

Aus der Abteilung Neurogenetik
(Leiter: Prof. K.-A. Nave, Ph.D.)
des Max-Planck-Instituts für Experimentelle Medizin
in Göttingen

**Experimentelle Therapie eines transgenen Tier-
modells der Charcot-Marie-Tooth-Krankheit mit
Meriva-Curcumin und Cholesterol**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
für Zahnheilkunde

der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Anna Dilan Yildiz

aus
Göttingen

Göttingen 2015

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. Heyo Klaus Kroemer

I. Berichtstatter: Prof. Dr. med. Michael Werner Sereda

II. Berichtstatter/in: PD Dr. Marco Henneke

III. Berichtstatter/in: Prof. Dr. Rainer Mausberg

Tag der mündlichen Prüfung: 19. Juni 2017

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	
1	Einleitung 1
1.1	Das Nervensystem 1
1.2	Myelinisierung 2
1.3	CMT1a 3
1.4	Meriva-Curcumin 7
1.5	Cholesterol 9
1.6	Tiermodell der CMT1a..... 10
1.7	Zielsetzung der Arbeit 10
1.8	Tiere 11
1.8.1	Rattenzucht 11
1.8.2	Haltung der Versuchstiere 11
1.8.3	Die Identifizierung der Tiere 12
1.8.4	Genotypisierung der Tiere 12
1.8.5	Therapieverlauf 13
1.8.6	Phänotypisierung der Tiere 14
1.8.7	Hotplate-Test..... 17
1.8.8	Elektrophysiologische Messungen 18
1.8.9	Präparation der Tiere 18
1.8.10	Messung der Muskelmasse..... 18
2	Material und Methoden..... 19
2.1	Material 19
2.1.1	Verbrauchsmaterialien 19
2.1.2	Chemikalien und Substanzen..... 20
2.1.3	Geräte 20
2.1.4	Nukleinsäuren 22

Inhaltsverzeichnis

2.1.5	Primer.....	22
2.1.6	Puffer und Lösungen.....	23
2.1.7	Computersoftware.....	24
2.2	Molekularbiologische Methoden.....	25
2.2.1	DNA-Isolierung aus Schwanzhautproben zur Genotypisierung.....	25
2.2.2	PCR zur Genotypisierung.....	26
2.2.3	Agarosegel-Elektrophorese.....	27
2.3	Histologische Methoden.....	28
2.3.1	Präparation peripherer Nerven.....	28
2.3.2	Einbettung in Kunstharz.....	29
2.3.3	Mikrotomie: Herstellung von Semidünnschnitten.....	31
2.3.4	Lichtmikroskopie.....	31
2.4	Datenverarbeitung.....	32
3	Ergebnisse.....	33
3.1	Gewicht.....	33
3.2	Phänotypisierung.....	35
3.2.1	Vorderläufe über die Zeit.....	35
3.2.2	Vorderläufe zum Therapiebeginn an p26.....	36
3.2.3	Vorderläufe zum Endzeitpunkt p112 (Therapieende).....	37
3.2.4	Hinterläufe über die Zeit.....	38
3.2.5	Hinterläufe zu Therapiebeginn an p26.....	39
3.2.6	Hinterläufe zum Endzeitpunkt an p112.....	40
3.3	Hotplate-Test.....	41
3.4	Musculus tibialis craniali- Gewicht.....	42
3.5	Semidünnschnitte des Nervus tibialis.....	44
3.6	Histologische Auswertung des Nervus tibialis.....	45

Inhaltsverzeichnis

3.6.1	Histologische Auswertung der Cholesterol-Therapiegruppe	45
3.6.2	Histologische Auswertung des Nervus tibialis der Meriva-Curcumin-Therapiegruppe	47
3.7	Elektrophysiologische Auswertung.....	50
3.7.1	Nervenleitgeschwindigkeit.....	50
3.7.2	Muskelsummenaktionspotenziale (proximal) nach Therapieende an p112	52
4	Diskussion.....	54
5	Zusammenfassung.....	61
6	Literaturverzeichnis	63
7	Abbildungsverzeichnis.....	69
8	Tabellenverzeichnis	71

Abkürzungsverzeichnis

µl	Mikroliter
ATF6	<i>activating transcription factor 6</i>
bp	Basenpaare
CH	Cholesterol-Gruppe
CMT	Charcot-Marie-Tooth-Erkrankung (<i>Charcot-Marie-Tooth disease</i>)
CMT1	Charcot-Marie-Tooth-Erkrankung Typ 1
CMT1A	Charcot-Marie-Tooth-Erkrankung Subtyp 1A (PMP22-Duplikation)
CMT-Ratte	PMP22 überexprimierende transgene Ratte
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DMP30	<i>2,4,6-tris-dimethylaminomethyl-phenol</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DDSA	<i>2-dodecenylsuccinic acid anhydride</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	endoplasmatisches Retikulum
HMSN	hereditäre motorisch-sensible Neuropathie
IRE1	<i>Inositol-requiring enzyme 1</i>
i.p.	intraperitoneal
KG	Körpergewicht
ME	Meriva-Curcumin-Gruppe
min	Minuten
MPI	Max-Planck-Institut
MSAP	Muskel-Summen-Aktionspotenziale
MPZ	Myelin-Protein Zero
N	Newton
NLG	Nervenleitgeschwindigkeit
p	Signifikanzwert (<i>probability</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>

Abkürzungsverzeichnis

PERK	<i>protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase</i>
PL	Placebo-Gruppe
PMP22	peripheres Myelin-Protein 22
<i>PMP22</i>	peripheres Myelin-Protein 22 (Gen)
PNS	peripheres Nervensystem
pX	postnatal
rpm	<i>rounds per minute</i>
s	Sekunde
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
tg	transgen
UPR	<i>unfolded protein response</i>
UPS	<i>ubiquitin proteasome system</i>
WT	Wildtyp
ZNS	zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Das Nervensystem

Das menschliche Nervensystem besteht aus einer Vielzahl von Neuronen und Gliazellen und ist gegliedert in ein zentrales Nervensystem (ZNS) und ein peripheres Nervensystem (PNS). Als ZNS bezeichnet man Gehirn und Rückenmark. Es ist u. a. für die Verarbeitung von sensorischen Reizen und die Koordination von motorischen Leistungen zuständig.

Das PNS hingegen umfasst den Teil des Neuronengeflechtes außerhalb von Gehirn und Rückenmark. Es leitet sensorische Reize zum Gehirn hin und motorische Signale vom ZNS in die Peripherie des Körpers.

Die Neuronen sind aufgebaut aus mehreren kleinen Ausläufern (Dendriten), die Reize aufnehmen und zum Zelleib (Soma) weiterleiten. Vom Soma aus leitet ein Ausläufer (Axon) den Reiz weiter fort (Abb.1). Die Axone sind oftmals von einer Myelinscheide umhüllt und nur an den sogenannten Ranvier-Schnürringen unterbrochen. Im ZNS bilden Gliazellen vom Typ der Oligodendrozyten die isolierende Myelinscheide, was im PNS durch die Schwannzellen übernommen wird.

Der Reiz besteht aus einem elektrischen Signal, das durch aktiven und passiven Ionenaustausch an den Membranen hervorgerufen wird. Wird dadurch das ursprüngliche Ruhepotenzial der Zelle bis zu einem kritischen Schwellenwert depolarisiert, entsteht das Aktionspotenzial und wird als elektrischer Reiz weitergeleitet. Das Axon spaltet sich letztlich in Kollateralen auf, die das Signal z. B. an die Dendriten eines anderen Neurons übertragen (Trepel 1995).

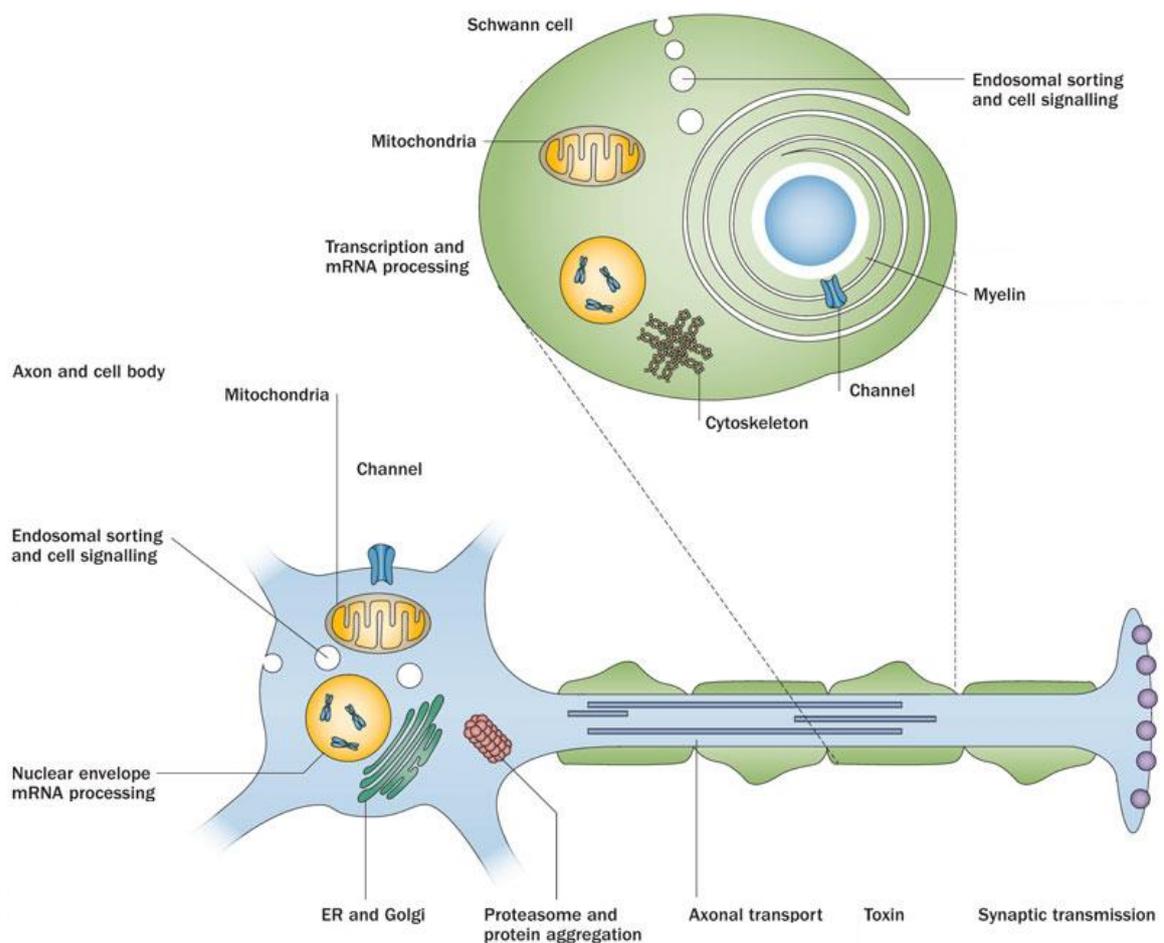


Abbildung 1: Schematische Darstellung eines Neurons (modifiziert nach Rossor et al. 2013, S.565)

1.2 Myelinisierung

Die Axone sind meistens von einer schützenden Isolierschicht, der Markscheide, umgeben. Diese wird von den sogenannten Gliazellen gebildet. Im ZNS sind diese Gliazellen Oligodendrozyten. Auch Astrozyten und Mikrogliazellen gehören zu den Gliazell-Typen des ZNS haben jedoch keine Myelinisierungsfunktionen. Die Schwannzellen sind die einzigen Gliazellen des PNS und bilden die Markscheide aus.

Neben Isolation und Schutz durch die Markscheide haben die Gliazellen auch eine versorgende Funktion für das Neuron. Die Isolierschicht umfasst Axone ab

einem Durchmesser von 1 μm und ist nur an den Ranvier-Schnürringen (auch Nodien genannt) unterbrochen.

Die Isolierschicht beschleunigt die Erregungsausbreitung und führt nur an den Unterbrechungen zu Aktionspotenzialen. Diese Form der Erregungsweiterleitung wird „saltatorische Erregungsausbreitung“ genannt, da das Aktionspotenzial von Schnürring zu Schnürring „springt“.

Die Schwannzelle lagert eine mehrschichtige, fetthaltige (75 % Lipide) Biomembran um das Axon. Im Gegensatz zu den Oligodendrozyten ist die Schwannzelle nicht in der Lage, mehrere isolierte Abschnitte (Internodien) zu bilden. Eine Schwannzelle formt jeweils nur ein Internodium.

Verschiedene Pathologien sind in Bezug auf die Myelinschicht und die Schwannzellen erforscht (Lüllmann-Rauch 2012). Dazu gehören die hereditären, peripheren Neuropathien, wie die am häufigsten vorkommende Charcot-Marie-Tooth-Krankheit (CMT), auch hereditäre motorisch-sensible Neuropathie (HMSN) genannt.

Um die Krankheit besser verstehen zu können und Heilungsansätze zu finden, wurden verschiedene Tiermodelle entwickelt.

1.3 CMT1a

Die Charcot-Marie-Tooth-Krankheit wurde nach ihren Entdeckern Jean-Martin Charcot (1825–1893), Pierre Marie (1853–1940) und Howard Tooth (1856–1926) benannt. Sie gehört zu den hereditär motorisch-sensiblen Neuropathien (HMSN). Mit einer Häufigkeit von 1 : 2500 ist die CMT-Erkrankung die am meisten auftretende, erblich bedingte Neuropathie (Nelis et al. 1996). Man kann in eine primär demyelinisierte und primär axonale Form unterscheiden. Hauptunterscheidungsmerkmal ist dabei die Nervenleitgeschwindigkeit (NLG) (Harding und Thomas 1980). Bei normaler NLG >38 m/s spricht man von der primär axonalen oder intermediären Form und bei einer NLG <38 m/s von der primär demyelinisierten Form (Thomas et al. 1997). Die CMT1-Erkrankung gehört zu der primär demyelinisierten Form und wird autosomal-dominant vererbt.

Sie kann in verschiedene Subtypen unterteilt werden, wobei der Subtyp CMT1a bei ca. 68 % der CMT-Erkrankten am häufigsten vorkommt (Wise et al. 1993) und mit einer Duplikation der Region p11.2-p12 auf Chromosom 17 assoziiert ist. Der Bereich umfasst ca. $1,5 \times 10^6$ Basenpaare und kodiert für das periphere Myelin-Protein 22 (PMP22) (Lupski et al. 1991; Chance et al. 1992). In den meisten Fällen ist ein ungleiches Crossing Over während der Meiose der Spermatogenese für die partielle Duplikation verantwortlich (Palau et al. 1993).

Der Gendefekt betrifft das Myelin-Gen PMP22, das v.a. in den Schwannzellen vorkommt. Die Gendosis und Expression von PMP22 hat enorme Auswirkungen auf die Entwicklung und Versorgung der peripheren Nerven (Lupski et al. 1992). Experimente an Knockout-Mäusen zeigten, dass PMP22 an der Initiierung der PNS-Myelinisierung beteiligt ist (Carenini et al. 1999). Bei transgenen Mäusen mit zusätzlichen PMP22-Kopien konnten gestörte Zelldifferenzierungen der Schwannzelle beobachtet werden (Magyar et al. 1996), sowie eine gesteigerte Proliferations- und Apoptoserate bei Schwannzellen (Fabbretti et al. 1995; Sancho et al. 2001).

Es kommt zu De- und Hypermyelinisierung, was sich auch histologisch deutlich äußert. Es werden segmentale Demyelinisierung von großkalibrigen motorischen Axonen und die *onion bulbs* beobachtet (Dyck 1993). Durch die Demyelinisierung kommt es im Verlauf der Krankheit zu einem Untergang großer, motorischer Axone (Lewis et al. 2003) und somit zu Muskelatrophie und dem klinischen Erscheinungsbild der CMT1a (Abb.2 und Abb.3).

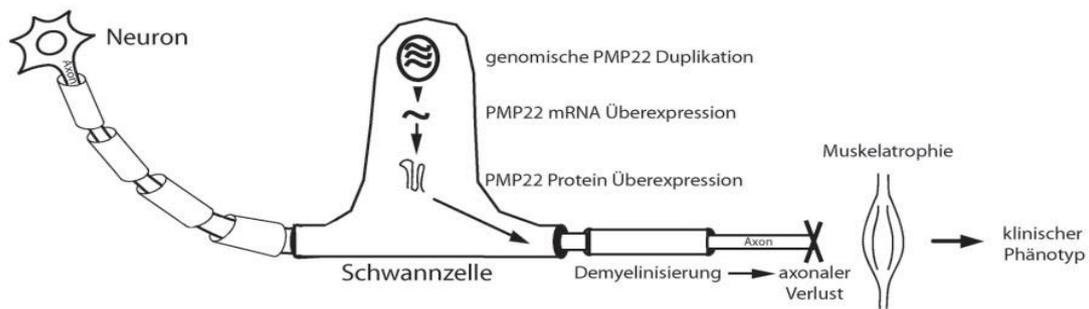


Abbildung 2: Schematische Darstellung der CMT1a.

Die DNA-Duplikation verursacht eine PMP22 mRNA-Überexpression. Es folgen Demyelinisierung, axonaler Verlust, Muskelatrophie und der klinische Phänotyp (adaptiert von Meyer zu Hörste und Sereda 2005, S.25).

Das PMP22 macht sowohl bei Nagetieren als auch beim Menschen ca. 2-5 % der Proteinmenge des PNS-Myelins aus (Quarles 1997; Bronstein 2000; Garbay et al. 2000) und ist ein 22 kDa schweres hydrophobes Glykoprotein, das aus 160 Aminosäuren besteht (Jetten und Suter 2000).

Durch die Duplikation weisen die Erkrankten eine höhere *PMP22* Gendosis auf, die sowohl mit dem Schweregrad der Erkrankung, als auch mit der mRNA-Expression korreliert (Yoshikawa et al. 1994; Vallat et al. 1996), wobei jedoch keine Relation zwischen den neurologischen Ausfällen und dem erhöhten PMP22-Proteinlevel oder dessen mRNA beobachtet wurde. Vielmehr wird die sonst fein regulierte PMP22-Expression durch die zusätzliche Kopie gestört. Die Variabilität spielt demnach eine größere Rolle als das absolute Level an PMP22 (Katona et al. 2009). Demnach sollte eine Normalisierung des PMP22-Levels das Krankheitsbild verbessern können und somit ein Therapieziel sein. Versuche in diese Richtung sind bereits unternommen worden, z.B. durch den Progesteronantagonisten Onapriston, der die Überexpression von PMP22 reduziert und im transgenen Rattenmodell den Phänotyp verbesserte (Sereda et al. 2003; Meyer zu Hörste et al. 2007).

Es sind über die letzten Jahre jedoch noch eine Vielzahl weitere Gene identifiziert worden, die mit einer CMT-Erkrankung verbunden sind (Shy und Patzkó 2011). Unter anderem das Myelin-Protein Zero (CMT1b) und Connexin 32 (CMT1X) (Hattori et al. 2003), die auch zu den Proteinen des peripheren Myelins zählen

(Werner et al. 1998). Eine regelmäßig aktualisierte Liste ist verfügbar unter: <http://www.molgen.ua.ac.be/CMTMutations/default.cfm>.

Die Symptome der CMT1a-Erkrankung sind allgemeine Schwäche, sensorischer Verlust, Hyporeflexie, Skelettverformungen und Gangabnormalitäten aufgrund einer Muskelatrophie, welche in den Füßen beginnt und nach proximal verläuft. Auffallend sind zudem Deformierungen der Fußanatomie, wie der Hohl- oder Pferdefuß und Hammerzehen sowie Atrophien der Hand- und der unteren Beinmuskulatur (Abb.3).

Die Symptomatik variiert zwischen verschiedenen Patienten stark.

Die ersten Symptome treten meist zwischen dem 10. und 40. Lebensjahr auf. (Shy et al. 2005).



Abbildung 3: Klinische Symptome der CMT-Erkrankung

Ein CMT-Patient zeigt die typisch klinischen Symptome wie (A,B) Hohlfüße mit Hammerzehen, (C,D) Atrophie der Handmuskulatur, (E,F) Atrophie der Beinmuskulatur (adaptiert von Pareyson et al. 2006, S.5)

1.4 Meriva-Curcumin

Laut Herstellerangaben der Firma Indena (Mailand, Italien; Giori A, Franceschi F. European Patent Application EP1837030) verbindet Meriva® den aktiven Wirkstoff Curcumin mit Phospholipiden im Verhältnis von 1 : 2, um es membrangängiger zu machen. Weiterhin wird Cellulose beigemischt, um die Rezeptur zu verbessern, wobei der Gesamtanteil von Curcumin 20 % beträgt.

Curcumin wurde erstmals um 1815 von Vogel und Pelletier aus der *Curcuma longa* isoliert. Der Curcuminkomplex besteht aus ca. 77 % Diferuloylmethan, 17 % Demethoxycurcumin und 6 % Bisdemethoxycurcumin (Anand et al. 2007). Seine hydrophobe Struktur als Diferuloylmethan ist 1910 von J. Milobedzka und V. Lampe bestimmt worden (Aggarwal und Sung 2009). Durch die Regulation von verschiedenen Transkriptions- und Wachstumsfaktoren, Entzündungszytokinen, Proteinkinasen und anderen Enzymen besitzt das Curcumin eine antioxidantische, entzündungshemmende, antivirale, antibakterielle und antifungale sowie protektive Wirkung gegen Krebs (Aggarwal et al. 2007). Curcumin ist bekannt dafür, dass es Entzündungsreaktionen positiv beeinflusst, indem es die Herunterregulierung von Entzündungs-Transkriptionsfaktoren bewirkt (Aggarwal und Sung 2009). Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass Curcumin im ER (endoplasmatisches Retikulum) befindliche MPZ (Myelin-Protein Zero) - Mutantenproteine in das Zytoplasma freilässt und somit die Anzahl apoptotischer Zellen verringert. Mutationen des MPZ, Hauptbestandteil des peripheren Myelins, verursachen die CMT1b- Neuropathie. Die mutierten Nonsense-Proteine akkumulieren intrazellulär primär im ER und verursachen die Apoptose. Curcumin entlässt die im ER befindlichen MPZ-Mutanten an die Plasmamembran und verringert somit den apoptotischen Effekt und vermag dadurch einen therapeutischen Effekt auf bestimmte Formen der peripheren Neuropathien zu haben (Khajavi et al. 2005).

Die Bioverfügbarkeit scheint, belegt durch niedrige Serumlevels von purem Curcumin, eher gering zu sein. Das geringe Serumlevel geht aber mit einer pharmakologischen Sicherheit einher, da über 12 g pro Tag toleriert werden (Lao et al. 2006) und auch sonst keine negativen Effekte bei längerer Einnahme zu verzeichnen sind (Burns et al. 2009).

Curcumin gehört zu den Phenolen, die in Wasser und Fetten schwer löslich sind.

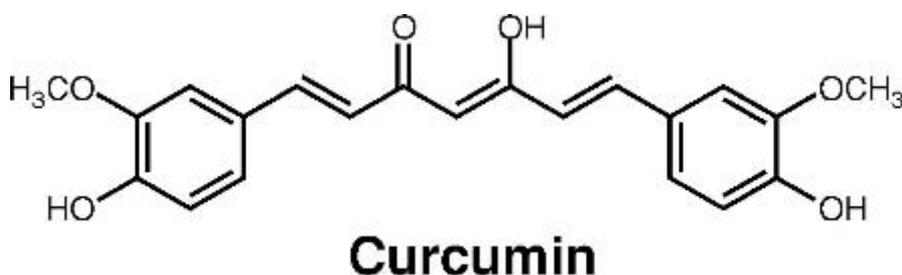


Abbildung 4: Struktur des Curcumins.

Aus „The Indian Solid Gold“ (adaptiert von Aggarwal et al. 2007, S.5).

Phenole zeigen eine hohe Affinität zu biologischen Membranen und können -mit Phospholipiden gekoppelt- in eine Lipidmatrix eingekapselt werden. Diese schützt vor hydrolytischer Degeneration. Gleichzeitig kann der schnelle Austausch von Phospholipiden zwischen biologischen Membranen ausgenutzt werden und eine höhere Aufnahme in die Zelle bewirken.

Dieses Prinzip der Phytosome wird genutzt, um die Bioverfügbarkeit von Curcumin zu verbessern (Belcaro et al. 2010a; Kidd 2009; Semalty et al. 2010).

Es konnte gezeigt werden, dass Curcumin in Verbindung mit einem Phosphatidylcholin-Carrier eine 29-fach höhere Plasmakonzentration aufweist als pur eingenommenes Curcumin (Cuomo et al. 2011) und somit systemisch in höherer Konzentration vorliegt (Marczylo et al. 2007).

Auch in anderen Teilbereichen der Medizin wurde mit Meriva® geforscht, und es konnten positive Ergebnisse bei beispielsweise Arthrose (Belcaro et al. 2010b), Mikroangiopathien und Retinopathien bei Diabetikern (Steigerwalt et al. 2012) gezeigt werden.

Verschiedene Studien lassen vermuten, dass Curcumin missgefalteten Proteinen im ER zur Verschmelzung mit der Plasmamembran verhilft (Khajavi et al. 2005). Dadurch kann die Toxizität durch die akkumulierten mutierten Proteine vermindert werden, die für die Schwanzzellmyelinisierung kritisch ist (Naef und Suter 1999; Colby et al. 2000). Auch aus dem Bereich der hereditären Neuropathien gibt es Studien mit Curcumin. Diese zeigen u.a. bei Trembler-Mäusen, die eine *PMP22*-Missense-Mutation aufweisen, eine verringerte Apoptoseneigung der Schwanzzellen sowie eine steigende Anzahl und Vergrößerung von myelinisierten Axonen

im *Nervus ischiadicus*. Dies führt zu verbesserten motorischen und histologischen Ergebnissen (Khajavi et al. 2007).

Das zusätzlich im Meriva®-Pulver enthaltene Phosphatidylcholin gehört zu den Phospholipiden und wird auch Lecithin genannt. Phospholipide sind wichtige Bestandteile biologischer Membranen sowie des Myelins und intrazellulärer Signalmoleküle. Gleichzeitig sind sie Bestandteil des *Surfactant* der Lunge und der Gallenflüssigkeit. Das Glycerin bildet die Grundstruktur der Phospholipide und somit auch des Phosphatidylcholins. Ort der Phosphatidylcholin-Biosynthese ist das ER (Horn 2012; Lüllmann-Rauch 2012).

1.5 Cholesterol

Cholesterol ist ein Steroid und wichtiger Bestandteil des Körpers. Es wird in Zellmembranen eingebaut, zu Gallensäuren umgebaut und ist nötig für die Biosynthese von Steroidhormonen und herzwirksamer Glykoside.

Es ist aufgebaut aus Kohlenstoff, Wasserstoff und Sauerstoff nach der Summenformel $C_{27}H_{46}O$. Es besitzt eine hydrophile OH-Gruppe und einen apolaren Rest. Die Biosynthese des Cholesterols endet am ER, wo auch die Zellmembran synthetisiert wird. Cholesterol kann sowohl vom Körper synthetisiert als auch über die Nahrung aufgenommen werden und unterliegt dem Prinzip der Feedback-Regulation (Horn 2012).

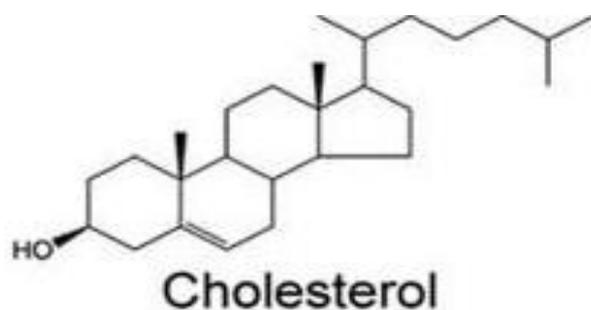


Abbildung 5: Chemische Struktur von Cholesterol

Aus: „Direct Regulation of Prokaryotic Kir Channel by Cholesterol“ (adaptiert von Singh et al. 2009, S.5)

Cholesterol ist wie auch die Phospholipide und Glykolipide Bestandteil des Myelins (Lüllmann-Rauch 2012; Saher et al. 2005).

Verschiedene Arbeitsgruppen haben mit Cholesterol gearbeitet, wenn es um degenerative Myelinisierungserkrankungen geht, beispielsweise bezüglich Demyelinisierungen der Oligodendrozyten im ZNS bei der Pelizaeus-Merzbacher-Erkrankung. Hier wurde durch eine erhöhte Cholesterolaufnahme der Myelingeht gesteigert, Entzündungen reduziert und motorische Verbesserungen erzielt (Saher et al. 2012). Experimente mit Mausmutanten mit geringer eigener Cholesterolsynthese haben gezeigt, dass Schwannzellen in der Lage sind, Cholesterol aus der Umgebung aufzunehmen und in Myelinmembranen einzubauen. Gleichzeitig ist die Transkription von Myelinproteinen an das intrazelluläre Cholesterol-Level gekoppelt. Auch eine Veränderung des Lipid-Protein-Mengenverhältnisses führt zu Veränderungen der peripheren Myelinmembranen, da der MPZ-Transport vom ER zur Membran an das Vorhandensein von Cholesterol gekoppelt ist (Saher et al. 2011; Saher et al. 2009).

Zudem begünstigt Cholesterol die Schwannzell-Differenzierung (Saher et al. 2009) und ist ein nicht verzichtbarer Bestandteil von Myelinmembranen (Saher et al. 2005).

1.6 Tiermodell der CMT1a

Tiermodelle können entscheidend bei der Untersuchung verschiedener Krankheiten am Menschen beitragen.

Um die CMT1a-Erkrankung besser untersuchen zu können, wurden Mäuse (Huxley et al. 1996) und Ratten (Sereda et al. 1996) gentechnisch so manipuliert, dass auch sie eine *Pmp22*-Überexpression aufweisen (CMT-transgene Ratten).

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Doktorarbeit ist es, die Auswirkungen von Curcumin und Cholesterol auf den Phänotyp der CMT-transgenen Ratten zu untersuchen. In der Vergangenheit haben Experimente bereits einen positiven Effekt der beiden Substanzen hinsichtlich neuro-degenerativer Erkrankungen gezeigt.

Cholesterol als Bestandteil des Myelins und anderer Membranen könnte der Demyelinisierung entgegenwirken (Saher et al. 2005, 2012).

Das antiinflammatorisch wirkende Curcumin soll evtl. beteiligte Entzündungsprozesse günstig beeinflussen und wie bei Khajavi et al. 2007 bereits gezeigt, die mutations-akkumulationsinduzierte Apoptose der Schwanzzellen verhindern. Auch bei Versuchen mit CMT1b-Mäusen zeigte Curcumin einen günstigen Effekt auf die Schwanzzellproliferation (Patzkó et al. 2012). Pures Curcumin jedoch weist nur eine geringe Serumkonzentration auf, wohingegen es gekoppelt an einen Phospholipidcarrier eine höhere Bioverfügbarkeit erreicht (Belcaro et al. 2010a; Kidd 2009). Weiterhin sollen diverse Gewebeproben gewonnen werden um auch histologische Untersuchungen in der Zukunft zu ermöglichen. Weitere Hinweise und Erkenntnisse zum Pathomechanismus und eventuelle Heilungsansätze sollen dadurch gewonnen werden.

1.8 Tiere

1.8.1 Rattenzucht

Die Versuchstiere stammen aus der Rattenzucht CMT-Ratte (Sprague-Dawley) des Max-Planck-Instituts für Experimentelle Medizin in Göttingen, die als CMT1a-Tiermodell von M. Sereda (Sereda et al. 1996) charakterisiert worden ist. Verpaart wurden Wildtypen und heterozygot transgene Tiere, wobei nur männliche Tiere verwendet wurden.

Die Genotypisierung erfolgte durch die PCR aus DNA der Schwanz- und Ohrgebebiopsien.

1.8.2 Haltung der Versuchstiere

Die 72 Versuchstiere wurden unter standardisierten Bedingungen im Tierhaus des MPI für Experimentelle Medizin, Göttingen, entsprechend den Empfehlungen der deutschen Gesellschaft für Versuchstierkunde in Gruppen gehalten. An jedem Käfig war eine Karte mit Tiercodenummer, Geburtsdatum, Geschlecht und Elterntiernummer befestigt.

1.8.3 Die Identifizierung der Tiere

Zur Identifizierung der Ratten wurden Ohrkodierungen an p(postnatal)21 vorgenommen. Die letzten beiden Ziffern eines siebenstelligen Codes wurden nach folgendem Schema in beide Ohrmuscheln gelocht:

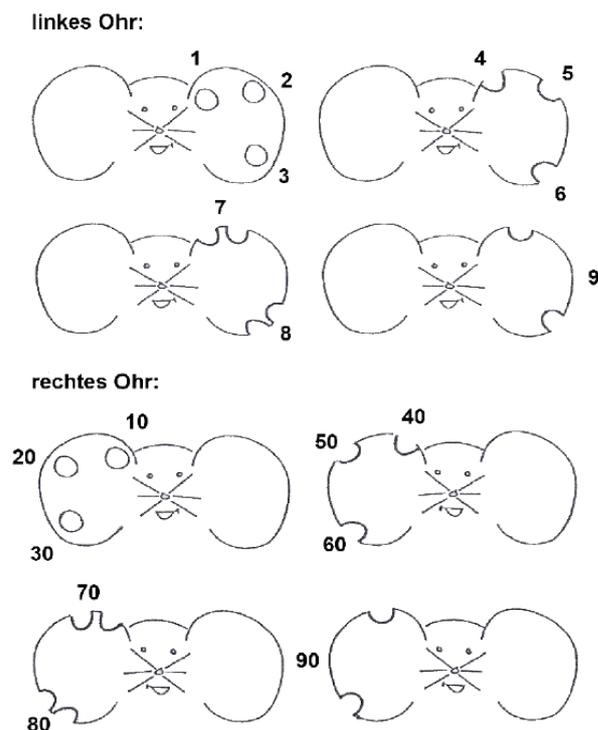


Abbildung 6: Ohrlochcode der Ratten

Aus den Löchern im linken Ohr ergibt sich die Einerstelle und aus den Löchern des rechten Ohrs die Zehnerstelle. Zur vollständigen Zuordnung zum Ausgangscode muss zudem die Käfignummer bekannt sein.

1.8.4 Genotypisierung der Tiere

An p21 wurden eine Ohrkodierungshautbiopsie und auch eine Schwanzprobe für die Genotypisierung entnommen.

Diese wurde bei -20 °C gelagert, und mittels einer PCR wurden Wildtypen und transgene Tiere unterschieden.

1.8.5 Therapieverlauf

An p21 wurden alle geworfenen transgenen Tiere mittels Griffstärke-Test stratifiziert und ihren Therapiegruppen zugeordnet. Die Gruppenzuordnung erfolgte durch eine dritte Person (T. Prukop), um die Verblindung der Studienuntersucherin zu gewährleisten. Die Käfige wurden mit einem Verblindungsschlüssel versehen, um eine Erkennung der Tiere im Studienverlauf auszuschließen. Die zu untersuchenden Tiere wurden jeweils am Versuchstag von der Tierpflegerin des Tierhauses bereitgestellt.

Als Therapiesubstanzen wurden dem regulären Futter von Ssniff (RZ, 15 mm) Cholesterol (5 %) und Meriva® (0.1 %) beigemischt. Zudem liefen eine Placebogruppe (tg) und eine Wildtypiergruppe mit regulärem Futter zum Vergleich mit. Das Therapiefutter wurde eingefärbt, um ein Vertauschen auszuschließen. Das Futter wurde jeweils rechtzeitig entfernt, bevor die Untersucherin die Tiere sah.

Bis auf die WT-Gruppe mit zwölf Tieren beinhalten die Therapiegruppen 15 Tiere. Das Aktenzeichen des Tierschutzantrages lautet: 33.9-42502-04-11/0601. Die Antragsnummer ist die 29. Aufgrund von Tod durch zu tiefe Inhalationsnarkose oder Verwechslung der Tiere mussten fünf Tiere bei den Versuchsauswertungen vernachlässigt werden.

Zu den Zeitpunkten p26, p71, p91 und p112 wurden die Muskelmessungen an Vorder- und Hinterläufen gemessen. An p112 wurde zusätzlich nach der Muskelmessung noch der Hotplate-Test durchgeführt.

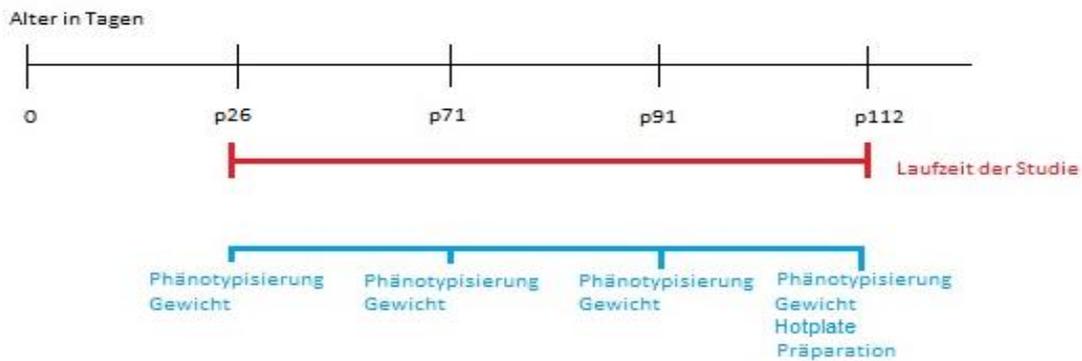


Abbildung 7: Schematischer Studienverlauf

Die Tiere wurden ab p26 bis p112 mit Meriva-Curcumin (0,1 %), Cholesterol (5 %) oder normalem Futter gefüttert. Alle drei Wochen wurden das Gewicht und die Griffstärke gemessen. An p112 wurde zusätzlich der Hotplate-Test durchgeführt, um die sensorische Leitfähigkeit zu erfassen. Anschließend erfolgte die Präparation der Tiere, um biologisches Material für weitere Analysen zu gewinnen.

1.8.6 Phänotypisierung der Tiere

Um den Ausprägungsgrad der Krankheit der Tiere im Therapieverlauf zu messen und zu beurteilen, wurden zu vier Untersuchungszeitpunkten Muskelmessungen mittels Griffstärke-Test an Vorder- und Hinterläufen durchgeführt.

Der Untersuchungszeitpunkt lag immer zwischen 5.30 Uhr und 7.00 Uhr und wurde immer von derselben Person, geblindet hinsichtlich der Behandlung und des Genotyps, durchgeführt. Das Gerät misst in Newton und es wurde von der internen Werkstatt des MPI für Experimentelle Medizin in Göttingen gebaut und geeicht. An jedem Untersuchungszeitpunkt wurden pro Extremität fünf Messungen durchgeführt und ein Mittelwert berechnet. Die Tiere wurden dabei am Schwanz festgehalten. Die Messung erfolgte unter Zug (Vorderläufe) bzw. Druck (Hinterläufe) bis zum Loslassen der Tiere von der Messstange. Die Messstange war an ein Newtonmessgerät angeschlossen, das die Maximalkraft digital aufzeichnete.

Die Methode geht auf den etablierten Stangentest für Phänotypisierung zurück (Meyer et al. 1979).



Abbildung 8: Phänotypisierung der Ratten

Messung der Vorderläufergriffstärke in Newton mit Hilfe einer Apparatur aus der hauseigenen Werkstatt des MPI. Es wurden jeweils sieben Mal die Griffstärke der Vorder- und Hinterläufe in N gemessen, wobei der jeweils höchste und niedrigste Wert nicht berücksichtigt wurden und ein Mittelwert errechnet wurde.

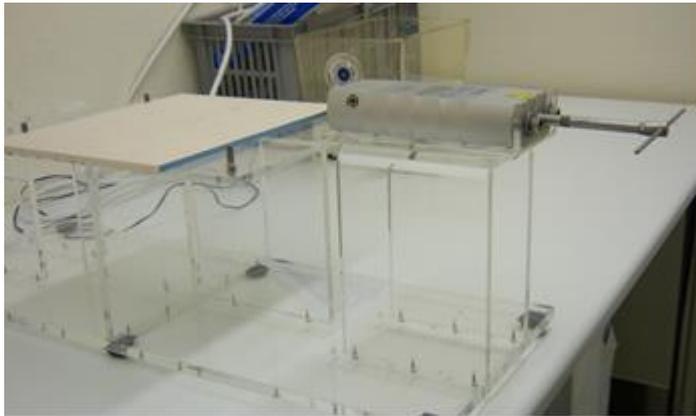


Abbildung 9: Gerät zur Messung der Griffstärke

Die Apparatur aus der Hauswerkstatt des MPI umfasst eine Haltestange, verbunden mit einem Newtonmessgerät. Die Tiere halten sich reflexartig an der Stange fest, sobald sie diese zu fassen kriegen und werden bis zum Loslassen am Schwanz gezogen. So wird die Maximalkraft der Griffstärke erfasst.

1.8.7 Hotplate-Test

Am Tag der Präparation wurde nach der Phänotypisierung ein Hotplate-Test durchgeführt. Die Messung erfolgte geblendet hinsichtlich Genotyp und Behandlung.

Der Hotplate-Test soll die sensible Nervenleitfähigkeit erfassen, die Rückschlüsse auf den Myelinisierungsgrad zulässt. Dafür wird eine Heizplatte auf 58 °C vorgewärmt und ein Glaskasten darüber gestellt.



Abbildung 10: Heizplatte für den Hotplate-Test

Die Heizplatte wird auf 58 °C erwärmt und unter eine Plexiglasvorrichtung gestellt, sodass die Tiere keine Möglichkeit haben die Platte zu verlassen. Sobald die Läufer Kontakt mit der Platte haben wird die Zeit in Sekunden erfasst bis das Ablecken oder Anheben der Läufer zu sehen ist. Danach wurde das Tier sofort von der Platte entfernt.

Erfasst werden jedoch eher die kleinen sensorischen Axone und nicht die großen motorischen Axone, die vor allem bei der CMT1a betroffen sind.

Jedes Tier wird einzeln am Schwanz gefasst und auf die Platte gesetzt.

Sobald die Tiere die Erwärmung spüren, antworten sie mit dem Ablecken oder Anheben der Vorder- oder Hinterläufe.

Die Zeit vom ersten Kontakt zur heißen Platte bis zum Ablecken der Läufe wurde für jede Ratte einzeln erfasst und in Sekunden notiert, danach wurde die Ratte sofort von der warmen Platte entfernt.

1.8.8 Elektrophysiologische Messungen

Die elektrophysiologischen Messungen wurden von Dr. rer. nat. Robert Fledrich (PNS-Arbeitsgruppe, MPI für Experimentelle Medizin, Göttingen) geblindet hinsichtlich der Gruppenzuordnung der Tiere, durchgeführt. Die Tiere wurden zuvor mittels Inhalationsnarkose mit Isofluran und einer Injektionslösung sediert. Die narkotisierende und analgesierende Injektionslösung bestand aus Rompun® 2 % und Ketanest® 10 % im Verhältnis 1:3. Jedes Tier bekam 0,4 ml i. p. appliziert. Mittels Jaeger-Toennis Neuroscreen wurden die Nervenleitgeschwindigkeit und Muskelsummenaktionspotenziale am Schwanz der Ratten gemessen. Die Nervenleitgeschwindigkeit wurde durch zwei Reizungen im Abstand von 2 cm am proximalen Schwanzende durchgeführt und von einer Elektrode erfasst und vom Messgerät automatisch berechnet. Durch elektrische Reizung der Schwanznerven für 0,1 Millisekunden wurden die Muskelsummenaktionspotenziale ausgelöst und durch subkutane Elektroden abgeleitet. Die Amplitude zwischen dem minimalen und maximalen Ausschlag wurde gemessen.

1.8.9 Präparation der Tiere

Die Versuchstiere wurden an p112 durch Kohlenstoffdioxid-Zufuhr getötet so, wie es das niedersächsische Tierschutzgesetz vorschreibt.

Anschließend wurden den Ratten folgende Gewebeproben entnommen:

Nervus tibialis, Nervus ischiadicus, Musculus tibialis cranialis, Plexus brachialis,
Haut vom Schwanz und den Vorderläufen.

1.8.10 Messung der Muskelmasse

Im Zuge der Präparation wurde der *Musculus tibialis cranialis* jeder Ratte entnommen, von subcutanem Fettgewebe und Haut entfernt und in 4 % PFA (Paraformaldehyd) eingelegt. Nach zehn Tagen Lagerung wurde jeder Muskel einzeln auf einer Feinwaage gewogen und der Wert notiert. Eventuelle Unterschiede sollten das Ausmaß der Muskelatrophie quantifizieren.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Verbrauchsmaterialien

Alle nicht näher gekennzeichneten laborüblichen Materialien wurden von den Herstellern Roche, Falcon, Merck, Sigma-Aldrich und Eppendorf bezogen. Alle weiteren Produkte und ihre Hersteller sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
Abdeckfolie für PCR-Platten	Roth, Karlsruhe
CO ₂ -Gas	Messer-Griesheim, Krefeld
Einmalhandschuhe	Hartmann, Heidenheim
Elektrophysiologiegerät Jaeger-Toennis Neuroscreen	Jaeger-Toennis, Würzburg
Kosmetiktücher	wepa, Germany
OP-Vlies-Mundschutz	Medical care and serve, Hamburg
Parafilm	Pechiney Plastic Packing, Menasha, WI, USA
PCR-Mikrotiterplatten (96-well)	Applied Biosystems, USA
PCR-Plattenfolie „Air Pore Sheet“	ABgene, Surrey, UK
Pipettenspitzen	Molecular Bioproducts, San Diego, CA, USA
Präparationsbesteck	Fine Science Tools, Heidelberg
Rattenstandarddiät ssniff R/Z V1325-0	ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest
Stickstoff, flüssig	Messer-Griesheim, Krefeld
Trockeneis	Messer-Griesheim, Krefeld

2.1.2 Chemikalien und Substanzen

Es wurden die in Tabelle 2 aufgeführten Chemikalien und Substanzen verwendet.

Tabelle 2: Chemikalien und Substanzen

Produkt	Hersteller
Agarose	AppliChem, Darmstadt
Cholesterol	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Curcumin (Meriva®)	Indena, Mailand, Italien
DNeasy 96 Kit für DNA-Isolation	Qiagen, Hilden
Ethanol	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck, Darmstadt
Isofluran	Actavis
Ketamin (Ketanest®)	Parke-Davis, Berlin
Taq-DNA-Polymerase (5 U/µl)	Boehringer, Mannheim
Taq-Polymerase Puffer	Promega, Mannheim
Trihydroxymethyl-aminomethan (TRIS)	Roth, Karlsruhe
Xylazin (Rompun®)	Bayer, Leverkusen

2.1.3 Geräte

Es wurden die in Tabelle 3 aufgeführten Geräte verwendet.

Tabelle 3: Geräte

Produkt	Hersteller
Agarosegeldokumentation „ImageMaster VDS“	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Agarosegelkammern mit Kämmen	Hauswerkstatt MPI für Exp. Medizin
Concentrator 5301	Eppendorf, Germany
Elektrophoresis constant power supply	Pharmacia Fine Chemicals
Feinwaage (digital)	Sartorius, Göttingen
Gefrierschrank (-20 °C)	Liebherr, Ochsenhausen
Gefrierschrank (-85 °C) Ultra Low Freezer	New Brunswick Scientific, Nürtingen
Glaswaren	Schott, Mainz
Handkraftmessgerätstativ	Hauswerkstatt MPI für Exp. Medizin
Kühlschrank (4 °C)	Liebherr, Ochsenhausen
Kühlzentrifuge Sigma Laborzentrifugen	Osterode/Harz
Mikrowellengerät	AEG, Frankfurt a.M.
Newtonmeter Erichsen Typ 708	Erichsen, Wuppertal
PCR-Thermocycler	Biometra, Göttingen
PCR-Versiegler	4titude Ltd., Berlin
Pipetten (2/10/100/200/1000 µl)	Gilson, Middleton, WI, USA
Spannungsgeräte Elektrophorese Amersham	Pharmacia Biotech, Freiburg
Stangentestmessgerät	Hauswerkstatt MPI für Exp. Medizin
Tierkäfige Ratten	Tecniplast, Hohenpeißenberg
Wärmeschüttler Titramax 1000	Heidolph, Schwabach
Zentrifuge	Eppendorf, Germany

2.1.4 Nukleinsäuren

Es wurden die in Tabelle 4 aufgeführten Nukleinsäuren verwendet.

Tabelle 4: Nukleinsäuren

Produkt	Hersteller
Desoxyribonukleosid-Triphosphate (dNTPs)	Boehringer, Mannheim
DNA-Größenmarker Fermentas	St. Leon-Roth
Randomisierte Nonamerprimer F	Benseler, MPI für Exp. Med.

2.1.5 Primer

Primer zur Genotypisierung transgener Ratten:

pmp22 Fwd: 5'-CCAGAAAGCCAGGGAACTC-3'

pmp22 Rev: 5'-GACAAACCCCAGACAGTTG-3'

2.1.6 Puffer und Lösungen

Fixans für Licht- und Elektronenmikroskopie nach Karlsson und Schultz (Schultz und Karlsson 1965):

Es werden 0,36 g Natriumdihydrogenphosphat H_2O und 3,1 g Dinatriumhydrogenphosphat $\cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ mit 1 g Natriumchlorid mit aqua dest. auf 100 ml aufgefüllt. 20 ml Glutardialdehydlösung zum Phosphatpuffer hinzugeben.

8 g Paraformaldehyd in 60 ml aqua dest. lösen und unter Rühren auf 60 – 70 °C erhitzen. Anschließend mit aqua dest. auf 80 ml auffüllen. Tröpfchenweise 1 M NaOH zugeben, bis die Lösung klar wird. Lösung steril filtrieren und mit 1 M HCl pH 7,4 einstellen. Zum Phosphatpuffer geben.

Kunstharzmischung Epon (Luft 1961):

Für die Epon-Lösung A werden 67,5 g Glycidether und 88,2 g DDSA eine Stunde mit dem Magnetrührer verrührt. Für die Epon-Lösung B werden 82,3 g Glycidether und 73,3 g MNA für eine Stunde mit dem Magnetrührer verrührt. Für die fertige Epon-Gebrauchslösung werden Epon-Lösung A und B im Verhältnis 1:1 gemischt und 1,8 % DMP30 dazugeben.

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

Für die Methylenblau-Lösung werden 1 % Methylenblau in 1 % wässriger Boraxlösung gelöst. Für Azur-II-Lösung werden 1 % Azur II in aqua dest. gelöst. Beide Lösungen im Verhältnis 1:1 mischen.

TAE-Puffer (50x, 1000ml):

Es werden 242 g Tris-HCl Base mit 57,1 ml Essigsäure 100 % und 100 ml EDTA (0,5 M; pH 8) gemischt und mit aqua dest. auf 1000 ml aufgefüllt.

Paraformaldehyd, 4 % (PFA) in PBS:

40 g PFA-Pulver mit 500 ml ddH₂O auffüllen. Für 15 min auf 60 °C erhitzen, anschließend bis zum Aufklaren der Lösung tropfenweise 1 M NaOH hinzugeben. Steril filtrieren, den pH-Wert auf 7,4 einstellen und 500 ml 0,2 M Phosphatpuffer hinzugeben.

PBS 10x:

100 g NaCl, 2,5 g KCl, 7,2 g Na₂HPO₄ · H₂O und 2,5 g KH₂PO₄ · 2 H₂O in 900 ml ddH₂O lösen. Mit 1 M NaOH auf pH-Wert 7,2 einstellen.

2.1.7 Computersoftware

Excel 2010 Microsoft

Graphpad

Image J

Statistika StatSoft Europe, Hamburg

Word 2010 Microsoft

Mendeley

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 DNA-Isolierung aus Schwanzhautproben zur Genotypisierung

Um die Tiere zu re-genotypisieren, wurde bei der Präparation eine Schwanzprobe entnommen und bei -20 °C gelagert. Die DNA-Isolierung wurde mit dem Kit „Nexttect DNA-Prep“ durchgeführt.

1. Pro Schwanzprobe benötigt man 300 µl Lysis-Puffer, der laut Kit aus G1 (265 µl), G2 (10 µl) und G3 (25 µl) Puffer bestehen soll. Mit einer Eppendorfer Multistepper und 5-ml-Combitips werden je 300 µl in die Tubes mit den Schwanzproben überführt. Die Tubeöffnungen werden mittels Parafilm verschlossen und bei 1100 rpm und 62 °C ca. 30 min auf den Wärmeschüttler Titramax gestellt. Danach sollten die Schwanzproben aufgelöst sein. Die anschließende Zentrifugation (1 min, 750 G) diente der Sedimentation der Zellfragmente.
2. Nun sollte die DNA aus dem Lysat gefiltert werden. Dies geschieht durch Auftragen von 350 µl Präparationspuffer auf jedes Well einer Clean-Plate aus dem Kit. Nach 5 min Inkubationszeit bei Raumtemperatur wird die Clean-Plate ca. 1 min bei 350 G zentrifugiert, um die überschüssige Flüssigkeit der Säulen zu entfernen.
3. Die Clean-Plate wird nun auf neu beschriftete Tubes gestellt. 120 µl von dem Zellverdau-Lysat werden nun auf die vorbereitete Cleanplate mit dem Präparationspuffer gegeben, die nur die DNA durchlaufen lässt und andere Zellbestandteile auffängt. Durch das Zentrifugieren für 1 min bei 700 G wird dieser Vorgang beschleunigt. Die isolierte DNA kann bei 4 °C gelagert werden.

2.2.2 PCR zur Genotypisierung

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine standardisierte Methode zum Amplifizieren bestimmter Genabschnitte *in vitro*, die mittels Primer gefunden werden. Diese Methode geht auf Mullis (Mullis et al. 1992) zurück. Durch diese Methode sollen transgene Tiere von Wildtypen unterschieden werden, da die transgenen Tiere eine zusätzliche *PMP22*-Gen-Kopie aufweisen. Um diese Genkopie zu vervielfältigen, wurden die *pmp22*-spezifischen Primer 2201 und 2202 verwendet.

Für den Mix der CPMP-PCR wurde nach folgendem Protokoll gearbeitet:

Für 100 Proben werden folgende Substanzen benötigt:

- 1290 µl ddH₂O
- 400 µl Puffer 5x
- 100 µl dNTPs
- 100 µl Primer 2201 (5 pmol/µl)
- 100 µl Primer 2202 (5 pmol/µl)
- 10 µl GoTaq

Diese werden in einem 2-ml-Eppendorfgefäß gemischt und 20 µl davon in eine PCR-Platte pipettiert. Mit einer 8er-Multipipette wird von dem DNA-Lysat 1 µl dazu gegeben. Die Platte wird mit Folie zugeschweißt und 30 s zentrifugiert, um sicherzugehen, dass der 1 µl wirklich den PCR-Ansatz erreicht. In der PCR-Maschine „Thermocycler“ (Biometra) wird das entsprechende Programm „CPMP“ eingestellt und folgende Schritte werden durchlaufen:

1. 95 °C 3 min
2. 56 °C 45 s
3. 72 °C 1 min
4. 95 °C 30 s
5. 56 °C 1 min
6. 72 °C 10 s
7. 4 °C

Die Schritte 1. bis 4. werden 32 Mal wiederholt, bevor die Schritte 5 bis 7 durchlaufen werden.

Im ersten Schritt wird die DNA-Doppelhelix bei 95 °C in Einzelstränge getrennt. Bei 56 °C lagern sich die Primer an ihre spezifische Basensequenz und fungieren als Anlagerungsort für die dNTPs. Die verwendete GoTaq-Polymerase aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* hat ihr Temperaturoptimum bei 72 °C und verbindet die dNTPs zu einem neuen DNA-Abschnitt. Diese Schritte werden 32 Mal wiederholt, sodass letztlich genug DNA vorliegt, um in der Gelelektrophorese sichtbar gemacht werden zu können.

2.2.3 Agarosegel-Elektrophorese

Die in der PCR amplifizierte DNA kann nun ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Dazu benötigt man ein 1,5 %-Agarosegel aus 350 ml 1x TAE-Puffer (TRIS-Acetat-EDTA-Puffer), 5,2 g Agarose-Pulver und 35 µl Ethidiumbromid.

Das Pulver wird mit dem Puffer vermischt und in der Mikrowelle für ca. 4 min gekocht, bis es klar wird und sich gelöst hat. Dann wird das Ethidiumbromid hinzugegeben und eine Platte mit 3 x 28 Kämmen damit befüllt. Die abgekühlte, fertige Platte wird in ein Bad aus 1x TAE-Puffer gelegt und an 2 Elektroden angeschlossen. 100 bp-Größenmarker (8 µl) und die DNA-Proben (20 µl) werden in die Kammern pipettiert.

Der Strom von 120 V wird angestellt, sobald sich Marker und DNA-Proben in den Kammern befinden. Nach 20 min kann man die Ergebnisse unter der UV-Lampe sehen, da das Ethidiumbromid in die DNA interkaliert und diese fluoreszieren lässt. Das amplifizierte Gen soll eine Bande bei 501 bp bilden, die anhand des Markers überprüfbar ist. Bei Wildtypen fehlt diese Bande.

Die Gele werden unter der Kamera „ImageMaster VDS“ (Amersham Pharmacia Biotech) abfotografiert (siehe Abb.11).

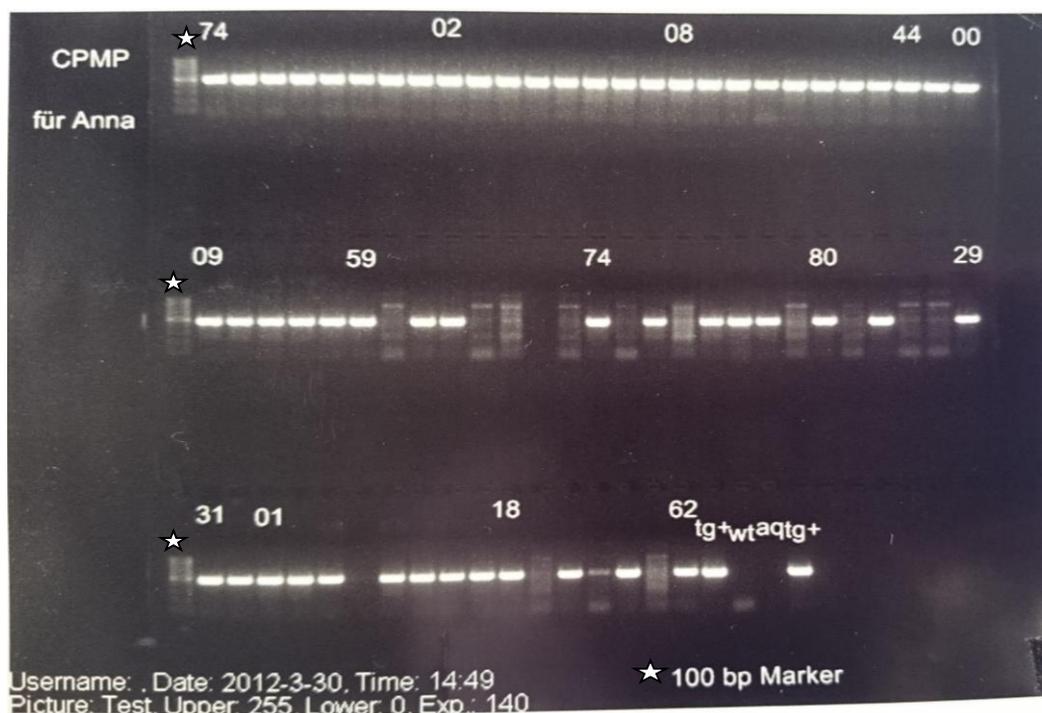


Abbildung 11: Ergebnisse bei der Agarose-Gelelektrophorese.

Die jeweils erste Kammer (mit dem Stern markiert) enthält den 100-bp-Marker. Die Zahlen sind als Orientierungshilfe der Tierlisten in regelmäßigen Abständen eingefügt. Die DNA der transgenen Tiere fluoresziert deutlich. Die Kontrollen tg, Wt, aqua dest., tg sind unten rechts.

2.3 Histologische Methoden

2.3.1 Präparation peripherer Nerven

Die Ratten wurden, wie vom Tierschutzgesetz vorgeschrieben mit Kohlenstoffdioxid-Begasung getötet und anschließend durch die Doktorandin und eine weitere Mitarbeiterin des Instituts präpariert. Es wurden unter anderem der *Nervus tibialis*, *Nervus ischiadicus*, *Plexus brachialis* sowie Hautbiopsien von Schwanz und Vorderläufen und der gesamte *Musculus tibialis cranialis* entnommen. Die Nerven wurden mittig quer geteilt und an den Enden durch 45°-Winkelschnitte kenntlich gemacht. Für die histologische Untersuchung wurden die Nerventeile in phosphatgepuffertem Glutaraldehyd nach Karlsson und Schultz (Schultz und Karlsson 1965) eingelegt. Die Proteine werden durch dieses Fixans fester und irreversibel fixiert, indem die Lösung mit den beiden aktiven Enden sich selbst und die akti-

ven Endgruppen der Aminosäuren der Proteine bindet. Die Proben wurden bei 4°C gelagert.

2.3.2 Einbettung in Kunstharz

Die Einbettung der Nerven in Kunstharz erfolgte nach dem Protokoll von Luft (Luft 1961). Die Nerventeile wurden in die entsprechenden Behälter für die Einbettmaschine eingelegt, mit Osmiumtetroxid fixiert und mit aufsteigender Ethanolkonzentration dehydriert. Danach folgt eine schrittweise Auswaschung durch Propylenoxid und im letzten Schritt ein Überzug mit Epon.

Die Einbettmaschine „Lynx el“ vollzieht all diese Schritte automatisch. Im Anschluss werden die Proben 24 h bei 60 °C in einem Trockenofen zur Polymerisation des Epons aufbewahrt.

Reagenz	Dauer	Temperatur
Puffer	15 min	4 °C
2 % OsO ₄	4 h	4 °C
Aqua dest.	20 min	Raumtemperatur
Aqua dest.	20 min	Raumtemperatur
Aqua dest.	20 min	Raumtemperatur
30 % Ethanol	30 min	Raumtemperatur
50 % Ethanol	30 min	Raumtemperatur
70 % Ethanol	30 min	Raumtemperatur
90 % Ethanol	30 min	Raumtemperatur
100 % Ethanol	30 min	Raumtemperatur
100 % Ethanol	15 min	Raumtemperatur
100 % Ethanol	15 min	Raumtemperatur
100 % Ethanol	15 min	Raumtemperatur
100 % Ethanol	15 min	Raumtemperatur
Propylenoxid	15 min	Raumtemperatur
Propylenoxid	15 min	Raumtemperatur
Propylenoxid	15 min	Raumtemperatur
Propylenoxid/Epon 2:1	2 h	Raumtemperatur
Propylenoxid/Epon 1:1	2 h	Raumtemperatur
Propylenoxid/Epon 1:2	4 h	Raumtemperatur
Epon (rein)	4 h	Raumtemperatur

2.3.3 Mikrotomie: Herstellung von Semidünnschnitten

Die fertigen Eponblöcke wurden getrimmt und am Ultramikrotom (Ultracut S) geschnitten. Die Schnittdicke betrug 0,5 μm . Die fertigen Schnitte wurden mit Hilfe eines Wassertropfens und einer Glaskugel auf Objektträger überführt und getrocknet. Danach wurden die Schnitte mittels einer Methylen-Azur-II-Lösung nach dem Protokoll von Richardson (Richardson et al. 1960) gefärbt. Nach der Trocknung für 30-60 min bei 60 °C auf einer Heizplatte wurden die Schnitte auf dem Objektträger mit Kleber und Deckglas konserviert.

2.3.4 Lichtmikroskopie

Die Bilder wurden hauptsächlich von einem Mitarbeiter des Max-Planck-Instituts angefertigt und befinden sich derzeit in der internen Auswertung der Arbeitsgruppe. Begonnen wurde mit der Anfertigung der Aufnahmen am Lichtmikroskop (Leica) mit einer Digitalkamera (Kappa). Auf eine Übersichtsaufnahme bei 20-facher Vergrößerung folgten Bilder in 100-facher Vergrößerung, die mittels Bildbearbeitung (Image J, Photoshop, Illustrator) zusammengefügt wurden. Die Quantifizierung und weitere Aufnahmen erfolgten durch den Doktoranden L. Rasch in der Arbeitsgruppe.

Eine repräsentative Auswahl der Bilder wurde getroffen (siehe Abb.12).

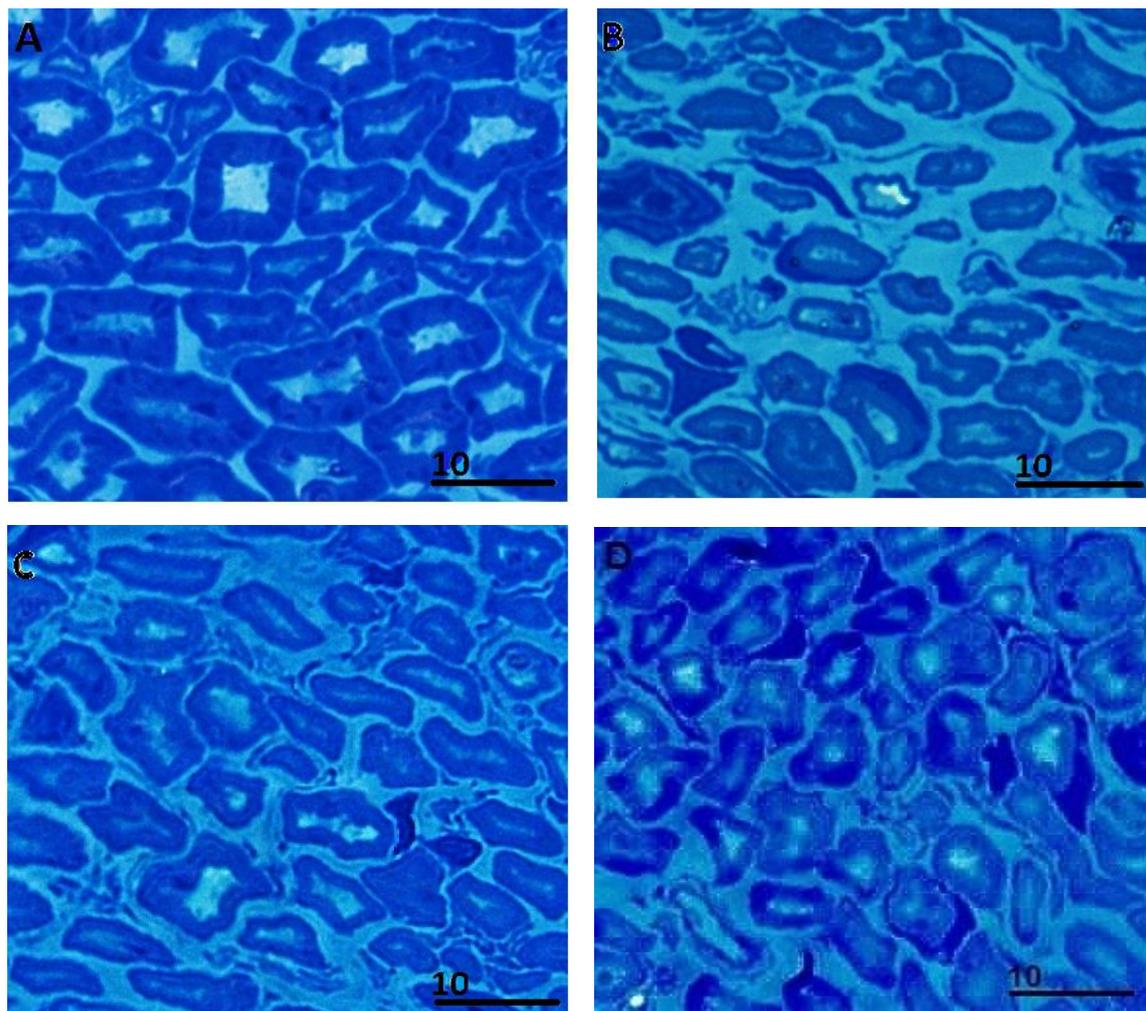


Abbildung 12: Lichtmikroskopische Aufnahmen des *Nervus tibialis cranialis*

Am Ende der Therapie (p112) in 100-facher Vergrößerung von (A) Wildtyp, (B) Placebo, (C) Cholesterol und (D) Meriva-Curcumin. Der Maßstab entspricht 10 µm. Die Bilder sind in Zusammenarbeit mit L. Rasch entstanden.

2.4 Datenverarbeitung

Die vorliegenden Daten wurden mit Excel 2010 verwaltet und mit Statistika und Graphpad statistisch ausgewertet. Alle Analysen wurden mit einer One-Way Anova und independent T-Test durchgeführt. Mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ (*) und $p < 0,01$ (**) wurden die Unterschiede zwischen den Gruppen als signifikant betrachtet. Wenn nicht anders gekennzeichnet wurde die Standardabweichung (SD) mit \pm angegeben.

3 Ergebnisse

3.1 Gewicht

Das Gewicht aller Ratten wurde während der gesamten Studie überwacht. An p21, p72, p91 und p112 wurden die Tiere vor der Griffstärkemessung jeweils einmal gewogen. Das Gewicht der Tiere in den Therapiegruppen zeigt zu keinem Zeitpunkt einen signifikanten Unterschied zwischen den Therapiegruppen (Abb.13), sodass bei der Griffstärkemessung von der tatsächlichen Kraft auszugehen ist und nicht etwa von einer Beeinflussung des Wertes durch das Gewicht.

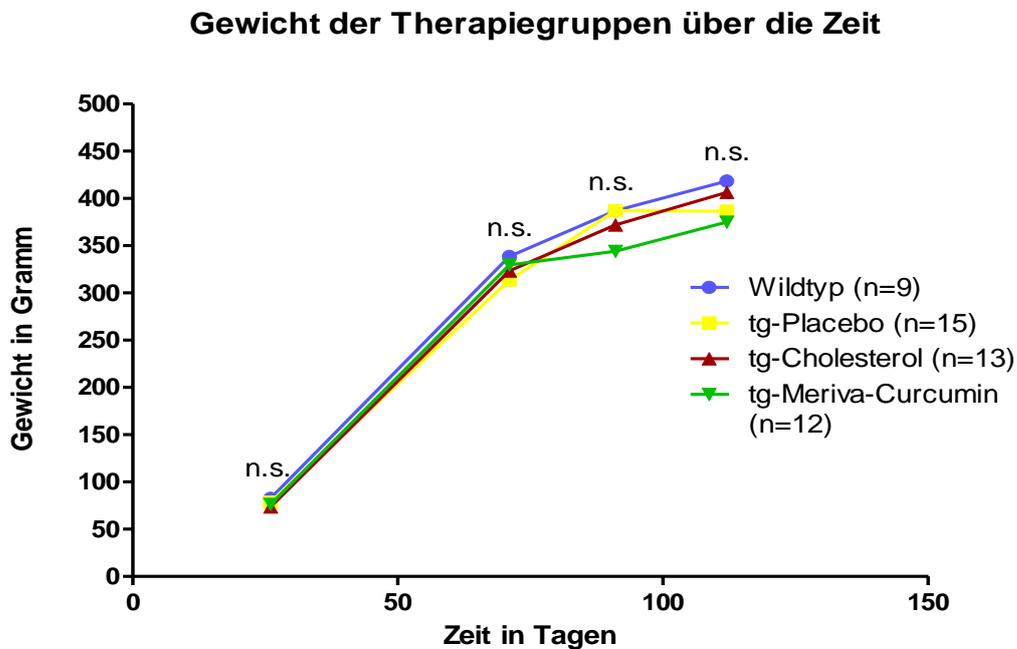


Abbildung 13: Gewichtszunahme aller Studientiere in g über die Zeit nach Gruppen eingeteilt.

Alle Gruppen entwickeln sich über die Zeit gesehen ähnlich ohne signifikanten Unterschied.

Ergebnisse

Tabelle 5: Mittelwerte des Gewichtes in Gramm mit jeweiliger SD zu den Zeitpunkten p26, p72, p91 und p112.

Therapie- gruppen	p21	p72	p91	p112
Wildtyp	82,57 ± 5,6	338,78 ± 19,7	387,00 ± 30,6	418,33 ± 33,0
tg-Placebo	78,42 ± 8,3	313,6 ± 14,7	387,00 ± 14,8	386,00 ± 18,1
tg-Cholesterol	73,65 ± 10,1	323,46 ± 20,5	372,00 ± 28,7	406,31 ± 32,0
tg-Meriva	76,25 ± 11,1	329,62 ± 33,5	344,00 ± 25,7	375,00 ± 29,6

3.2 Phänotypisierung

3.2.1 Vorderläufe über die Zeit

Die Griffstärkebestimmung der Tiere wurde zu vier Zeitpunkten der Studie durch die jeweils selbe Person zur gleichen Zeit mit einer eigens der Hauswerkstatt vom MPI gebauten Vorrichtung vorgenommen und in Newton (N) gemessen. Nach sieben Messungen wurden jeweils der höchste und niedrigste Wert gestrichen und aus den verbleibenden Werten der Mittelwert gebildet. Die WT-Tiere bleiben über den gesamten Studienverlauf mit $p < 0,05$ signifikant stärker als die tg-Kontrollgruppen. Unter den tg-Therapiegruppen ist kein Unterschied feststellbar, auch wenn man an p71 einen Trend erkennen kann. Die mit Cholesteroll und Meriva-Curcumin behandelten Tiere erscheinen an p71 etwas stärker als die Placebo-Tiere, jedoch ohne jegliche Signifikanz (Abb.14).

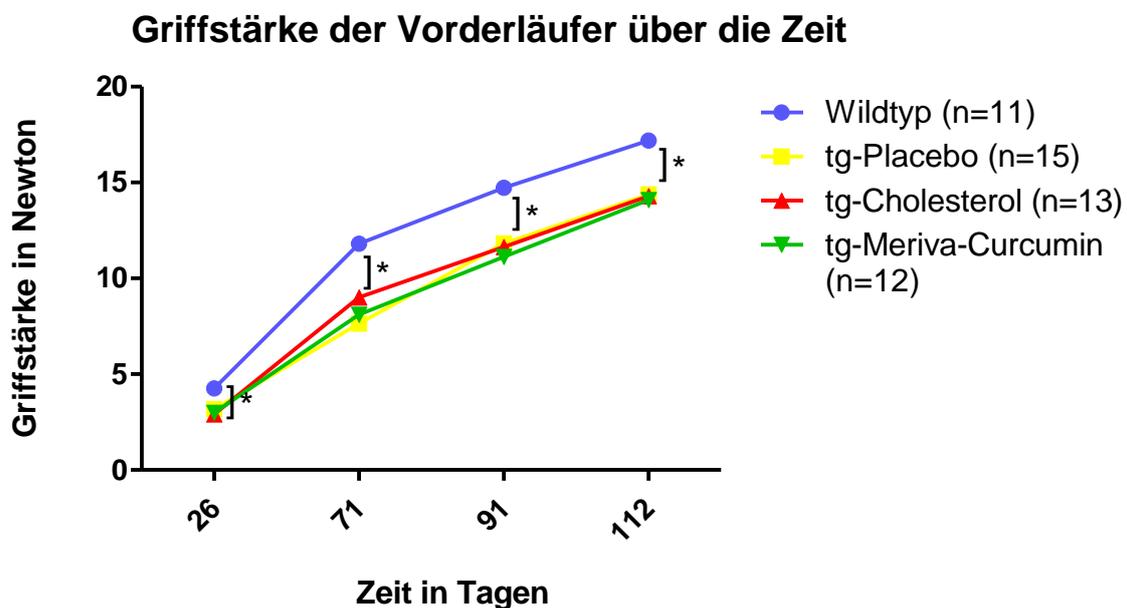


Abbildung 14: Griffstärkebestimmung der Vorderläufe

Griffstärke in Newton zu allen Zeitpunkten der Studie. Zu Studienbeginn an p26 besteht zwischen den tg-Therapiegruppen kein signifikanter Unterschied untereinander. Alle Therapiegruppen unterscheiden sich signifikant zu der WT-Gruppe mit $p < 0,05$ und bleiben über die Studienzeit von 12 Wochen hinweg schwächer als die Wildtypiere.

3.2.2 Vorderläufe zum Therapiebeginn an p26

Zu Therapiebeginn sind die Wildtyptiere signifikant (WT:PL $p < 0,0002$; WT:CH $p < 0,0001$; WT:ME $p < 0,0001$) stärker als alle tg-Therapiegruppen, die zu diesem Zeitpunkt noch mit keiner Substanz behandelt wurden (Abb.15). Die transgenen Therapiegruppen weisen wie erwartet keinen signifikanten Kraftunterschied untereinander auf. Die Mittelwerte \pm SD betragen WT:4,26 N \pm 0,16, PL:3,17 N \pm 0,16, CH:2,9 N \pm 0,12, ME:2,99 N \pm 0,14.

Griffstärke der Vorderläufe an p26 (Therapiebeginn)

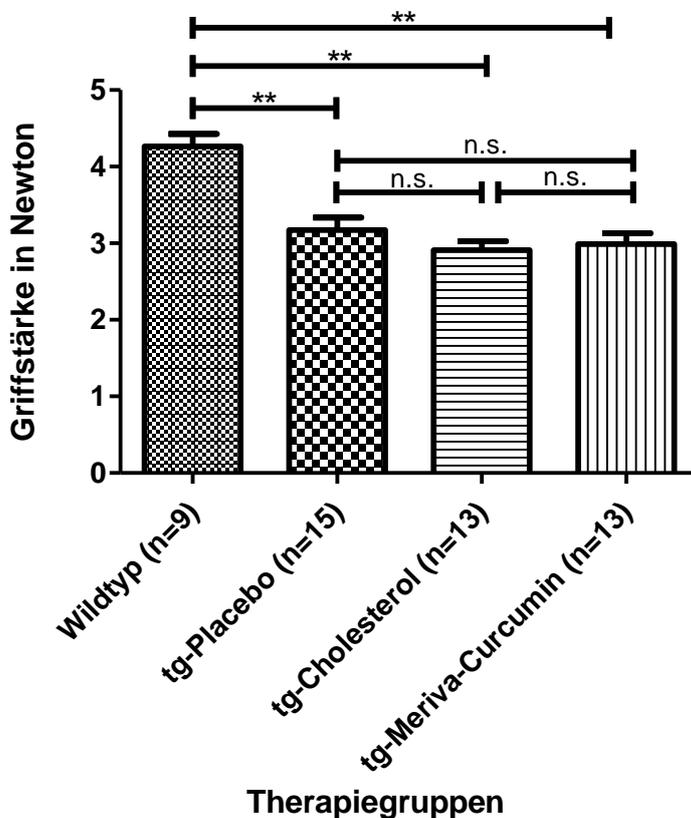


Abbildung 15: Griffstärkebestimmung der Vorderläufe an p26 (Therapiebeginn)

Zum Therapiebeginn ist ein signifikanter Kraftunterschied zwischen den Wildtyptieren und den tg-Therapiegruppen messbar (jeweils $p < 0,01$). Die transgenen Therapiegruppen sind zu diesem Zeitpunkt noch unbehandelt und weisen wie erwartet untereinander keinen signifikanten Kraftunterschied an den Vorderläufen auf.

3.2.3 Vorderläufe zum Endzeitpunkt p112 (Therapieende)

Zum Endzeitpunkt an p112 sind die Cholesterol- ($p=0,0007$), Meriva-Curcumin- ($p=0,0016$) und Placebogruppe ($p=0,002$) signifikant schwächer als die Wildtyp-tiere. Die Therapiegruppen im Vergleich weisen auch nach 12 Wochen Behandlung mit der jeweiligen Substanz keinen signifikanten Unterschied untereinander auf (Abb.16). Ein Grund hierfür könnte die Tatsache sein, dass sich die Erkrankung stärker auf die Hinterläufe ausprägt.

Die Mittelwerte \pm SD betragen WT:17,15 N \pm 1,9, PL:14,38 N \pm 1,8, CH:14,29 N \pm 1,4, ME:14,09 N \pm 1,8.

Griffstärke der Vorderläufe an p112 (Therapieende)

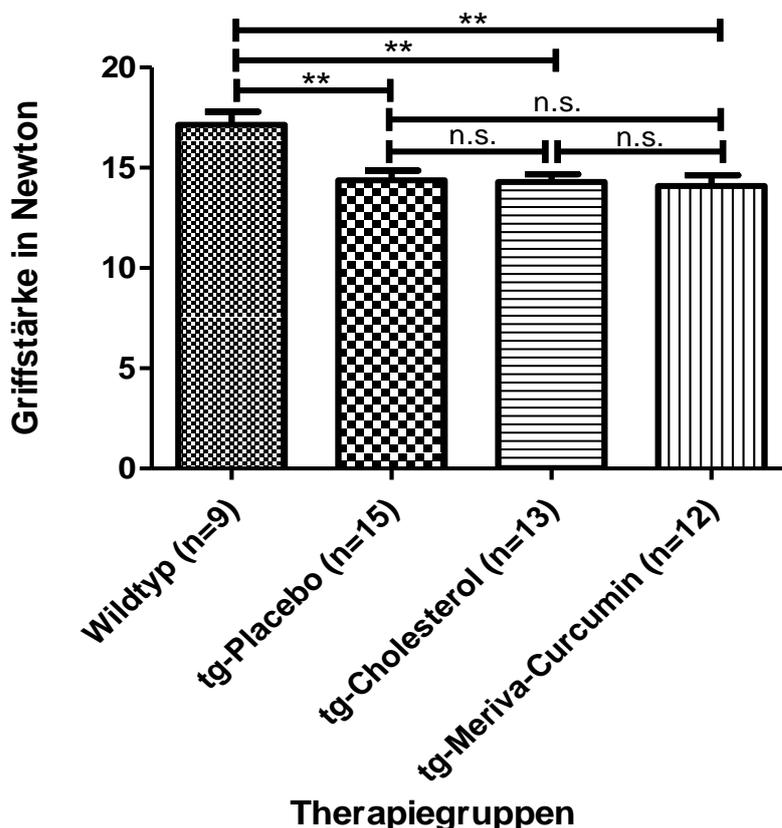


Abbildung 16: Griffstärkebestimmung der Vorderläufe an p112

Am Ende der Therapie zeigte sich bei der Griffstärke der Vorderläufe kein signifikanter Unterschied unter den Therapiegruppen und der Placebogruppe. Alle Gruppen waren signifikant ($p<0,01$) schwächer als die Wildtypgruppe.

3.2.4 Hinterläufe über die Zeit

Nach dem Erfassen der Griffstärke für die Vorderläufe wurde die Griffstärke der Hinterläufe gemessen. An p72 gab es technische Probleme, sodass diese Werte nicht in die Auswertung mit einfließen konnten. Bei den Hinterläufen lässt sich insgesamt ein deutlicher Trend hinsichtlich verbesserter Griffstärke bei den mit Cholesterol und Meriva-Curcumin behandelten Tieren erkennen. Der anfängliche signifikante Kraftunterschied der Therapiegruppen zu den WT-Tieren bleibt über die Therapiedauer hinweg bestehen (Abb.17).

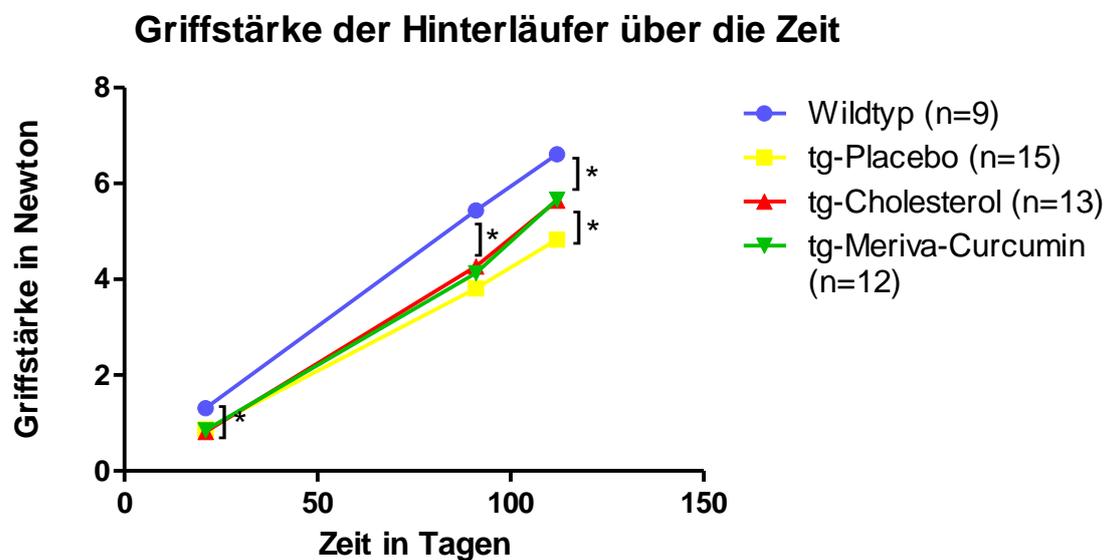


Abbildung 17: Griffstärkebestimmung der Hinterläufe

Zum Studienbeginn besteht an p26 zwischen den tg-Therapiegruppen kein signifikanter Unterschied. Alle Therapiegruppen sind im Vergleich zur WT-Gruppe signifikant schwächer. Der anfängliche Kraftunterschied wurde an p112 berücksichtigt. Nach 12 Wochen Therapiedauer sind alle Therapiegruppen zum WT weiterhin signifikant schwächer. Der signifikante Kraftunterschied bleibt also bestehen. Eine deutliche Verbesserung der Griffstärke ist zwischen den Gruppen Cholesterol/Meriva-Curcumin ($p < 0,05$) und der Placebogruppe zu sehen.

3.2.5 Hinterläufe zu Therapiebeginn an p26

Zu Therapiebeginn an p26 sind die Wildtyptiere signifikant stärker als die tg-Therapiegruppen (WT:PL $p < 0,0001$, WT:CH $p < 0,0001$, WT:ME $p < 0,0001$). Die transgenen Therapiegruppen weisen wie erwartet keinen signifikanten Kraftunterschied untereinander auf (Abb.18). Die Mittelwerte \pm SD betragen WT: 1,35 N \pm 0,07, PL: 0,87 N \pm 0,09, CH: 0,8 N \pm 0,06, ME: 0,85 N \pm 0,05.

Griffstärke der Hinterläufe an p26 (Therapiebeginn)

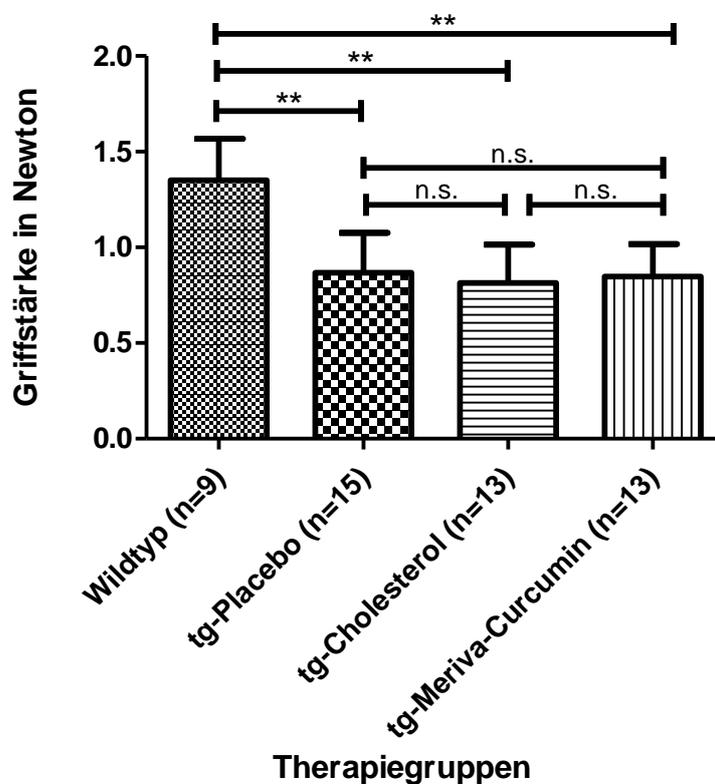


Abbildung 18: Griffstärkebestimmung zu Therapiebeginn an p26

Die Griffstärke der Wildtyptiere an den Hinterläufen sind zu Therapiebeginn an p26 signifikant (jeweils $p < 0,0001$) stärker als die der transgenen Therapiegruppen. Die transgenen Therapiegruppen untereinander sind nahezu gleich stark ohne signifikanten Unterschied.

3.2.6 Hinterläufe zum Endzeitpunkt an p112

Zum Endzeitpunkt p112 sind die Wildtyptiere mit 6,56 N immer noch hoch signifikant stärker ($p=0,0001$) als die Placebotiere mit 4,83 N. Die mit Cholesterol und Meriva-Curcumin behandelten Tiere sind nach 12 Wochen Behandlung mit 5,64 N und 5,66 N nahezu gleich stark. Auch wenn sie immer noch signifikant schwächer als die Wildtyptiere (jeweils $p=0,02$) sind, so zeigt sich doch ein deutlicher Therapieeffekt durch die signifikante Kraftsteigerung gegenüber den unbehandelten Placebotieren (jeweils $p=0,02$) (Abb.19). Die MW \pm SD betragen für die WT 6,56 N \pm 0,7, PL 4,83 N \pm 0,7 CH 5,64 N \pm 0,8 und ME 5,66 N \pm 0,8.

Griffstärke der Hinterläufe an p112 (Therapieende)

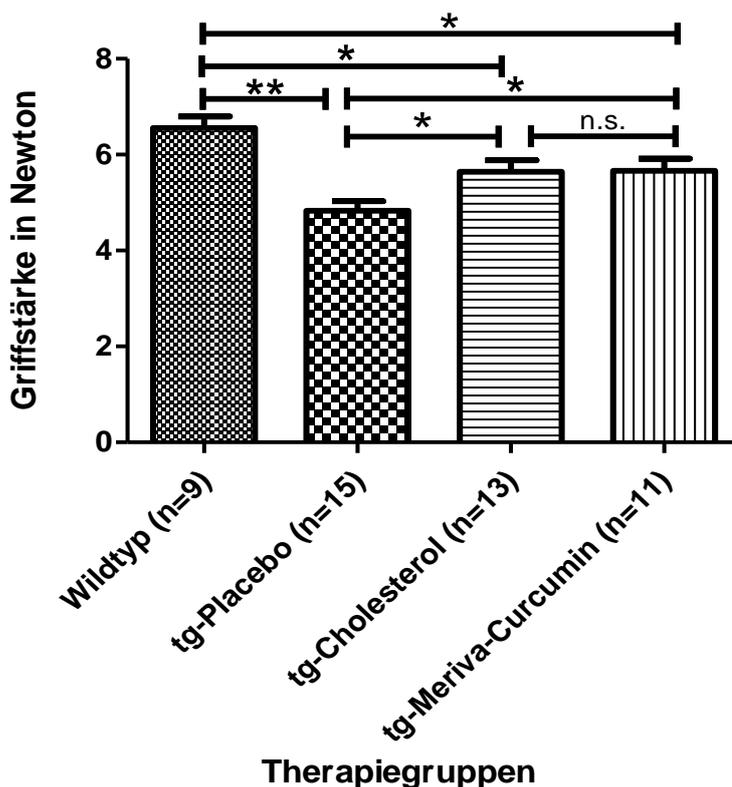


Abbildung 19: Griffstärkebestimmung der Hinterläufe an p112

Am Ende der Therapie zeigt sich ein deutlicher Therapieeffekt. Die mit Cholesterol und Meriva-Curcumin behandelten Tiere sind nahezu gleich stark und signifikant ($p<0,05$) stärker sind als die unbehandelte Placebogruppe. Das Wildtypniveaue wird nicht erreicht, und es besteht immer noch ein signifikanter Unterschied ($p<0,05$).

3.3 Hotplate-Test

Der Hotplate-Test dient der Messung der Reaktionsgeschwindigkeit auf Wärme und lässt somit Rückschlüsse auf die Nervenleitgeschwindigkeit der sensiblen Nervenfasern zu. Auch wenn die Cholesterol-Gruppe mit 10,52 s einen Trend aufweist, sind die behandelten tg-Therapiegruppen im Vergleich zu den Placebo-tieren mit 11,01 s nicht signifikant schneller gewesen (Abb.20). Die Wildtyptiere haben mit 8,63 s jeweils signifikant schneller reagiert als die Cholesterol- ($p=0,0473$), Meriva-Curcumin- ($p=0,0224$) und die Placebogruppe ($p=0,0449$). Bezüglich der sensiblen Nervenleitgeschwindigkeit ist somit kein Therapieeffekt feststellbar. Die MW \pm SD betragen WT: 8,63 s \pm 1,9, PL: 11,01 s \pm 2,9, CH:10,52 s \pm 1,9 und ME: 12,32 s \pm 4,0.

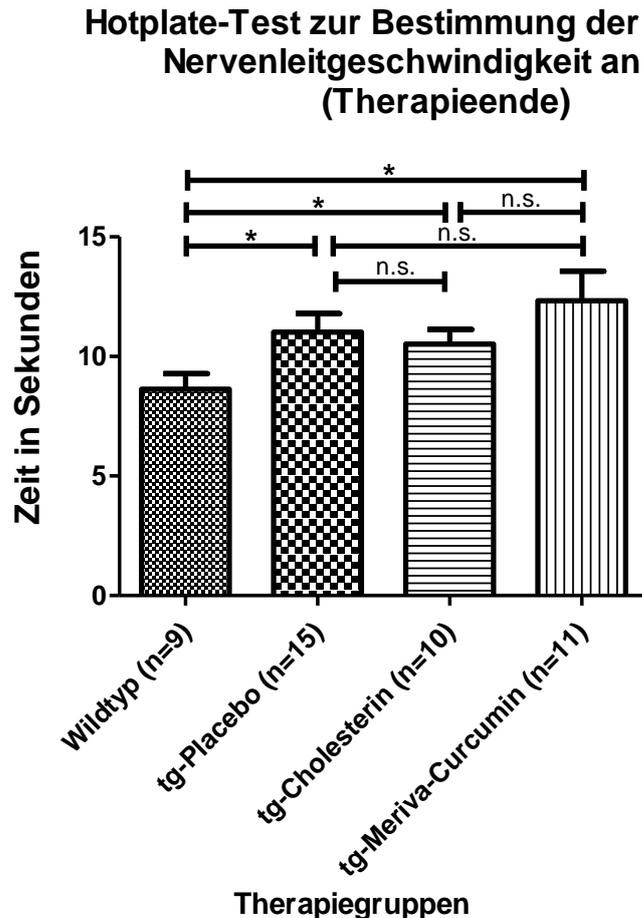


Abbildung 20: Hotplate-Test

Der Hotplate-Test dient zur Bestimmung der sensiblen Nervenleitgeschwindigkeit in Sekunden bei 58 °C. Die Therapiegruppen zeigen alle ein signifikant langsames Reaktionsverhalten als die Wildtypiere ($p < 0,05$). Auch wenn die Werte der Cholesterolgegruppe einen Trend aufzeigen, sind sie im Vergleich zu den Werten der Placebogruppe nicht signifikant schneller.

3.4 *Musculus tibialis cranialis*- Gewicht

Die Muskelmasse des *Musculus tibialis cranialis* wurde nach zehn Tagen Lagerung in 4 % PFA auf einer Feinwaage gemessen. Eine durch die CMT-Pathologie verursachte geringere Myelinisierung und dadurch geringe Innervation der Muskeln, baut sich Muskelmasse ab. Die Gewichtsmessung der Muskelmasse lässt demnach Rückschlüsse auf den Myelinisierungsgrad und das Ausmaß der Atrophie zu. Am Ende der Studie sind nur die Muskelmassen der Placebogruppe mit 0,60 g ($p = 0,03$) signifikant leichter als die der WT-Tiere mit 0,66 g. Die Muskelmassen des *Musculus tibialis cranialis* der mit Cholesterol (0,65 g) und Meriva-

Curcumin (0,62 g) behandelten tg-Therapiegruppen zwar nicht signifikant schwerer als die der unbehandelten Placebotiere, aber auch nicht signifikant leichter als die der Wildtypiere. Daher ist ein deutlicher Trend sichtbar (Abb.21). Die absoluten MW \pm SD pro Gruppe betragen WT:0,66 g \pm 0,05, PL:0,60 g \pm 0,05, CH:0,65 g \pm 0,09 und ME:0,62 g \pm 0,09.

Gewicht des Musculus tibialis cranialis an p112 (Therapieende)

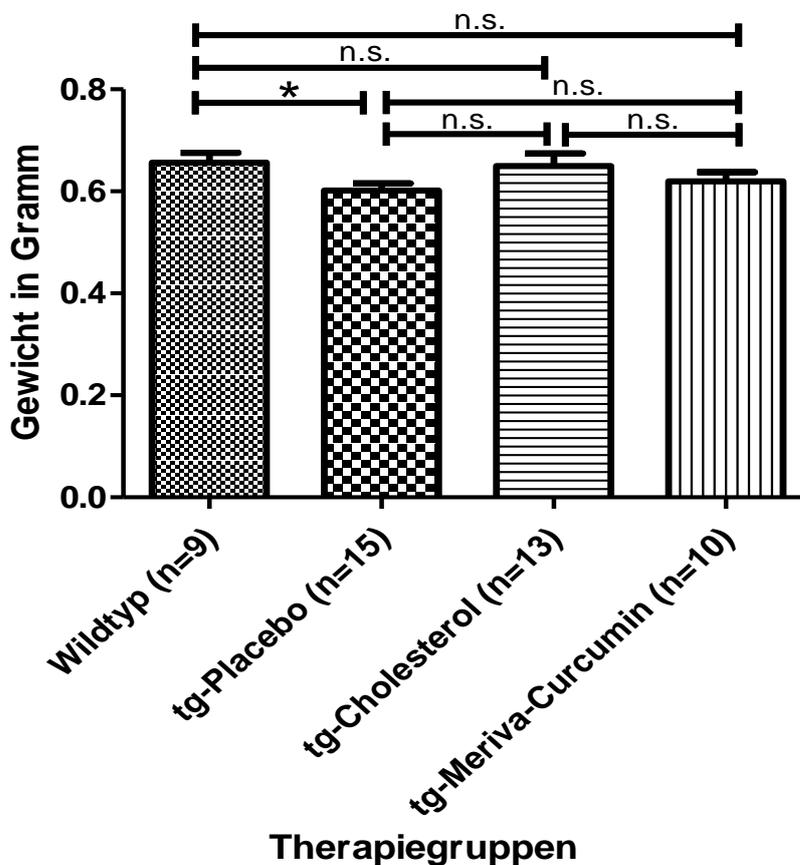


Abbildung 21: Messung des Gewichtes des *Musculus tibialis cranialis* in g

Hier zeigt sich am Ende der Studie nach 12 Wochen Therapie nur ein signifikanter Unterschied zwischen dem Gewicht des Muskels der Wildtypiere und dem der Placebogruppe ($p < 0,05$). Die Cholesterol- und Meriva-Curcumin-Gruppe haben mit 0,65 g und 0,62 g weder signifikant leichtere Werte als die Wildtypiere mit 0,66 g noch signifikant schwerere als die Placebotiere mit 0,60 g.

3.5 Semidünnschnitte des *Nervus tibialis*

Die lichtmikroskopischen Aufnahmen des proximalen *Nervus tibialis* werden an dieser Stelle exemplarisch gezeigt. Erste Auswertung und Quantifizierung wurden innerhalb der Arbeitsgruppe vorgenommen.

Histologische Effekte sind bereits zu sehen. Die Wildtyptiere sind besonders durch die homogenen myelinisierten Axone zu erkennen. Die Placebotiere hingegen weisen viele demyelinisierte und hypomyelinisierte Axone auf (Abb.22).

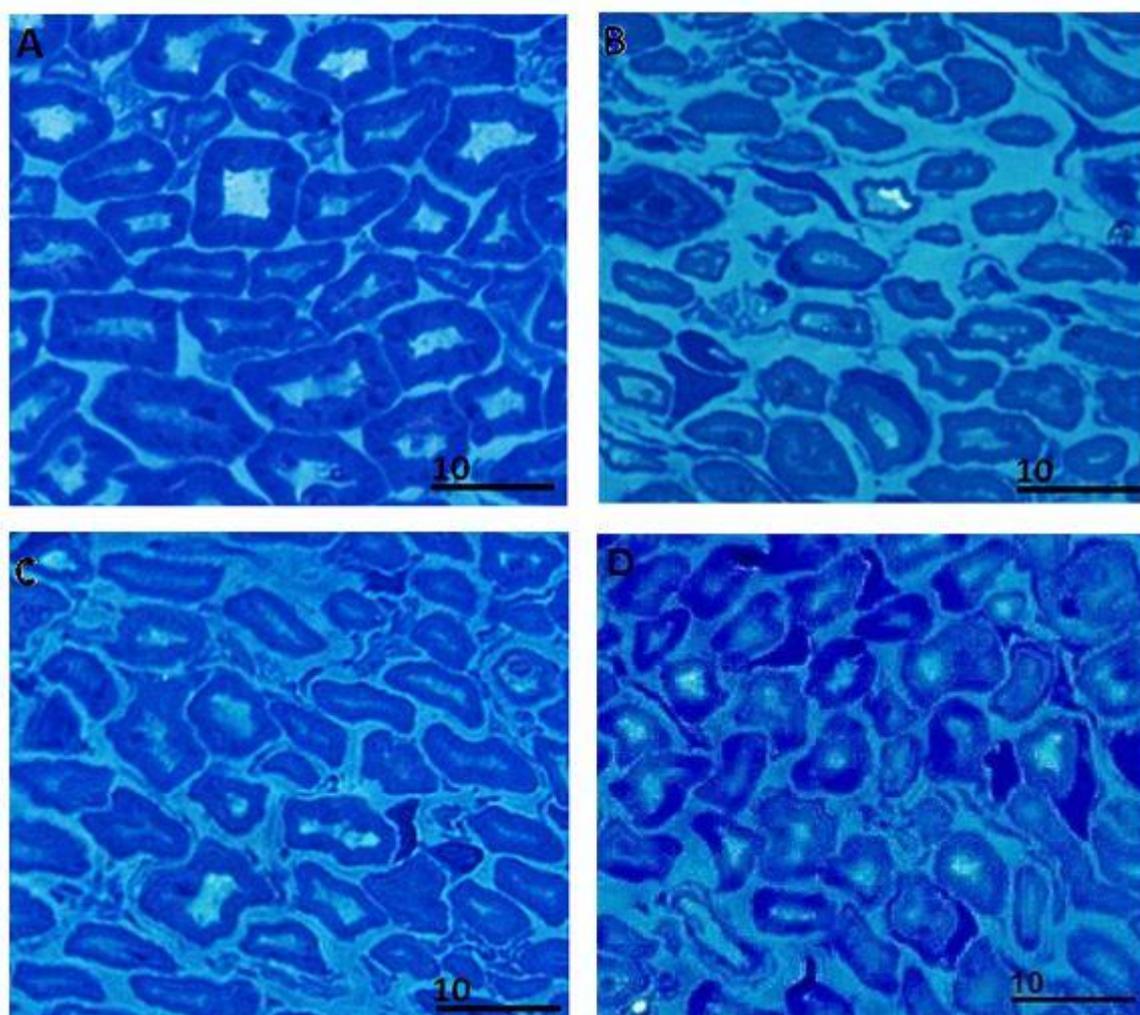


Abbildung 22: Lichtmikroskopische Aufnahmen des *Nervus tibialis cranialis*

Am Ende der Therapie (p112) in 100-facher Vergrößerung der *Nervus tibialis cranialis* von (A) Wildtyp, (B) Placebo, (C) Cholesterol und (D) Meriva-Curcumin. Der Maßstab entspricht 10 µm. Die Bilder sind in Zusammenarbeit mit L. Rasch entstanden. Deutlich erkennbar sind die homogen myelinisierten Axone der Wildtyptiere. Die Placebogruppe zeigt hypomyelinisierte Axone und auch eine geringere Dichte. Sowohl die Cholesterol- als auch die Meriva-Curcumin-Gruppe zei-

gen auf den ersten Blick gegenüber dem Placebobild eine verbesserte Myelinisierung und Axondichte. Ergebnisse der histologischen Auszählung siehe unten.

3.6 Histologische Auswertung des *Nervus tibialis*

3.6.1 Histologische Auswertung der Cholesterol-Therapiegruppe

Die histologische Auszählung der Cholesterolgruppe im Vergleich zur Wildtyp- und Placebogruppe wurde von L. Rasch (Doktorand der PNS-Arbeitsgruppe am MPI) vorgenommen. Die Absolutwerte sind der Tabelle (Tab.6) zu entnehmen.

Tabelle 6: Mittelwerte der Axonauszählung des *Nervus tibialis* (Cholesterol) mit SD

Axone	Wildtyp (n=8)	tg-Placebo (n=15)	tg-Cholesterol (n=13)
total	3125 ± 44,36	2901 ± 31,47	2893 ± 63,08
myelinisiert	3097 ± 47,93	2857 ± 29,58	2873 ± 59,80
demyelinisiert	0,4 ± 0,18	42 ± 4,43	24 ± 2,75

Die Auszählung ergab eine signifikant höhere Axongesamtanzahl der Wildtyptiere mit 3125 im Vergleich zu den mit Cholesterol behandelten Tieren ($p=0,0165$) mit 2893 und hoch signifikant mehr Axone im Vergleich zu den unbehandelten Placebotieren ($p=0,0005$) mit 2901.

Auch bei der Anzahl der myelinisierten Axone wiesen die Wildtyptiere mit 3097 signifikant mehr Axone auf als die Placebotiere ($p<0,0001$) mit 2857 und die Cholesterol-Gruppe ($p<0,01$) mit 2873. Die Anzahl demyelinisierter Axone ist zwar nach Cholesterolbehandlung mit 24 immer noch signifikant höher als die der Wildtyptiere ($p<0,0001$), mit 0,4 jedoch signifikant niedriger als bei den unbehandelten Placebotieren ($p<0,0001$) mit 42 (siehe Abb.23+24 und Tab.6). Die histologische Verbesserung beim *Nervus tibialis* nach Therapie mit Cholesterol ist somit deutlich durch eine fast halbierte Anzahl demyelinisierter Axone nach Therapie geworden.

Histologische Auswertung des Nervus tibialis nach Cholesterol-Behandlung

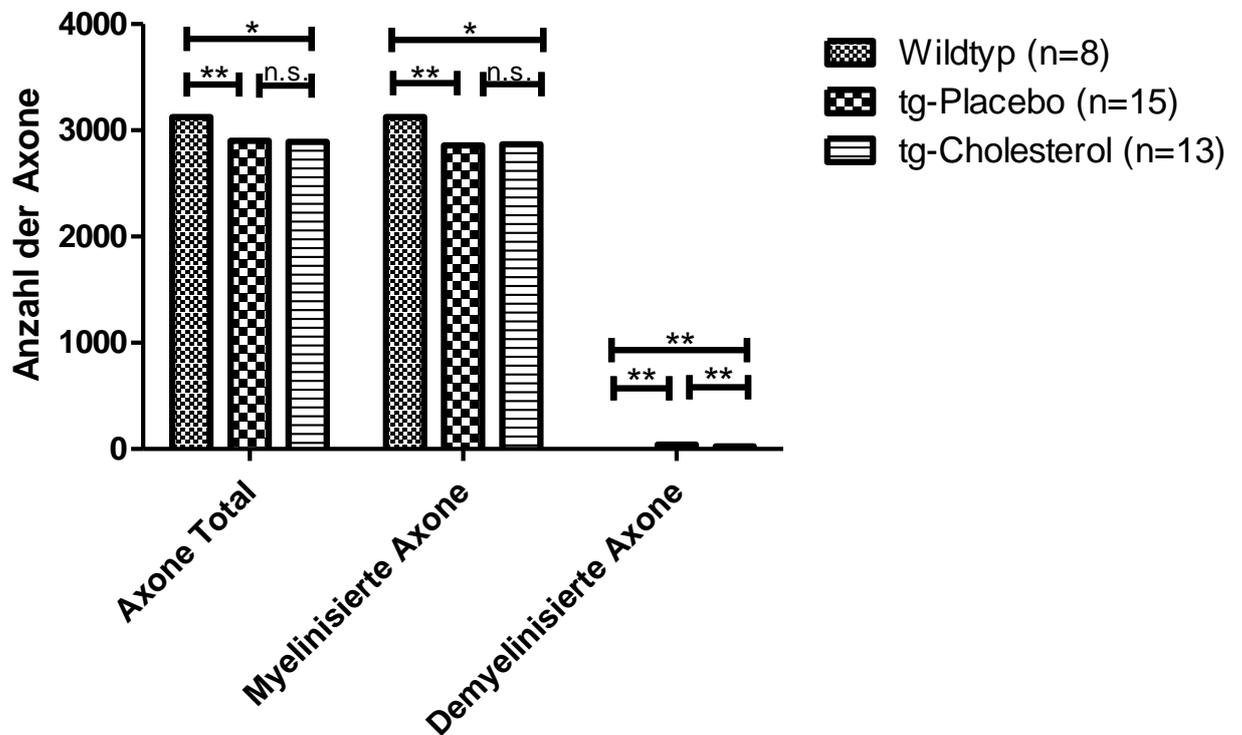


Abbildung 23: Histologische Auswertung des *Nervus tibialis*.

Die histologische Auswertung des *Nervus tibialis* zum Therapieende wurde durch L. Rasch vorgenommen und ergab bei den Wildtyptieren signifikant mehr Axone in der Gesamtanzahl als auch hinsichtlich der myelinisierten Axone gegenüber der transgenen Placebo- und Cholesterolgruppe. Gleichzeitig wiesen die Wildtyptiere signifikant weniger demyelinisierte Axone auf als die beiden transgenen Gruppe. Sowohl bei der Gesamtanzahl als auch der Anzahl myelinisierter Axone ergaben sich zwischen der Placebo und Cholesterolgruppe keine signifikanten Unterschiede. Die Auszählung der demyelinisierten Axone hingegen ergab einen signifikanten Unterschied ($p < 0,0001$) und zeigte eine histologische Verbesserung bei den mit Cholesterol behandelten Tieren.

Anzahl demyelinisierter Axone nach Therapie mit Cholesterol

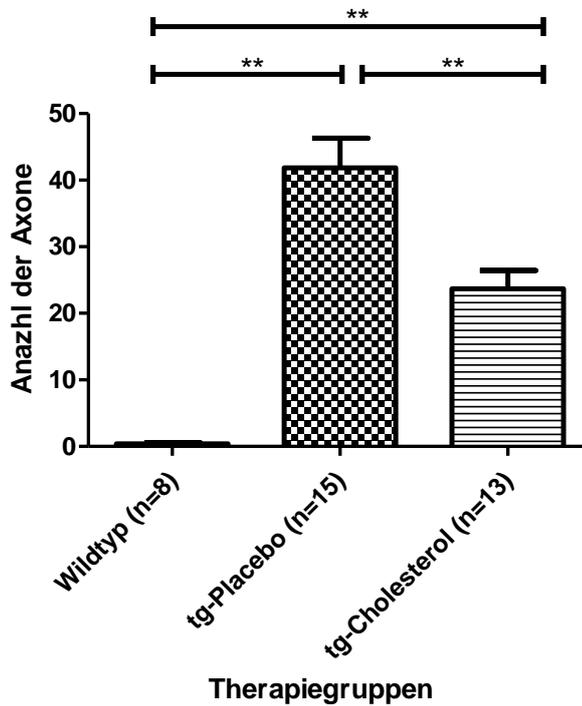


Abbildung 24: Anzahl demyelinisierter Axone nach Behandlung mit Cholesterol

Die Wildtyptiere zeigen nahezu keine demyelinisierten Axone. Die tg-Placebogruppe ($p < 0,0001$) und die tg-Cholesterolgruppe ($p < 0,0001$) haben signifikant mehr demyelinisierte Axone als die Wildtyptiere. Signifikant weniger demyelinisierte Axone haben die mit Cholesterol behandelten Tiere gegenüber der unbehandelten Placebogruppe ($p < 0,0024$). Hier reduzierte sich die Anzahl fast um die Hälfte. Die Auswertung der Axonanzahl wurde durch L. Rasch vorgenommen.

3.6.2 Histologische Auswertung des *Nervus tibialis* der Meriva-Curcumin-Therapiegruppe

Die histologische Auszählung des *Nervus tibialis* erfolgte bei den mit Meriva-Curcumin behandelten Tieren durch Thomas Prukop. Die totale Anzahl der Axone war bei den Wildtyptieren mit 3061 gegenüber den Placebotieren mit 2847 hoch signifikant ($p = 0,01$) und bei den mit Meriva-Curcumin behandelten Tieren mit 2812 signifikant ($p = 0,03$) höher. Die Auszählung ergab auch bei der Anzahl der myelinisierten Axone einen signifikanten Unterschied zwischen Wildtyptieren mit 3059 zur Placebogruppe ($p = 0,0046$) mit 2806 und der Meriva-Curcumin-Gruppe ($p = 0,02$) mit 2769, jedoch nicht zwischen Placebo- und Meriva-Curcumin-Tieren. Auch bei der Anzahl der demyelinisierten Axone haben die Wildtyptiere mit 3 signifikant weniger als die Placebo- ($p = 0,0008$) mit 41 und Merivagruppe ($p = 0,001$) mit 43. Die unbehandelten Placebotiere und die mit Meriva-Curcumin

behandelten Tiere haben ungefähr gleich viele demyelinisierte Axone. Es besteht hier kein signifikanter Unterschied (Abb.25+26) und somit ist kein Therapieeffekt hinsichtlich der Axonauszählung sichtbar. Die absoluten Werte \pm SD sind der Tabelle (Tab.7) zu entnehmen.

Histologische Auswertung des Nervus tibialis nach Meriva-Curcumin-Behandlung

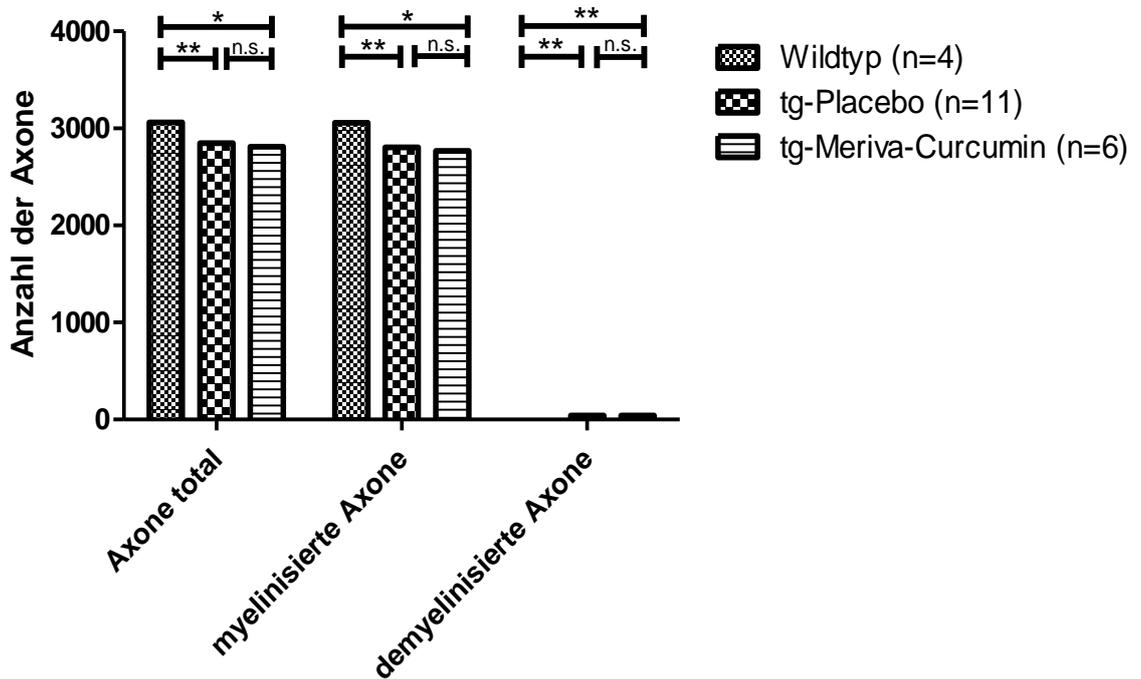


Abbildung 25: Histologische Auswertung des Nervus tibialis nach Meriva-Curcumin-Behandlung

Deutlich erkennbar sind die signifikanten Unterschiede zwischen den Wildtyptieren und den transgenen Placebo- und mit Meriva-Curcumin behandelten Tieren sowohl bei der totalen Anzahl der Axone als auch der Anzahl myelinisierter und demyelinisierter Axone. Der Unterschied zwischen der Placebo- und der Meriva-Curcumingruppe ist jeweils nicht signifikant. Die histologische Auswertung wurde von T. Prukop vorgenommen.

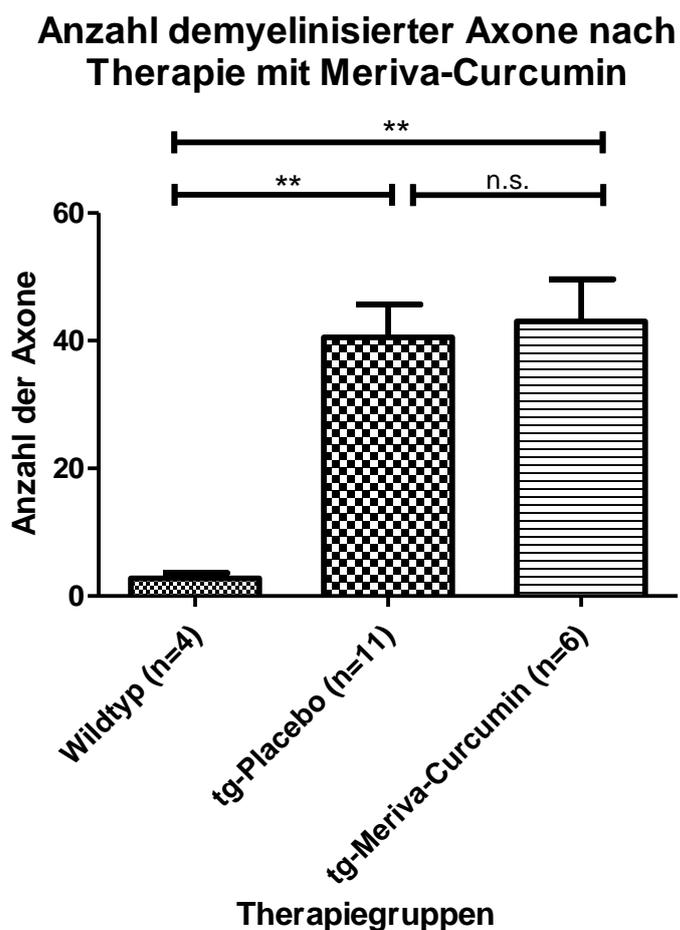


Abbildung 26: Anzahl demyelinisierter Axone nach Behandlung mit Meriva-Curcumin

Die Wildtyptiere weisen signifikant weniger demyelinisierte Axone auf als die Placebo- ($p=0,0008$) und Meriva-Curcumin-Gruppe ($p=0,001$). Mit Meriva-Curcumin behandelte und unbehandelte Placebotiere zählen ähnlich viele demyelinisierte Axone und weisen keinen signifikanten Unterschied auf. Die Auszählung der Axone wurde von T. Prukop vorgenommen.

Tabelle 7: Mittelwerte der Axonauszählung des *Nervus tibialis* (Meriva-Curcumin) mit SD

Axone	Wildtyp (n=4)	tg-Placebo (n=11)	tg-Meriva-Curcumin (n=6)
total	3061 ± 85,58	2847 ± 30,97	2812 ± 55,64
myelinisiert	3059 ± 85,76	2806 ± 32,97	2769 ± 58,08
demyelinisiert	3 ± 0,85	41 ± 5,13	43 ± 6,62

3.7 Elektrophysiologische Auswertung

3.7.1 Nervenleitgeschwindigkeit

Die Nervenleitgeschwindigkeit (NLG) gibt an, wie schnell elektrische Impulse in der Nervenfasern weitergeleitet werden und wird in m/s angegeben. Sie gilt als Maß für den Myelinisierungsgrad. Die Messungen wurden von R. Fledrich erhoben. Er war hinsichtlich der Gruppenzuordnung geblindet und hat die Tiere nach dem Zufallsprinzip ausgewählt. Die Messungen wurden am Schwanz der jeweiligen Ratte abgeleitet. Die Wildtypiere haben bekanntlich als gesunde Tiere eine normale NLG. Nach Behandlung haben alle tg-Therapiegruppen eine ähnliche NLG. Sie liegt bei der Placebogruppe bei 10,12 m/s, der Cholesterolgegruppe bei 10,9 m/s und der Meriva-Curcumingruppe bei 11,24 m/s. Auch nach 12 Wochen Therapie ist die NLG um mehr als 50 % vermindert und somit signifikant langsamer (Abb.27) Die Absolutwerte betragen für die WT: $26,69 \pm 7,00$, PL: $10,12 \pm 0,76$, CH: $10,9 \pm 0,65$, ME: $11,24 \pm 2,55$ (siehe Tab. 8).

Nervenleitgeschwindigkeit an p112 (Therapieende)

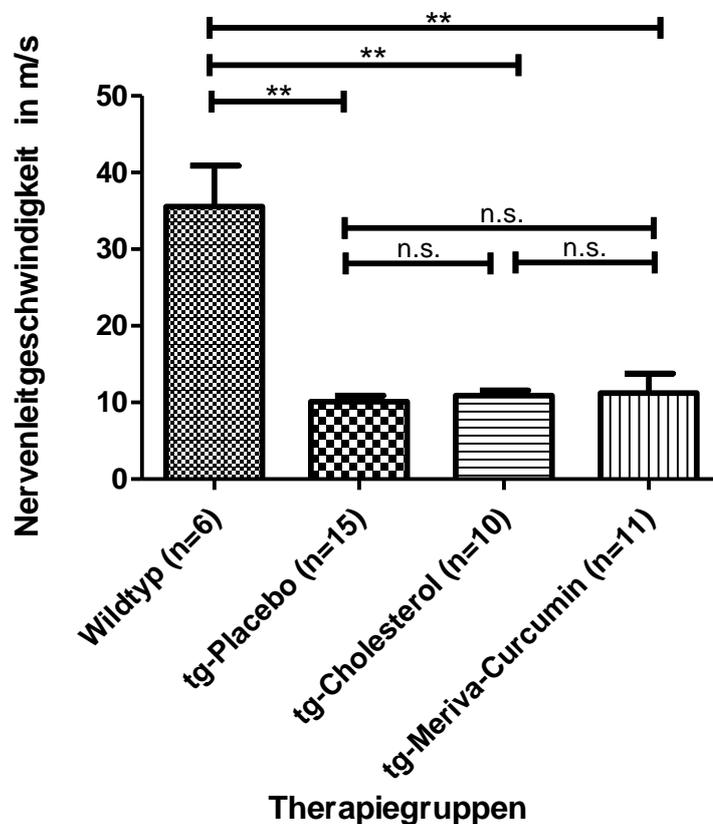


Abbildung 27: Nervenleitgeschwindigkeit nach Behandlung zum Therapieende an p112

Die NLG der Wildtypiere ist gegenüber der Cholesterol- ($p < 0,0001$), der Meriva-Curcumin-Gruppe ($p = 0,0003$) und der Placebogruppe ($p < 0,0001$) hoch signifikant erhöht. Innerhalb der transgenen Therapiegruppen besteht auch nach Behandlung zum Therapieende an p112 kein signifikanter Unterschied. Die Daten wurden von R. Fledrich erhoben.

Tabelle 8: Absolutwerte der Nervenleitgeschwindigkeit in m/s und SD

Elektro-physiol. Messung	Wildtyp (n=8)	tg-Placebo (n=15)	tg-Cholesterol (n=10)	tg-Meriva-Curucmin (n=11)
NLG in m/s ± SD	35,58 ± 5,31	10,12 ± 0,76	10,9 ± 0,65	11,24 ± 2,55

3.7.2 Muskelsummenaktionspotenziale (proximal) nach Therapieende an p112

Die Muskelsummenaktionspotenziale (MSAP) können als Maß für die axonale Degeneration angesehen werden. Die Daten wurden im gleichen Zuge wie die NLG von Robert Fledrich aus der PNS-Arbeitsgruppe am Schwanz der Ratten erhoben. Die Wildtyptiere haben mit 5,41 mV das stärkste MSAPA im Vergleich zu den Placebo-Tieren mit 2,17 mV ($p < 0,0001$), den Cholesterol-Tieren mit 2,26 mV ($p = 0,001$) und den Meriva-Curcumin-Tieren mit 3,22 mV ($p = 0,01$). Im Vergleich der tg-Therapiegruppen untereinander ist eine signifikante Verbesserung des MSAP der Meriva-Curcumin-Gruppe zu verzeichnen. Die MSAP der Cholesterol-Gruppe hingegen sind gegenüber der Placebo-Gruppe nicht signifikant verbessert. Die Absolutwerte mit SD betragen WT: $5,41 \pm 0,70$, PL: $2,17 \pm 0,28$, CH: $2,26 \pm 0,47$, ME: $3,22 \pm 0,43$ (Abb.28 + Tab.9).

Muskelsummenaktionspotenzial (proximal) an p112 (Therapieende)

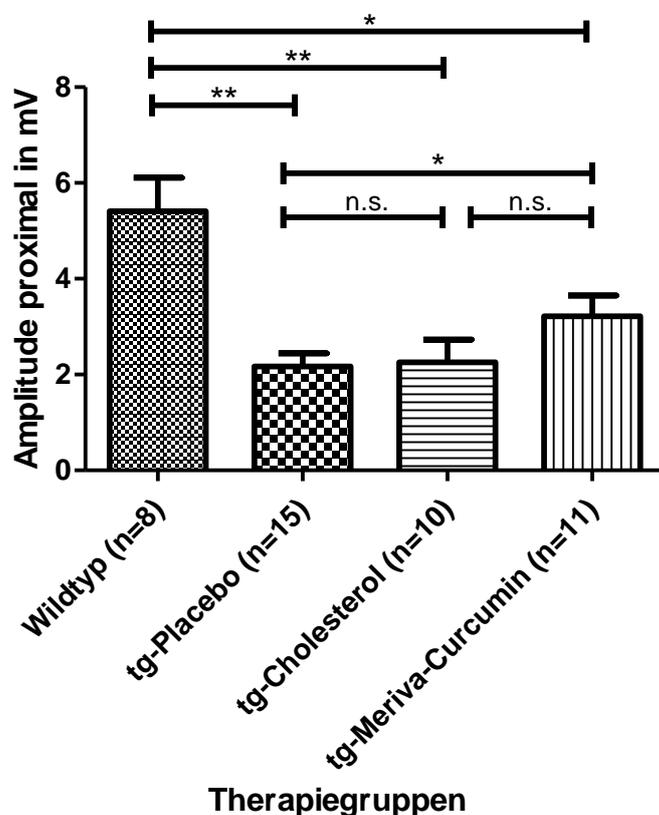


Abbildung 28: Muskelsummenaktionspotenzial proximal an p112

Die MSAP am Ende der Therapiestudie der Wildtyptiere sind mit $5,41 \pm 0,70$ mV signifikant höher als das der transgenen Gruppen. Die repräsentative Meriva-Curcumin-Ratte hat mit $3,22 \pm 0,43$ mV jedoch eine signifikant höhere proximale Amplitude als die Tiere der Placebo- und mit Cholesterol behandelten Gruppe. Die Daten wurden von R. Fledrich erhoben.

Tabelle 9: Absolutwerte des Muskelsummenaktionspotenzials mit SD

Elektro-physiol. Messung	Wildtyp (n=8)	Tg-Placebo (n=15)	Tg-Cholesterol (n=10)	Tg-Meriva-Curcumin (n=11)
MSAP in mV ± SD	5,41 ± 0,70	2,17 ± 0,28	2,26 ± 0,47	3,22 ± 0,43

4 Diskussion

Für die Studie wurden nur Ratten aus der Zucht des MPI-Tierhauses verwendet. Es wurden nur männliche Ratten ausgewählt, um hormonelle Schwankungen auszuschließen. Die Tiere waren alle gleich alt und wurden von einer dritten Person in Gruppen eingeteilt, um eine Verblindung der Doktorandin zu gewährleisten. Es wurde auf Homogenität der Gruppen geachtet, indem nach Kraft, Gewicht und Wurfzugehörigkeit eine stratifizierte Randomisierung vorgenommen wurde. Die Griffstärke an Vorder- und Hinterläufen wurden zu mehreren Zeitpunkten gemessen. Für die statistische Auswertung verglich man Anfangs- und Endzeitpunkt. Die Gruppenstärke betrug anfangs bei den Therapiegruppen 15 Tiere, die Wildtypgruppe umfasste 12 Tiere. Aufgrund von Tod oder Verwechslung sind letztlich fünf Tiere aus der statistischen Auswertung ausgeschlossen worden.

Die kontinuierliche Wirkstoffverabreichung wurde gewährleistet, indem Cholesterol (5 %) bzw. Meriva-Curcumin (0,1 %) dem Rattenfutter beigemischt wurden. Die Konzentration von Meriva-Curcumin wurde so niedrig gewählt, da das in Meriva-Curcumin enthaltene Curcumin eine höhere Bioverfügbarkeit als normal verabreichtes Curcumin aufweist (Cuomo et al. 2011). Da sich das Gewicht aller Therapietiere ohne signifikanten Unterschied entwickelte (Abb.13), ist von einer gleich aufgenommen Futtermenge aller Tiere auszugehen. Die tägliche Futtermenge einer adulten Ratte liegt bei ca. 20 g, wie bereits intern von der Arbeitsgruppe festgestellt wurde.

In vorherigen Studien, die zu signifikanten Ergebnissen kamen (Saher et al. 2012; Khajavi et al. 2005) wählte man einen ähnlichen Studienaufbau und Ablauf. Die Tiere wurden über drei Monate hinweg behandelt. Alle drei Wochen wurde die Griffstärke der Vorder- und Hinterläufe gemessen. Das Gewicht kontrollierte man zeitgleich zu diesen Zeitpunkten. Auch wenn am Ende das Absolutgewicht zwischen den Therapiegruppen (WT zu ME) um ca. 25 g voneinander abwich, ist dies nicht signifikant (Tab.5).

Die Ergebnisse der Griffstärke der Vorderläufe lassen bis auf einen Trend an p72 keinen signifikanten Unterschied erkennen (Abb.14). Die mit den Substanzen behandelten Tiere sind zum Endzeitpunkt nicht stärker als die Placebogruppe

(Abb.15). Die Griffstärke der Hinterläufe hingegen entwickelt sich im Laufe der Therapie signifikant (Abb.17).

Zum Endzeitpunkt p112 sind sowohl die mit Cholesterol ($p=0,015$) als auch die mit Meriva-Curcumin ($p=0,016$) behandelten Tiere hinsichtlich der Hinterläufe signifikant stärker als die Placebogruppe. Die Muskelstärke der Hinterläufe hat sich im Vergleich zu der Placebogruppe bei den mit Cholesterol behandelten Tieren um 16,8 % und bei den mit Curcumin behandelten Tieren um 17,2 % gesteigert.

Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse von Vorder- und Hinterläufen mag sein, dass die Muskelatrophie gewöhnlich an den Hinterläufen stärker auftritt (Shy et al. 2005) und die Pathogenese durch die längenabhängige axonale Degeneration charakterisiert ist. Somit kann hier eine Therapie auch einen deutlicheren Effekt aufzeigen. Gleichzeitig wurde bei den Messungen beobachtet, dass die Tiere sich an das Griffstärke-Prozedere gewöhnten und lustlos erschienen. Bei der Arbeit mit Tieren ist man in gewisser Weise auf die Mitarbeit angewiesen, die jedoch v. a. bei intelligenten Tieren nicht immer gewährleistet ist.

Die höheren Absolutwerte der Vorderläufe lassen sich mit dem Versuchsaufbau begründen. Die Tiere hielten reflexartig mit den Vorderläufen an der Stange fest, da ein Loslassen ein Fallen nach sich zog. Bei der Messung der Hinterlaufwerte waren die Tiere mit den Vorderläufen auf einer Platte abgestützt und witterten keine Gefahr (siehe Abb.8+9).

Nach der signifikanten Kraftsteigerung an den Hinterläufen wäre auch mit einer Muskelmassenerhöhung des *Musculus tibialis cranialis* zu rechnen, jedoch zeigt das Muskelgewicht hier keine signifikanten Unterschiede. Die Werte der Cholesterol- und Meriva-Curcumin-Gruppe sind mit 0,65 g bzw 0,62 g weder signifikant leichter als die der Wildtypiere mit 0,66 g noch sind sie signifikant schwerer als die der Placebotiere mit 0,60 g. Die Ursache hierfür kann auch bei Präparationsfehlern liegen, da die Muskeln teilweise von einer eingewiesenen zweiten Hilfsperson entnommen wurden. In einer Folgestudie wäre darauf zu achten, das Präparationsprozedere zu optimieren.

Der Hotplate-Test wurde auf einer 58 °C warmen Platte und einem Plastikbehälter herum durchgeführt, um eine Flucht der Tiere zu verhindern (Abb.10). Das

Lecken der Hinterläufe wurde als Zeichen der Reaktion auf die heiße Platte gewertet und die Zeit bis dahin gestoppt. Je schneller die Reaktionszeit, desto besser die sensible Leitgeschwindigkeit der Nerven. Dies würde mit einer verbesserten Myelinisierung und sensibler Leitfähigkeit einhergehen. Wie Abb.20 zeigt, ist kein signifikanter Unterschied zwischen der Placebogruppe und den Therapiegruppen Cholesterol und Meriva-Curcumin erkennbar. Die Wildtyptiere hingegen zeigen ein signifikant schnelleres Reaktionsverhalten als die anderen drei Gruppen.

Die CMT1a-Pathologie betrifft vor allem die großen motorischen Axone, die mit dem Hotplate-Test nicht direkt untersucht werden, sodass die nicht signifikanten Ergebnisse auf diese Tatsache zurückführbar sein können.

Die histologische Auswertung des *Nervus tibialis* wurde für die Cholesterol-Gruppe von L. Rasch vorgenommen. Hinsichtlich der Gesamtanzahl der Axone und der Anzahl myelinisierter Axone ist kein signifikanter Therapieeffekt sichtbar. Betrachtet man jedoch die Anzahl der demyelinisierten Axone, zeigt sich eine deutliche Reduzierung um 57 % im Vergleich zu den Placebotieren. Auch wenn das Wildtyptierniveau nicht erreicht wird, ist doch ein deutlicher Therapieeffekt sichtbar (Abb.23+24).

Die histologische Auswertung des Nervus tibialis für die Meriva-Curcumin-Gruppe wurde von T. Prukop vorgenommen. Hier war weder bezogen auf die Gesamtanzahl der Axone noch auf die Anzahl myelinisierter oder demyelinisierter Axone ein Effekt zu sehen (Abb.26). Diese Tatsache kann dadurch begründet sein, dass Meriva-Curcumin einen Effekt auf vorhandene Schwannzellen und deren Aufrechterhaltung hat, statt Einfluss auf die Bildung von Schwannzellen zuzunehmen (siehe unten).

Die elektrophysiologischen Daten wurden von R. Fledrich erhoben. Es wurden das proximale Muskelsummenaktionspotenzial und die Nervenleitgeschwindigkeit untersucht. Hinsichtlich der NLG ist auch nach 12 Wochen Therapie mit Cholesterol und Meriva-Curcumin keine signifikante Verbesserung feststellbar. Die NLG, die indirekt das Maß der Demyelinisierung widerspiegelt, sollte hier in Zukunft noch durch die g-Ratio-Auswertung (Verhältnis des Axondurchmessers zum

Myelinumfang) komplettiert werden, um eine definitive Aussage treffen zu können.

Im gleichen Zuge wie die NLG wurde auch das proximale Muskelsommenaktionspotenzial gemessen.

Auch wenn das proximale Muskelsommenaktionspotenzial der Meriva-Curcumin-Gruppe noch gut 2 mV niedriger als das der Wildtypiere ist, so ist es mit 1 mV Unterschied zur Placebogruppe signifikant verbessert (Abb.28). Die Cholesterolgegruppe zeigt keinen signifikanten Effekt.

Curcumin gilt in der Literatur als antiinflammatorisch, neuroprotektiv, antimikrobiell, antifungal, antiviral, chemoprotektiv und antioxidativ. Zudem ist es ungiftig und auch in hohen Dosen sehr gut verträglich (Hatcher et al. 2008; Zorofchian Moghadamtousi et al. 2014).

Curcumin hat bereits bei Trembler-J-Mausmodellen (CMT1-Modell) gezeigt, dass eine orale Verabreichung die Schwanzzellapoptose signifikant vermindert und eine gesteigerte Anzahl und Größe myelinsisierter Axone bewirken kann, was wiederum den Phänotyp verbessert. Gleichzeitig wurde das ER im *N. isch.* vom Zellstress befreit (Okamoto et al. 2013; Khajavi et al. 2007).

Die zelluläre Homöostase ist entscheidend und kann bei Ungleichgewicht wie z. B. der Ansammlung missgefalteter Proteine mit neurodegenerativen Erkrankungen assoziiert sein (Fortun et al. 2007). Verschiedene Kontrollmechanismen wie z. B. der gezielte Abbau durch UPS (*ubiquitin-proteasome system*) sollen dieses Verhindern (Goldberg 2003). Auch Lysosomen und Makrophagen tragen zur Aufrechterhaltung der Homöostase bei und lassen bei einer Anhäufung dieser Enzyme pathologische neurodegenerative Erkrankungen vermuten (Ciechanover and Brundin 2003).

Wird die Akkumulation von missgefalteten Proteinen im ER von den Transmembranrezeptoren PERK (*PKR-like ER kinase*), ATF6 (*activating transcription factor*) und IRE1 (*inositol-requiring enzyme*) bemerkt, so ist eine Aktivierung des UPR (*unfolded protein response*) zu beobachten, die den Zellstress vermindern soll. Kann dies nicht erreicht werden, so aktivieren PERK, AFT6 und IRE1 auch die Signalwege, die zum Zelltod führen (Jäger et al. 2012).

Das UPR triggerte in Versuchen mit Trembler-J-Mäusen die gesteigerte Regulation der Apoptose-Gene wie Caspase 1 und Fas, die demnach zur Schwannzellapoptose führten (Okamoto et al. 2013). Auch andere Studien mit CMT1b-Mausmodellen (MPZ-Mutation) zeigten, dass die UPR-Aktivierung der pathogene Mechanismus bei der Demyelinisierung sein kann (Pennuto et al. 2008; Saporta et al. 2012). Bei Curcumingabe wurde eine signifikante Verminderung des Expressionslevels von UPR-Komponenten im Vergleich zu der unbehandelten Placebogruppe verzeichnet (Okamoto et al. 2013).

Weiterhin wird vermutet, dass Curcumin und seine Derivate an einer Reihe weiterer Signalwege positiven Einfluss nehmen (Wang et al. 2011) wie z.B. mit modulierendem Einfluss auf Signalübertragungswege der Myelingenexpressionsregulation, direktem Einfluss auf Signaltransduktionswege der Neuronen, die den Wachstum der Schwannzellen stimulieren und den Axondurchmesser vergrößern (Khajavi et al. 2007; Okamoto et al. 2013). Ob ein vergrößerter Axondurchmesser und eine Verdickung der Myelinschicht auch nach der Gabe von Meriva-Curcumin und Cholesterol zu verzeichnen ist, muss durch histologische Auswertung und Erfassung der g-Ratio noch geklärt werden.

Mögliche Wirkmechanismen von Cholesterol auf die CMT1a-Pathologie lassen sich aus ähnlichen Studien im Bereich der degenerativen Neuropathien ableiten. Es wurde gezeigt, dass das Vorhandensein von Cholesterol als wichtiger Bestandteil des Myelins eine unerlässliche Rolle spielt und in einer möglichst physiologischen Stöchiometrie zu den anderen Myelinproteinen vorliegen muss (Saher et al. 2005). Somit könnte eine erhöhte Verfügbarkeit von Cholesterol der Hypomyelinisierung, wie bei der CMT1a-Pathologie beobachtet, entgegenwirken. Die Transkription von Myelinproteinen ist an das intrazelluläre Cholesterollevel gekoppelt und Schwannzellen sind in der Lage, Cholesterol aus ihrer Umgebung aufzunehmen und in Myelin einzubauen. Bei einem niedrigem Cholesterollevel sind Schwannzellen im PNS in der Lage, Cholesterol selbst zu synthetisieren (Saher et al. 2011; Fu et al. 1998), nur offensichtlich nicht in ausreichender Menge wenn Myelinprotein-Überexpression vorliegt, sodass externe Cholesterolzugabe dieses kompensieren könnte (Saher et al. 2012).

Gleichzeitig scheinen der Myelinisierungsprozess und die Cholesterolsynthese miteinander zu korrelieren. Cholesterolsynthese aktiviert Neuregulin1 in den Schwannzellen, sodass diese Myelin bilden und die 3-Hydroxy-3-Methylglutarylcoenzym A-Reduktase aktivieren. Die Reduktase ist das geschwindigkeitsbestimmende Enzym in der Cholesterolsynthese (Pertusa et al. 2007).

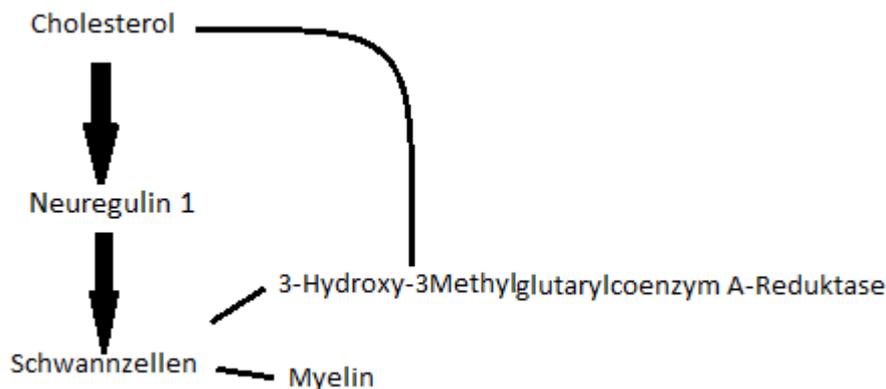


Abbildung 29: Transkriptionskontrolle der Cholesterolsynthese durch axonales Neuregulin1 (vereinfachte eigene Darstellung).

Dies könnte auch erklären, warum die Myelindicke proportional zur axonalen Konzentration von Neuregulin1 in Schwannzellen ist (Michailov et al. 2004; Taveggia et al. 2005)

Schwannzellapoptose wurde beobachtet, wenn viele mutierte und missgefaltete Proteine das ER-Kontrollsystem nicht verlassen können. Ein weiterer Wirkmechanismus von Cholesterolsynthese könnte Teil dieses Kontrollsystems sein, da Studien gewisse Hinweise darauf gaben, dass das periphere Hauptprotein P0 Cholesterolsynthese benötigt um das ER zu verlassen und die Myelinschicht zu erreichen. Mutantmäuse mit verminderter Cholesterolsynthese in den Schwannzellen, litten unter Hypomyelinisierung und undichten Myelinabschnitten (Saher et al. 2009).

Ist die Cholesterolsynthese durch z. B. Tellurium blockiert, konnte eine vermehrte Apoptose der Schwannzellen vermerkt werden (Berciano et al. 1998).

Denkbar ist also der Ansatz, dass sowohl Curcumin, als auch Cholesterolsynthese nicht direkt auf die PMP22-Regulierung Einfluss nehmen, sondern über die Stressbefreiung des ER die Schwannzellapoptoserate so verringern, sodass letztlich mehr Myelin gebildet werden kann.

Auch bei der Pelizaeus-Merzbacher-Krankheit (PMD), die durch eine Mutation des PLP (*proteolipid protein gene 1*) in den Oligodendrozyten des ZNS verursacht wird, wurde der Einfluss von Cholesterol untersucht. Das PLP ist das wichtigste Myelin-Protein im ZNS und spielt eine wichtige Rolle bei der Formation und Aufrechterhaltung der multilaminäre Struktur des Myelins.

Das PLP befindet sich in der Membranlipiddomäne. Es bindet Cholesterol, wobei das Cholesterollevel der geschwindigkeitslimitierende Faktor bei der Myelinsynthese im ZNS ist. Ist durch eine Mutation wie bei der PMD die PLP-Expression gesteigert, so findet man vermehrt PLP und Cholesterol in Endosomen und Lysosomen akkumuliert (Edgar et al. 2010; Krämer et al. 2001; Karim et al. 2007; Simons et al. 2002). Das dadurch veränderte intrazelluläre Cholesterollevel im ER minimiert scheinbar die endogene Cholesterolsynthese und beeinflusst den vesikulären Transport in der Zelle, was zu Akkumulation und Unordnung führt. Auch die Membranzusammensetzung scheint negativ beeinflusst (Bauer et al. 2009). Externe Cholesterolgabe scheint durch eine Verbesserung der Stöchiometrie zwischen PLP und Cholesterol in der Plasmamembran die blockierte Myelinisierung bei PMD-Mäusen zu helfen. Sobald PLP an genügend Cholesterol gebunden ist, wird es in die Myelinmembran integriert. Dieser Effekt hat zur Folge, dass das intrazelluläre Cholesterol- und PLP-Level reduziert wird und die eigene intrazelluläre Cholesterolsynthese wieder ansteigen lässt. Damit kann dies letztlich als wichtiger Bestandteil der Myelinschicht die Myelinmembransynthese vorantreiben und den Krankheitssymptomen entgegen wirken (Saher et al. 2012). Auch dieser Ansatz wäre bei der CMT1a denkbar.

Um dieses anschließend zu klären, sind die zukünftigen histologischen Auswertungen abzuwarten. Wie bei bei der Arbeitsgruppe von Saher (Saher et al. 2012) wäre mit einer normalen Anzahl an Schwannzellen zu rechnen sowie mit normalen Axondurchmessern und weniger großen Lysosomen.

5 Zusammenfassung

Die Charcot-Marie-Tooth-Krankheit (CMT) ist die am häufigsten auftretende hereditäre motorisch-sensible Neuropathien (HMSN) beim Menschen. Bedingt durch eine Duplikation des *PMP22*-Gens kommt es vor allem in den Schwannschen Zellen der peripheren motorischen Nerven zu Myelinisierungsstörungen (CMT1A). Durch die verminderte Reizweiterleitung und axonalen Verlust werden die entsprechenden Muskeln schlecht innerviert und atrophieren. Typische Symptome wie Ganganomalien und atrophierte Hand- und Beinmuskulatur sind die Folge. Da noch keine Therapie verfügbar ist, wird an verschiedenen Therapieansätzen geforscht. Hilfreich können hierbei Tiermodelle sein, die durch eine Genveränderung auch eine Duplikation von *PMP22* aufweisen. Die transgenen Tiere zeigen ähnliche Symptome wie das menschliche Krankheitsbild. Das Ziel meiner Arbeit bestand darin, die Wirkung von Cholesterol und Meriva-Curcumin auf den Phänotyp der CMT-Ratten zu untersuchen und Gewebeproben für zukünftige Untersuchungen zu gewinnen.

Sowohl Curcumin als auch Cholesterol haben bereits in der Vergangenheit einen positiven Einfluss auf unterschiedliche Neuropathien gezeigt.

Untersucht wurden insgesamt 72 Tiere, die in Wildtyp-, Placebo-, Cholesterol- und Meriva-Curcumin-Gruppe eingeteilt wurden. Sie bekamen die jeweilige Substanz dem Futter untergemischt bzw. normales Futter. Alle drei Wochen wurden Griffstärkemessungen an Vorder- und Hinterläufen durchgeführt und das Gewicht gemessen. Am Ende der Studie wurde zusätzlich ein Hotplate-Test vorgenommen sowie Gewebeproben entnommen und elektrophysiologische Daten (durch R. Fledrich) erhoben.

Das Gewicht aller Tiere wies zu keinem Zeitpunkt Schwankungen oder Auffälligkeiten auf, sodass von einer einheitlichen Futtermengenaufnahme ohne Nebenwirkungen auszugehen ist. Die Griffstärkemessungen an den Hinterläufen zeigten am Ende der Studie, dass die mit Cholesterol und Meriva-Curcumin behandelten Tiere signifikant stärker waren als die unbehandelten Placebo-Tiere. Damit wurde ein positiver Therapieeffekt auf den motorischen Phänotyp in CMT-Ratten nach-

gewiesen, ohne Wildtypniveau zu erreichen. Die Behandlung mit Cholesterol und Meriva-Curcumin hatte hingegen keine Therapieeffekte hinsichtlich der Muskelatrophie (Muskelmesseung des *Musculus tibialis cranialis*) sowie des sensorischen Phänotyps (Hotplate-Test). Die Bilder der Semidünnschnitte proximaler Nerven zeigen nur nach der Behandlung mit Cholesterol eine signifikant geringere Anzahl demyelinisierter Axone, nicht aber nach der Behandlung mit Meriva-Curcumin. Durch elektrophysiologische Versuche nach der Therapie konnten keine verbesserte NLG festgestellt werden. Die MSAP jedoch waren nach Behandlung mit Meriva-Curcumin signifikant verbessert. Die entnommenen Gewebeproben gilt es in Zukunft zu untersuchen, um weitere Aussagen zur Wirkweise der Substanzen treffen zu können. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Meriva-Curcumin und Cholesterol einen positiven Effekt auf den motorischen Phänotyp der CMT-Ratten hatten und weitere Untersuchungen den Weg zur Translation in CMT1A-Patienten vorbereiten können.

6 Literaturverzeichnis

- Aggarwal, B B, Sung, B (2009) Pharmacological basis for the role of curcumin in chronic diseases: an age-old spice with modern targets. *Trends Pharmacol Sci* 30(2), 85–94
- Aggarwal, B B, Sundaram, C, Malani, N, Ichikawa, H (2007) Curcumin: the Indian solid gold. *Adv Exp Med Biol* 595, 1–75
- Anand, P, Kunnumakkara, A B, Newmann, R A, Aggarwal B B (2007) Bioavailability of curcumin: problems and promises. *Mol Pharm* 4(6), 807–818
- Bauer, N, Richter-Landsberg, C, Ffrench-Constant, C (2009) Role of the oligodendroglial cytoskeleton in differentiation and myelination. *Glia* 57(16), 1691–1705
- Belcaro, G, Cesarone, M R, Dugall, M, Pellegrini, L, Ledda, A, Grossi, M G, Togni, S, Appendino, G (2010a) Product-evaluation registry of Meriva®, a curcumin-phosphatidylcholine complex, for the complementary management of osteoarthritis. *Panminerva Med* 52(2 Suppl 1), 55–62
- Belcaro, G, Cesarone, M R, Dugall, M, Pellegrini, L, Ledda, A, Grossi, M G, Togni, S, Appendino, G (2010b) Efficacy and safety of Meriva®, a curcumin-phosphatidylcholine complex, during extended administration in osteoarthritis patients. *Altern Med Rev* 15(4):337–344
- Berciano, M T Calle, E, Fernández, R, Lafarga, M (1998) Regulation of Schwann cell numbers in tellurium-induced neuropathy: apoptosis, supernumerary cells and internodal shortening. *Acta Neuropathol* 95(3), 269–279
- Bronstein, J M (2000) Function of tetraspan proteins in the myelin sheath. *Curr Opin Neurobiol* 10(5), 552–557
- Burns, J, Joseph, P D, Rose, K, Ryan, M M, Ovrier, R A (2009) Effect of oral curcumin on Déjérine-Sottas disease. *Pediatr Neurol* 41(4), 305–308
- Carenini, S, Neuberger, D, Schachner, M, Suter, U, Martini, R (1999) Localization and functional roles of PMP22 in peripheral nerves of P0-deficient mice. *Glia* 28(3), 256–264
- Chance, P F, Bird T P, Matsunami, N, Lensch, M W Brothman, A R, Feldmann, G M (1992) Trisomy 17p associated with Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 1A phenotype: evidence for gene dosage as a mechanism in CMT1A. *Neurology* 42(12), 2295–2299
- Ciechanover, A und Brundin, P (2003) The ubiquitin proteasome system in neurodegenerative diseases: sometimes the chicken, sometimes the egg. *Neuron* 40(2), 427–446
- Colby, J, Nicholson, R, Dickson, K M, Orfali, W, Naef, R, Suter, U, Snipes, G J (2000) PMP22 carrying the trembler or trembler-J mutation is intracellularly retained in myelinating Schwann cells. *Neurobiol Dis* 7(6 Pt B), 561–573
- Cuomo, J, Appendino, G, Dern, A d, Schneider, E, McKinnon, T P, Brown, M J, Togni, S, Dixon, B M (2011) Comparative absorption of a standardized curcuminoid mixture and its lecithin formulation. *J Nat Prod* 74(4), 664–669
- Dyck P J, Chance P, Lebo R, Carney J A: Hereditary Motor and Sensory Neuropathy. In: Dyck, P J, Thomas, P K (Hrsg.): *Peripheral Neuropathy*. Band 2. 3. Auflage; Saunders, Philadelphia 1993, 1094-1136

- Edgar, J M, McCulloch, M C, Montague, P, Brown, A M, Thilemann, S, Pratola, L, Gruenenfelder, F I, Griffiths, I R, Nave, K A (2010) Demyelination and axonal preservation in a transgenic mouse model of Pelizaeus-Merzbacher disease. *EMBO Mol Med* 2(2), 42–50
- Fabbretti, E, Edomi, P, Brancolini, C, Schneider, C (1995) Apoptotic phenotype induced by overexpression of wild-type gas3/PMP22: its relation to the demyelinating peripheral neuropathy CMT1A. *Genes Dev* 9(15), 1846–1856
- Fortun, J, Verrier, J D, Go, J C, Madorsky, I, Dunn, W A, Notterpek, L (2007) The formation of peripheral myelin protein 22 aggregates is hindered by the enhancement of autophagy and expression of cytoplasmic chaperones. *Neurobiol Dis* 25(2), 252–265
- Fu, Q, Goodrum, J F, Hayes, C, Hostettler, J D, Toews, A D, Morell, P (1998) Control of cholesterol biosynthesis in Schwann cells. *J neurochem* 71(2), 549–555
- Garbay, B, Heape, A, Sargueil, F, Cassagne, C (2000) Myelin synthesis in the peripheral nervous system. *Prog Neurobiol* 61(3), 267–304
- Goldberg, A L (2003) Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature* 426(6968), 895–899
- Harding, A E und Thomas, P K (1980) The clinical features of hereditary motor and sensory neuropathy types I and II. *Brain* 103(2), 259–280
- Hatcher, H, Planalp, R, Cho, J, Torti, F M, Torti, S V (2008) Curcumin: from ancient medicine to current clinical trials. *Cell Mol Life Sci* 65(11), 1631–1652
- Hattori, N, Yamamoto, M, Yoshihara, T, Koike, H, Nakagawa, M, Yoshikawa, H, Ohnishi, A, Hayasaka, K, Onodera, O, Baba, M et al. (2003) Demyelinating and axonal features of Charcot-Marie-Tooth disease with mutations of myelin-related proteins (PMP22, MPZ and Cx32): a clinicopathological study of 205 Japanese patients. *Brain* 126(Pt 1), 134–151
- Horn F in: *Biochemie des Menschen: Das Lehrbuch für das Medizinstudium*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2012
- Huxley, C, Passage, E, Manson, A, Putzu, G, Figarella-Branger, D, Pellissier, J F, Fontés, M (1996) Construction of a mouse model of Charcot-Marie-Tooth disease type 1A by pronuclear injection of human YAC DNA. *Hum Mol Genet* 5(5), 563–569
- Jäger, R, Bertrand M J M, Gorman, A M, Vandenabeele, P, Samali, A (2012) The unfolded protein response at the crossroads of cellular life and death during endoplasmic reticulum stress. *Biol Cell* 104(5), 259–270
- Jetten, A M, Suter, U (2000) The peripheral myelin protein 22 and epithelial membrane protein family. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 64, 97–129
- Karim, S A, Barrie, J A, McCulloch, M C, Montague, P, Edgar, J M, Kirkham, D, Anderson, T J, Nave, K A, Griffiths, I R, McLaughlin, M (2007) PLP overexpression perturbs myelin protein composition and myelination in a mouse model of Pelizaeus-Merzbacher disease. *Glia* 55(4), 341–351
- Katona, I, Wu, X, Feely, S, Sottile, S, Siskind, C E, Miller, L J, Shy, M E, Li, J (2009) PMP22 expression in dermal nerve myelin from patients with CMT1A. *Brain* 132(Pt 7), 1734–1740
- Khajavi, M, Inoue, K, Wiszniewski, W, Ohyama, T, Snipes, G J, Lupski, J R

- (2005) Curcumin treatment abrogates endoplasmic reticulum retention and aggregation-induced apoptosis associated with neuropathy-causing myelin protein zero-truncating mutants. *Am J Hum Genet* 77(5), 841–850
- Khajavi, M, Inoue, K, Wiszniewski, W, Ohyama, T, Snipes, G J, Lupski, J R (2007) Oral curcumin mitigates the clinical and neuropathologic phenotype of the Trembler-J mouse: a potential therapy for inherited neuropathy. *Am J Hum Genet* 81(3), 438–453
- Kidd, P M (2009) Bioavailability and activity of phytosome complexes from botanical polyphenols: the silymarin, curcumin, green tea, and grape seed extracts. *Altern Med Rev* 14(3), 226–246
- Krämer, E M, Schardt, A, Nave, K A (2001) Membrane traffic in myelinating oligodendrocytes. *Microsc Res Tech* 52(6), 656–671
- Lao, C D, Ruffin, M T, Normolle, D, Heath, D D, Murray, S I, Bailey, J M, Boggs, M E, Crowell, J, Rock, C L, Brenner, D E (2006) Dose escalation of a curcuminoid formulation. *BMC Complement Altern Med* 6, 10
- Lewis, R A, Li, J, Fuerst, D R, Shy, M E, Krajewski, K (2003) Motor unit number estimate of distal and proximal muscles in Charcot-Marie-Tooth disease. *Muscle Nerve* 28(2), 161–167
- Luft, J H (1961) Improvements in epoxy resin embedding methods. *J Biophys Biochem Cytol* 9, 409-414
- Lupski, J R, de Oca-Luna, R M, Slaugenhaupt, S, Pentao, L, Guzzetta, V, Trask, B J, Saucedo-Cardenas, O, Barker D F, Killian, J M, Garcia, C A et al. (1991) DNA duplication associated with Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Cell* 66(2), 219–232
- Lupski, J R, Wise, C A, Kuwano, A, Pentao, L, Parke, J T, Glaze, D G, Ledbetter, D H, Greenberg, F, Patel, P I (1992) Gene dosage is a mechanism for Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Nat genet* 1(1), 29–33
- Lüllmann-Rauch, R in: Taschenlehrbuch Histologie. Unter Mitarbeit von Paulsen F. 4. Auflage; Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2012
- Magyar, J P, Martini, R, Ruelicke, T, Aguzzi, A, Adlkofer, K, Dembic, Z, Zielasek, J, Toyka, K V, Suter, U (1996) Impaired differentiation of Schwann cells in transgenic mice with increased PMP22 gene dosage. *J Neurosci*: 16(17), 5351–5360
- Marczylo, T H, Verschoyle, R D, Cooke, D N, Morazzoni, P, Steward, W P, Gescher, A J (2007) Comparison of systemic availability of curcumin with that of curcumin formulated with phosphatidylcholine. *Cancer Chemother Pharmacol* 60(2), 171–177
- Meyer, O A, Tilson, H, Byrd, W, Riley, M T (1979) A method for the routine assessment of fore- and hindlimb grip strength of rats and mice. *Neurobehav toxicol* 1(3), 233–236
- Meyer zu Hörste, G, Sereda, M W (2005) Genetische Defekte der Myelinbildung: Molekulare Pathogenese der Charcot-Marie-Tooth Neuropathie (CMT1A). *Neuroforum* 1/05, 21-26
- Meyer zu Hörste, G, Prukop, T, Liebetanz, D, Mobius, W, Nave, K A, Sereda, M W (2007) Antiprogestosterone therapy uncouples axonal loss from demyelination in a transgenic rat model of CMT1A neuropathy. *Ann Neurol* 61(1), 61–72

- Michailov, G V, Sereda, M W, Brinkmann, B G, Fischer, T M, Haug, B, Birchmeier, C, Role, L, Lai, C, Schwab, M H, Nave, K A (2004) Axonal neuregulin-1 regulates myelin sheath thickness. *Science* 304(5671), 700–703
- Mullis, K, Faloona, F, Scharf, S, Saiki, R, Horn, G, Erlich, H (1992): Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction 1986. *Biotechnology* 24, 17–27
- Naef, R, Suter, U (1999) Impaired intracellular trafficking is a common disease mechanism of PMP22 point mutations in peripheral neuropathies. *Neurobiol Dis* 6(1), 1–14
- Nelis, E, Van Broeckhoven, C, De Jonghe, P, Löfgren, A, Vandenberghe, A, Latour, P, Le Guern, E, Brice, A, Mostacciolo, M L, Schiavon, F, Palau, F (1996) Estimation of the mutation frequencies in Charcot-Marie-Tooth disease type 1 and hereditary neuropathy with liability to pressure palsies: a European collaborative study. *Eur J Hum Genet* 4(1), 25–33
- Okamoto, Y, Pehlivan, D, Wiszniewski, W, Beck, C R, Snipes, G J, Lupski, J R, Khajavi, M (2013) Curcumin facilitates a transitory cellular stress response in Trembler-J mice. *Hum Mol Genet* 22(23), 4698–4705
- Palau, F, Löfgren, A, De Jonghe, P, Bort, S, Nelis, E, Sevilla, T, Martin, J J, Vilchez, J, Prieto, F, Van Broeckhoven, C (1993) Origin of the de novo duplication in Charcot-Marie-Tooth disease type 1A: unequal nonsister chromatid exchange during spermatogenesis. *Hum Mol Genet* 2(12), 2031–2035
- Pareyson, D, Scaiola, V, Laurà, M (2006) Clinical and electrophysiological aspects of Charcot-Marie-Tooth disease. *Neuromol Med* 8(1-2), 3-22
- Patzkó, A, Shy, M E (2011) Update on Charcot-Marie-Tooth disease. *Curr Neurol Neurosci Rep* 11(1), 78–88
- Patzkó, A, Bai, Y, Saporta, M A, Katona, I, Wu, X, Vizzuso, D, Feltri, M L, Wang, S, Dillon, L M, Kamholz, J, Kirschner, D (2012) Curcumin derivatives promote Schwann cell differentiation and improve neuropathy in R98C CMT1B mice. *Brain* 135(Pt 12), 3551–3566
- Pennuto, M, Tinelli, E, Malaguti, M, Del Carro, U, D'Antonio, M, Ron, D, Quattrini, A, Feltri, M L, Wrabetz, L (2008) Ablation of the UPR-mediator CHOP restores motor function and reduces demyelination in Charcot-Marie-Tooth 1B mice. *Neuron* 57(3), 393–405
- Pertusa, M, Morenilla-Palao, C, Carteron, C, Viana, F, Cabedo, H (2007) Transcriptional control of cholesterol biosynthesis in Schwann cells by axonal neuregulin 1. *J Biol Chem* 282(39), 28768–28778
- Quarles, R H (1997) Glycoproteins of myelin sheaths. *J Mol Neurosci* 8(1), 1–12.
- Richardson, K C, Jarett, L, Finke, E H (1960) Embedding in epoxy resins for ultrathin sectioning in electron microscopy. *Stain Technol* 35, 313-23
- Rossor, A M, Polke, J, Houlden, H, Reilly, M M (2013) Clinical implications of genetic advances in Charcot-Marie-Tooth disease. *Nat Rev Neurol* 9(10), 562–571
- Saher, G, Brügger, B, Lappe-Siefke, C, Möbius, W, Tozawa, R, Wehr, M C, Wieland, F, Ishibashi, S, Nave, K A (2005) High cholesterol level is essential for myelin membrane growth. *Nat Neurosci* 8(4), 468–475
- Saher, G, Quintes, S, Möbius, W, Wehr, M C, Krämer-Albers, E M, Brügger, B,

- Nave, K A (2009) Cholesterol regulates the endoplasmic reticulum exit of the major membrane protein P0 required for peripheral myelin compaction. *J Neurosci* 29(19), 6094–6104
- Saher, G, Quintes, S, Nave, K A (2011) Cholesterol: a novel regulatory role in myelin formation. *Neuroscientist* 17(1), 79–93
- Saher, G, Rudolphi, F, Corthals, K, Ruhwedel, T, Schmidt, K F, Löwel, S, Dibaj, P, Barrette, B, Möbius, W, Nave, K A (2012) Therapy of Pelizaeus-Merzbacher disease in mice by feeding a cholesterol-enriched diet. *Nat Med* 18(7), 1130–1135
- Sancho, S, Young, P, Suter, U (2001) Regulation of Schwann cell proliferation and apoptosis in PMP22-deficient mice and mouse models of Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Brain* 124(Pt 11), 2177–2187
- Saporta, M A C, Shy, B R, Patzko, A, Bai, Y, Pennuto, M, Ferri, C, Tinelli, E, Saveri, P, Kirschner, D, Crowther, M et al. (2012) MpzR98C arrests Schwann cell development in a mouse model of early-onset Charcot-Marie-Tooth disease type 1B. *Brain* 135(Pt 7), 2032–2047
- Schultz R L, Karlsson U (1965) Fixation of the Central Nervous System for Electron Microscopy by Aldehyde Perfusion. II. Effect of Osmolarity, Ph of Perfusate, and Fixative Concentration. *J Ultrastruct Res* 12, 187-206
- Semalty, A, Semalty, M, Rawat, M S M, Franceschi, F (2010) Supramolecular phospholipids-polyphenolics interactions: the PHYTOSOME strategy to improve the bioavailability of phytochemicals. *Fitoterapia* 81(5), 306–314
- Sereda, M, Griffiths, I, Pühlhofer, A, Stewart, H, Rossner, M J, Zimmerman, F, Magyar, J P, Schneider, A, Hund, E, Meinck, H M et al. (1996) A transgenic rat model of Charcot-Marie-Tooth disease. *Neuron* 16(5), 1049–1060
- Sereda, M, Meyer zu Hörste, G, Suter, U, Uzma, N, Nave, K A (2003) Therapeutic administration of progesterone antagonist in a model of Charcot-Marie-Tooth disease (CMT-1A). *Nat Med* 9(12), 1533–1537
- Shy, M E, Patzkó, A (2011) Axonal Charcot-Marie-Tooth disease. *Curr Opin Neurol* 24(5), 475-483
- Shy M E, Lupski, J R, Chance P F, Klein C J, Dyck P J. (2005) Hereditary Motor and Sensory Neuropathies: An Overview of Clinical, Genetic, Electrophysiologic, and Pathologic Features. In: Dyck, P J, Thomas, P K (Hrsg.): *Peripheral Neuropathy*. Band 2. 4. Auflage; Saunders, Philadelphia 2005, 1623 – 1658
- Simons, M, Kramer, E M, Macchi, P, Rathke-Hartlieb, S, Trotter, J, Nave, K A, Schulz, J B (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(2), 327–336
- Singh, D K, Rosenhouse-Dantsker, A, Nichols, C G, Enkvetchakul, D, Levitan, I (2009) Direct Regulation of Prokaryotic Kir Channel by Cholesterol. *J Biol Chem* 284(44), 30727-30736
- Steigerwalt, R, Nebbioso, M, Appendino, G, Belcaro, G, Ciammaichella, G, Cornelli, U, Luzzi, R, Togni, S, Dugall, M, Cesarone, M R et al. (2012) Meriva®, a lecithinized curcumin delivery system, in diabetic microangiopathy and retinopathy. *Panminerva Med.* 54(1 Suppl 4), 11–16
- Taveggia, C, Zanazzi, G, Petrylak, A, Yano, H, Rosenbluth, J, Einheber, S, Xu, X,

- Esper, R M, Loeb, J A, Shrager, P, et al. (2005) Neuregulin-1 type III determines the ensheathment fate of axons. *Neuron* 47(5), 681–694
- Thomas, P K, Marques, W, Davis, M B, Sweeney, M G, King, R H, Bradley, J L, Muddle, J R, Tyson, J, Malcolm, S, Harding, A E (1997) The phenotypic manifestations of chromosome 17p11.2 duplication. *Brain* 120(Pt 3), 465–478
- Trepel, M: *Neuroanatomie: Struktur und Funktion*. Urban&Schwarzenberg, München 1995
- Vallat, J M, Sindou, P, Preux, P M, Tabaraud, F, Milor, A M, Couratier, P, LeGuern, E, Brice, A (1996) Ultrastructural PMP22 expression in inherited demyelinating neuropathies. *Ann Neurol* 39(6), 813–817
- Wang, Y, Xiao, J, Zhou, H, Yang, S, Wu, X, Jiang, C, Zhao, Y, Liang, D, Li, X, Liang, G (2011) A novel monocarbonyl analogue of curcumin, (1E,4E)-1,5-bis(2,3-dimethoxyphenyl)penta-1,4-dien-3-one, induced cancer cell H460 apoptosis via activation of endoplasmic reticulum stress signaling pathway. *J Med Chem* 54(11), 3768–3778
- Werner, H, Jung, M, Klugmann, M, Sereda, M, Griffiths, I R, Nave, K A (1998) Mouse models of myelin diseases. *Brain Pathol* 8(4), 771–793
- Wise, C A, Garcia, C A, Davis, S N, Heju, Z, Pentao, L, Patel, P I, Lupski, J R (1993) Molecular analyses of unrelated Charcot-Marie-Tooth (CMT) disease patients suggest a high frequency of the CMT1A duplication. *Am J Hum Genet* 53(4), 853–863
- Yoshikawa, H, Nishimura, T, Nakatsuji, Y, Fujimura, H, Himoro, M, Hayasaka, K, Sakoda, S, Yanagihara, T (1994) Elevated expression of messenger RNA for peripheral myelin protein 22 in biopsied peripheral nerves of patients with Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Ann Neurol* 35(4), 445–450
- Zorofchian Moghamdamtousi, S, Abdul Kadir, H, Hassandarvish, P, Tajik, H, Abubakar, S, Zandi, K (2014) A Review on Antibacterial, Antiviral, and Antifungal Activity of Curcumin. *Biomed Res Int*. 2014,186864

<http://www.phytosomes.info/public/meriva.asp> (08/2011).

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Schematische Darstellung eines Neurons.....	2
Abbildung 2:	Schematische Darstellung der CMT1a.....	5
Abbildung 3:	Klinische Symptome der CMT-Erkrankung.....	6
Abbildung 4:	Struktur des Curcumins.....	8
Abbildung 5:	Chemische Struktur von Cholesterol.....	9
Abbildung 6:	Ohrlochcode der Ratten.....	12
Abbildung 7:	Schematischer Studienverlauf.....	14
Abbildung 8:	Phänotypisierung der Ratten.....	15
Abbildung 9:	Gerät zur Messung der Griffstärke.....	15
Abbildung 10:	Heizplatte für den Hotplate-Test.....	16
Abbildung 11:	Ergebnisse bei der Agarose-Gelelektrophorese.....	27
Abbildung 12:	Lichtmikroskopische Aufnahmen des <i>Nervus tibialis cranialis</i> ...	31
Abbildung 13:	Gewichtszunahme aller Studientiere in g über die Zeit nach Gruppen eingeteilt.....	32
Abbildung 14:	Griffstärkebestimmung der Vorderläufe.....	34
Abbildung 15:	Griffstärkebestimmung der Vorderläufe an p26 (Therapiebeginn).....	35
Abbildung 16:	Griffstärkebestimmung der Vorderläufe an p112.....	36
Abbildung 17:	Griffstärkebestimmung der Hinterläufe.....	37
Abbildung 18:	Griffstärkebestimmung zu Therapiebeginn an p26.....	38
Abbildung 19:	Griffstärkebestimmung der Hinterläufe an p112.....	39
Abbildung 20:	Hotplate-Test.....	41
Abbildung 21:	Messung des Gewichtes des <i>Musculus tibialis cranialis</i> in g.....	42
Abbildung 22:	Lichtmikroskopische Aufnahmen des <i>Nervus tibialis cranialis</i> ...	43
Abbildung 23:	Histologische Auswertung des <i>Nervus tibialis</i>	45
Abbildung 24:	Anzahl deymelinisierter Axone nach Behandlung mit Cholesterol.....	46
Abbildung 25:	Histologische Auswertung des <i>Nervus tibialis</i> nach Meriva-Curcumin-Behandlung.....	47

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 26: Anzahl demyelinisierter Axone nach Behandlung mit Meriva-Curcumin.....	48
Abbildung 27: Nervenleitgeschwindigkeit nach Behandlung zum Therapieende an p112.....	50
Abbildung 28: Muskelsummenaktionspotenzial proximal an p112	52
Abbildung 29: Transkriptionskontrolle der Cholesterol-Biosynthese durch axonales Neuregulin1 (vereinfachte eigene Darstellung)	58

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Verbrauchsmaterialien	19
Tabelle 2:	Chemikalien und Substanzen	20
Tabelle 3:	Geräte.....	21
Tabelle 4:	Nukleinsäuren.....	22
Tabelle 5:	Mittelwerte des Gewichtes in Gramm mit jeweiliger SD zu den Zeitpunkten p26, p72, p91 und p112.	34
Tabelle 6:	Mittelwerte der Axonanzählung des <i>Nervus tibialis</i> (Cholesterol) mit SD	45
Tabelle 7:	Mittelwerte der Axonanzählung des <i>Nervus tibialis</i> (Meriva-Curcumin) mit SD	49
Tabelle 8:	Absolutwerte der Nervenleitgeschwindigkeit in m/s und SD	51
Tabelle 9:	Absolutwerte des Muskelsummenaktionspotenzials mit SD	53

Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater Herrn Prof. M.W. Sereda für die Betreuung, die Überlassung des Themas und tatkräftige Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. K.-A. Nave und dem gesamten Max-Planck-Institut danke ich für die Bereitstellung der Arbeitsmaterialien und den Zugang zu diversen Räumlichkeiten.

Besonderer Dank geht an Herrn Dr. med. T. Prukop, Herrn Dr. rer. nat. R. Fledrich, Herrn Dr. med. B. Weiss, Frau B.sc. M. Rudolph und Herrn cand. med. dent. L. Rasch für die großartige Unterstützung der Therapievorbereitung, der Durchführung und Nachbearbeitung der Experimente, sowie an Herrn M.sc. Arne Glüer für die Korrektur.

Herrn Libald und Frau Wehe danke ich für die ausgezeichnete Zusammenarbeit hinsichtlich der Versuchstiere und deren Haltung und Pflege.

Den Kollegen der Abteilung Neurogenetik des Max-Planck-Instituts für Experimentelle Medizin danke ich für die fachliche Unterstützung und die kollegiale Arbeitsatmosphäre.

Lebenslauf

Ich wurde am 18.03.1988 in Göttingen geboren. Die schulische Ausbildung begann an der Hermann-Nohl-Schule, Göttingen, und endete mit der Allgemeinen Hochschulreife am Felix-Klein-Gymnasium, Göttingen.

Von Juli 2007 bis März 2008 absolvierte ich einen Auslandsaufenthalt in den USA.

Im April 2008 begann ich das Studium der Zahnmedizin in Göttingen. Mit der Zahnärztlichen Prüfung im Juli 2013 beendete ich das Studium mit der Note 1.

Meine wissenschaftliche Arbeit begann 2011 am Max-Planck-Institut für Experimentelle Medizin Göttingen in der Abteilung Neurogenetik (*Direktor: Prof. Dr. rer. nat. K.-A.Nave*) in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. M. Sereda. Meine experimentelle Doktorarbeit mit dem Titel „Experimentelle Studie eines transgenen Tiermodells der Charcot-Marie-Tooth-Krankheit mit Meriva-Curcumin und Cholesterol“ wurde unter der Leitung von Prof.Dr. med. M. Sereda durchgeführt.

Seit Oktober 2013 arbeite ich als Assistenz Zahnärztin in der Praxis Dres. Koch, Fricke und Umlauf in Witzenhausen.