, Thiele C, Stoffel W, Trotter J (2000): Assembly of Myelin by Association of Proteolipid Protein with Cholesterol- and Galactosylceramide-Rich Membrane Domains. *J Cell Biol* 151, 143–154
- Simons M, Kramer EM, Macchi P, Rathke-Hartlieb S, Trotter J, Nave KA, Schulz JB (2002): Overexpression of the myelin proteolipid protein leads to accumulation of cholesterol and proteolipid protein in endosomes/lysosomes: implications for Pelizaeus-Merzbacher disease. *J Cell Biol* 157, 327–336
- Singh U, Barik A, Singh BG, Priyadarsini KI (2011): Reactions of reactive oxygen species (ROS) with curcumin analogues: Structure-activity relationship. *Free Radic Res* 45, 317–325
- Southwood C, Gow A (2001): Molecular pathways of oligodendrocyte apoptosis revealed by mutations in the proteolipid protein gene. *Microsc Res Tech* 52, 700–708
- Spassky N, Goujet-Zalc C, Parmantier E, Olivier C, Martinez S, Ivanova A, Ikenaka K, Macklin W, Cerruti I, Zalc B, Thomas JL (1998): Multiple restricted origin of oligodendrocytes. *J Neurosci* 18, 8331–8343
- Spiller SE, Logsdon NJ, Deckard LA, Sontheimer H (2011): Inhibition of nuclear factor kappa-B signaling reduces growth in medulloblastoma in vivo. *BMC Cancer* 11, 136



## Literaturverzeichnis

- Srimal RC, Dhawan BN (1973): Pharmacology of diferuloyl methane (curcumin), a non-steroidal anti-inflammatory agent. *J Pharm Pharmacol* 25, 447–452
- Stecca B, Southwood CM, Gragerov A, Kelley KA, Friedrich VL, Gow A (2000): The evolution of lipophilin genes from invertebrates to tetrapods: DM-20 cannot replace proteolipid protein in CNS myelin. *J Neurosci* 20, 4002–4010
- Stone DJ, Song Y, Anderson CP, Krohn KK, Finch CE, Rozovsky I (1998): Bidirectional transcription regulation of glial fibrillary acidic protein by estradiol in vivo and in vitro. *Endocrinology* 139, 3202–3209
- Stridh MH, Correa F, Nodin C, Weber SG, Blomstrand F, Nilsson M, Sandberg M (2010): Enhanced glutathione efflux from astrocytes in culture by low extracellular Ca<sup>2+</sup> and curcumin. *Neurochem Res* 35, 1231–1238
- Tait AS, Butts CL, Sternberg EM (2008): The role of glucocorticoids and progestins in inflammatory, autoimmune, and infectious disease. *J Leukoc Biol* 84, 924–931
- Tang S, Shen YJ, DeBellard ME, Mukhopadhyay G, Salzer JL, Crocker PR, Filbin MT (1997): Myelin-associated glycoprotein interacts with neurons via a sialic acid binding site at ARG118 and a distinct neurite inhibition site. *J Cell Biol* 138, 1355–1366
- Tatar CL, Appikatla S, Bessert DA, Paintlia AS, Singh I, Skoff RP (2010): Increased Plp1 gene expression leads to massive microglial cell activation and inflammation throughout the brain. *ASN Neuro* 2, e00043
- Taveggia C, Feltri ML, Wrabetz L (2010): Signals to promote myelin formation and repair. *Nat Rev Neurol* 6, 276–287
- Tawk M, Makoukji J, Belle M, Fonte C, Trousson A, Hawkins T, Li H, Ghandour S, Schumacher M, Massaad C (2011): Wnt/beta-catenin signaling is an essential and direct driver of myelin gene expression and myelinogenesis. *J Neurosci* 31, 3729–3742
- Taylor CM, Coetzee T, Pfeiffer SE (2002): Detergent-insoluble glycosphingolipid/cholesterol microdomains of the myelin membrane. *J Neurochem* 81, 993–1004
- Tegenge MA, Rajbhandari L, Shrestha S, Mithal A, Hosmane S, Venkatesan A (2014): Curcumin protects axons from degeneration in the setting of local neuroinflammation. *Exp Neurol* 253, 102–110
- Timsit S, Martinez S, Allinquant B, Peyron F, Puelles L, Zalc B (1995): Oligodendrocytes originate in a restricted zone of the embryonic ventral neural tube defined by DM-20 mRNA expression. *J Neurosci* 15, 1012–1024
- Trapp BD (1990): Myelin-associated glycoprotein. Location and potential functions. *Ann N Y Acad Sci* 605, 29–43
- Trapp BD, Bernier L, Andrews SB, Colman DR (1988): Cellular and subcellular distribution of 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase and its mRNA in the rat central nervous system. *J Neurochem* 51, 859–868
- Trotter J, Karram K, Nishiyama A (2010): NG2 cells: Properties, progeny and origin. *Brain Res Rev* 63, 72–82
- Tuason MC, Rastikerdar A, Kuhlmann T, Goujet-Zalc C, Zalc B, Dib S, Friedman H, Peterson A (2008): Separate proteolipid protein/DM20 enhancers serve different lineages and stages of development. *J Neurosci* 28, 6895–6903
- Umemori H, Sato S, Yagi T, Aizawa S, Yamamoto T (1994): Initial events of myelination involve Fyn tyrosine kinase signalling. *Nature* 367, 572–576
- Vanderver A, Prust M, Tonduti D, Mochel F, Hussey HM, Helman G, Garbern J, Eichler F, Labauge P, Aubourg P, et al. (2015): Case definition and classification of leukodystrophies and leukoencephalopathies. *Mol Genet Metab* 114, 494–500
- Vardimon L, Ben-Dror I, Avisar N, Oren A, Shifftan L (1999): Glucocorticoid control of glial gene expression. *J Neurobiol* 40, 513–527
- Vartanian T, Corfas G, Li Y, Fischbach GD, Stefansson K (1994): A role for the acetylcholine receptor-inducing protein ARIA in oligodendrocyte development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 11626–11630
- Vogel US, Thompson RJ (1988): Molecular structure, localization, and possible functions of the myelin-associated enzyme 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase. *J Neurochem* 50, 1667–1677
- Wang JM, Johnston PB, Ball BG, Brinton RD (2005): The neurosteroid allopregnanolone promotes proliferation of rodent and human neural progenitor cells and regulates cell-cycle gene and protein expression. *J Neurosci* 25, 4706–4718

## Literaturverzeichnis

- Wegner M (2008): A matter of identity: transcriptional control in oligodendrocytes. *J Mol Neurosci* 35, 3–12
- Weiss MD, Hammer J, Quarles RH (2000): Oligodendrocytes in aging mice lacking myelin-associated glycoprotein are dystrophic but not apoptotic. *J Neurosci Res* 62, 772–780
- Werner HB, Kuhlmann K, Shen S, Uecker M, Schardt A, Dimova K, Orfaniotou F, Dhaunchak A, Brinkmann BG, Möbius W, et al. (2007): Proteolipid protein is required for transport of sirtuin 2 into CNS myelin. *J Neurosci* 27, 7717–7730
- Wolf NI, van Spaendonk RM, Hobson GM, Kamholz J: PLP1 Disorders. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJ, Mirzaa G, Amemiya A (Hrsg.): GeneReviews (<http://www.genereviews.org/>). © 1993-2022 University of Washington, Seattle (USA) 1999; („<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/ezproxy.u-pec.fr/books/NBK1182/>; abgerufen am 16.01.2022“)
- Yamada M, Ivanova A, Yamaguchi Y, Lees MB, Ikenaka K (1999): Proteolipid protein gene product can be secreted and exhibit biological activity during early development. *J Neurosci* 19, 2143–2151
- Yin X, Crawford TO, Griffin JW, Tu P h, Lee VM, Li C, Roder J, Trapp BD (1998): Myelin-associated glycoprotein is a myelin signal that modulates the caliber of myelinated axons. *J Neurosci* 18, 1953–1962
- Yin X, Baek RC, Kirschner DA, Peterson A, Fujii Y, Nave KA, Macklin WB, Trapp BD (2006): Evolution of a neuroprotective function of central nervous system myelin. *J Cell Biol* 172, 469–478
- Yin X, Kidd GJ, Nave KA, Trapp BD (2008): P0 protein is required for and can induce formation of schmidt-lantermann incisures in myelin internodes. *J Neurosci* 28, 7068–7073
- Yu LH, Morimura T, Numata Y, Yamamoto R, Inoue N, Antalfy B, Goto Y, Deguchi K, Osaka H, Inoue K (2012): Effect of curcumin in a mouse model of Pelizaeus-Merzbacher disease. *Mol Genet Metab* 106, 108–114
- Zhao X, He X, Han X, Yu Y, Ye F, Chen Y, Hoang T, Xu X, Mi QS, Xin M, et al. (2010): MicroRNA-mediated control of oligodendrocyte differentiation. *Neuron* 65, 612–626