

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

# **Der Einfluss von Lithium auf die Myelinisierung im peripheren Nervensystem**

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von

**Tobias Nientiedt**

aus

Kassel

Göttingen 2021

Dekan:	Prof. Dr. med. W. Brück
Referent/in:	Prof. Dr. med. M. W. Sereda
Ko-Referent/in:	Prof. Dr. med. Thomas Dresbach
Drittreferent/in:	Prof. Dr. mult. Thomas Meyer

Datum der mündlichen Prüfung: 27.01.2022

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Der Einfluss von Lithium auf die Myelinisierung im peripheren Nervensystem" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Mannheim, den .....

.....

(Unterschrift)

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>III</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>IV</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>V</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Myelinisierung im peripheren Nervensystem .....	2
1.2 Charcot-Marie-Tooth-Erkrankung (CMT).....	2
1.2.1 Charcot-Marie-Tooth-Erkrankung Typ 1A (CMT1A).....	4
1.2.2 Peripheres Myelinprotein 22 (PMP22).....	5
1.2.3 Tiermodelle der CMT .....	6
1.3 Experimentelle Therapien der CMT1A .....	7
1.4 Lithium.....	8
1.4.1 Einsatz von Lithium in der Medizin.....	8
1.4.2 Einfluss von Lithium auf die Myelinisierung im peripheren und zentralen Nervensystem.....	9
1.5 Ziele der Arbeit.....	9
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>11</b>
2.1 Material.....	11
2.1.1 Chemikalien und Bioreagenzien.....	11
2.1.2 Verbrauchsmaterial .....	13
2.1.3 Geräte .....	14
2.1.4 Reaktionkomplettausstattungen.....	16
2.1.5 Lösungen und Puffer .....	17
2.1.6 Nukleinsäuren und Nukleotide .....	20
2.1.7 Antikörper .....	23
2.1.8 Software .....	24
2.2 Methoden.....	24
2.2.1 Versuchstiere.....	24
2.2.2 Lichtmikroskopie und Elektronenmikroskopie.....	27
2.2.3 Zellkultur .....	29
2.2.4 Molekularbiologie.....	31
<b>3 Ergebnisse.....</b>	<b>36</b>
3.1 Einfluss von Lithium auf die Myelinisierung im peripheren Nervensystem von Wildtyp-Ratten .....	36
3.1.1 Histologische Analyse von Tibialisnerven.....	37
3.1.2 Genexpressionsanalysen aus RNA-Isolaten von Ischiasnerven .....	39
3.1.3 Proteinanalysen aus Proteinlysaten von Ischiasnerven .....	40
3.2 Einfluss von Lithium auf die Schwanzzell-Differenzierung und Myelinisierung in vitro.....	43

---

3.2.1	Genexpressionsanalysen aus primären Schwannzell-Kulturen.....	43
3.2.2	Myelinisierung in Schwannzell-DRG-Neuron-Co-Kulturen.....	45
3.3	Therapieversuch mit Lithium im transgenen Rattenmodell der CMT1A .....	47
3.3.1	Phänotypische Untersuchung <i>Pmp22</i> -transgener Ratten.....	48
3.3.2	Elektrophysiologische Untersuchung an Schwanznerven <i>Pmp22</i> -transgener Ratten....	49
3.3.3	Histologische Untersuchung von Tibialisnerven <i>Pmp22</i> -transgener Ratten .....	51
3.3.4	Genexpressionsanalysen aus RNA-Isolaten von Ischiasnerven <i>Pmp22</i> -transgener Ratten .....	53
3.3.5	Proteinanalyse aus Proteinlysaten von Ischiasnerven <i>Pmp22</i> -transgener Ratten .....	55
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>57</b>
4.1	Einfluss von Lithium auf die Myelinisierung in Wildtyp-Ratten .....	57
4.2	Einfluss von Lithium auf den Phänotyp und die Myelinisierung in einem transgenen Rattenmodell der CMT1A .....	61
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>66</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>68</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Behandlung von Wildtyp-Ratten mit Lithium. ....	36
Abbildung 2: Gewicht und Serum-Lithiumkonzentration in Wildtyp-Ratten nach Lithiumbehandlung. ....	37
Abbildung 3: Histologische Analyse der relativen Myelindicke (g-ratio) in Tibialisnerven von Wildtyp-Ratten nach Lithiumbehandlung.....	38
Abbildung 4: Histologische Analyse der Myelinkompaktierung in Tibialisnerven von Wildtyp-Ratten nach Lithiumbehandlung. ....	39
Abbildung 5: Genexpressionsanalysen aus Ischiasnerven von Wildtyp-Ratten nach Lithiumbehandlung. ....	40
Abbildung 6: Proteinanalyse aus Ischiasnerven von adulten Wildtyp-Ratten nach Lithiumbehandlung. ....	42
Abbildung 7: Genexpressionsanalysen aus primären Schwannzell-Kulturen unter dem Einfluss von 1 mM Lithiumcarbonat und Forskolin.....	44
Abbildung 8: Genexpressionsanalysen aus primären Schwannzell-Kulturen unter dem Einfluss von 1 mM und 5 mM Lithiumcarbonat und Forskolin. ....	45
Abbildung 9: Histologische Analyse der Myelinisierung von Schwannzell-DRG-Neuron-Co-Kulturen nach Lithiumbehandlung.....	46
Abbildung 10: Schematische Darstellung der Lithiumbehandlung von <i>Pmp22</i> -transgenen Ratten.....	47
Abbildung 11: Gewichtsverlauf bei <i>Pmp22</i> -transgenen Ratten nach Lithiumbehandlung. ....	48
Abbildung 12: Verlauf der Griffstärke von Vorder- und Hinterläufen bei <i>Pmp22</i> -transgenen Ratten nach Lithiumbehandlung. ....	49
Abbildung 13: Messung der motorischen und sensiblen NLG bei <i>Pmp22</i> -transgenen Ratten nach Lithiumbehandlung.....	50
Abbildung 14: Histologische Analyse der Anzahl myelinisierter und demyelinisierter Axone in Tibialisnerven von <i>Pmp22</i> -transgenen Ratten nach Lithiumbehandlung.....	51
Abbildung 15: Histologische Analyse der relativen Myelindicke (g-ratio) in Tibialisnerven von <i>Pmp22</i> -transgenen Ratten nach Lithiumbehandlung.....	52
Abbildung 16: Genexpressionsanalysen aus Ischiasnerven von <i>Pmp22</i> -transgenen Ratten nach Lithiumbehandlung. ....	55
Abbildung 17: Proteinanalyse aus Ischiasnerven von <i>Pmp22</i> -transgenen Ratten nach Lithiumbehandlung. ....	56

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Einteilung der CMT nach Lupski et al. (2010) .....	3
Tabelle 2: Unterteilung der CMT/HSMN1 modifiziert nach Suter und Scherer (2003) .....	4
Tabelle 3: Chemikalien und Bioreagenzien .....	11
Tabelle 4: Verbrauchsmaterial .....	13
Tabelle 5: Geräte .....	14
Tabelle 6: Reaktionskomplettausstattungen .....	16
Tabelle 7: Lösungen und Puffer .....	17
Tabelle 8: Primer zur Genotypisierung transgener Ratten .....	20
Tabelle 9: Primer für qRT-PCR .....	21
Tabelle 10: Antikörper .....	23
Tabelle 11: Software .....	24
Tabelle 12: Protokoll Epon-Einbettung von Gewebe zur Licht- und Elektronenmikroskopie .....	27
Tabelle 13: Protokoll Genotypisierungs-PCR für <i>Pmp22</i> -transgene Tiere .....	32
Tabelle 14: Protokoll qRT-PCR für Genexpressionsanalysen .....	34

## Abkürzungsverzeichnis

BDNF	<i>brain-derived neurotrophic factor</i>
BSA	bovines Serumalbumin
cAMP	zyklisches Adenosin-Monophosphat
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CMT	Charcot-Marie-Tooth-Erkrankung
Cx43	Connexin 43
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
DDSA	2-Duodecanyl-succinicacidanhydrid
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>enhanced chemoluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Egr2	<i>Early growth response 2</i>
ERK	<i>extracellular signal regulated kinase</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
Gas3	<i>growth arrest specific gene 3</i>
Gsk3b	Glykogensynthasekinase 3 beta
HMNS1A	Hereditäre motorisch sensible Neuropathie Typ 1A
HNPP	<i>hereditary neuropathy with liability to pressure palsies</i>
HRP	<i>horse radish peroxidase</i>
KG	Körpergewicht
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MBP	basisches Myelinprotein
MGB	modifizierter Gitschier Puffer
MOPS	3-Morpholino-1-propansulfonsäure
MPZ	Myelinprotein 0
mRNA	messenger RNA
MSAP	Muskelsummenaktionspotential
NLG	Nervenleitgeschwindigkeit
Nrg1 Typ III	Neuregulin 1 Typ III
ns	nicht signifikant
Oaz1	<i>ornithine decarboxylase antizyme 1</i>
p	postnataler Tag
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PLL	Poly-L-Lysin



---

PMP22	peripheres Myelinprotein 22 kDa
POU3F1	<i>POU domain, class 3, transcription factor 1</i>
Prx	Periaxin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
p75NTR	<i>p75 neurotrophin receptor</i>
qRT-PCR	semiquantitative Real-Time-PCR
RNA	Ribonukleinsäure
Rplp0	<i>60S acidic ribosomal protein P0</i>
Scap	<i>Sterol regulatory element-binding protein cleavage activating protein</i>
SDS	Natrium-Dodecyl-Sulfat
Stdabw.	Standardabweichung
TAE	Tris-Acetat Puffer
TBS	Tris-Base-Salzpuffer
TrkB	<i>tropomyosin-related kinase receptor B</i>
Tuj1	<i>neuron-specific class III <math>\beta</math>-tubulin</i>

## 1 Einleitung

Das Nervensystem von Lebewesen ist ein komplexes Organ, das zur Reizwahrnehmung, Weiterleitung und Verarbeitung dient. Es besteht aus untereinander vernetzten Nervenzellen und Gliazellen. Während in primitiveren Lebensformen wie Nesseltieren oder Fadenwürmern homogene Nervennetze oder strangförmige Nervensysteme bestehen, kommt es bei höheren Lebensformen zu einer zunehmenden Spezialisierung von bestimmten Nervenzellen mit Ausbildung übergeordneter Zentren. Gliederfüßer bilden z. B. bereits ein metameres (strickleiterartiges) Nervensystem mit Cerebralganglien als zentrale Steuereinheiten. Mit der Evolution fand eine zunehmende Cephalisation mit Ausbildung eines Gehirns statt. Bei höher entwickelten Lebensformen wie den Kopffüßern kommt es zu einer Trennung in zentrales Nervensystem, bestehend aus Gehirn und Rückenmark, und peripheres Nervensystem, wobei eine starre Trennung nach topographischer Lage nicht immer sinnvoll ist. So haben die motorischen Neurone ihr Soma im Rückenmark, ihre Axone ziehen jedoch in die Peripherie und gehören damit zum peripheren Nervensystem. Umgekehrt haben die sensiblen Neurone ihr Soma im peripheren Nervensystem, ihre Axone bilden unter anderem die Vorder- und Seitenstrangbahnen des Rückenmarks und gehören damit zum zentralen Nervensystem. Histologisch teilt sich das Nervensystem in Nervenzellen, die Neurone, sowie in die Gliazellen. Die Neurone bilden die funktionellen Einheiten des Nervensystems. Sie bestehen aus einem Zellkörper, dem Soma sowie Nervenzellfortsätzen. Im Soma finden fast alle wichtigen Stoffwechselprozesse statt. Stoffwechselprodukte werden aus dem Soma in die Nervenzellfortsätze transportiert. Die Nervenzellfortsätze lassen sich in das Axon sowie in Dendriten aufteilen. Dabei kann jedes Neuron mehrere Dendriten, jedoch nur ein Axon besitzen. Die Dendriten dienen dabei als Afferenz, nehmen also Signale auf oder wirken modulierend, die Axone bilden die Efferenz und dienen damit der Reizweiterleitung. An ihrem Ende befinden sich die synaptischen Endknöpfe, die zusammen mit der Zellmembran der nachfolgenden Zelle die Synapse, den Ort der Signalübertragung, bilden (Trepel 2004). Die axonalen Fortsätze einer Nervenzelle werden vom Nervenzellkörper bis hin zur Synapse von Gliazellen eingehüllt. Während kleine Axone nur von dem glialen Zytoplasma sowie der Zellmembran umgeben sind, bildet sich um größere Axone eine so genannte Myelinscheide. Hierbei handelt es sich um eine mehrschichtige Membranhülle, die ebenfalls von Gliazellen gebildet wird. Diese Gliazellen sind im zentralen Nervensystem die Oligodendrozyten, im peripheren Nervensystem wird diese Aufgabe von den Schwannzellen übernommen. Die Myelinscheide ist zum einen die Grundlage der schnellen saltatorischen Erregungsleitung in myelinisierten Nerven, zum anderen trägt die Myelinscheide zur Beibehaltung der axonalen Integrität bei und induziert über Signale der myelinisierenden Gliazellen z. B. die Verteilung von Ionenkanälen in der Zellwand des Axons (Schafer und Rasband 2006).

## 1.1 Myelinisierung im peripheren Nervensystem

Myelin ist eine spezialisierte Zellmembran, die von den myelinisierenden Gliazellen, im peripheren Nervensystem den Schwannzellen, produziert wird. Während der Entwicklung des peripheren Nervensystems bilden sich aus Zellen der Neuralleiste Schwannzell-Vorläuferzellen, die sich wiederum zu unreifen Schwannzellen entwickeln (Jessen und Mirsky 2005). Abhängig vom Durchmesser des Axons, mit dem die unreife Schwannzelle assoziiert ist, und der damit verbundenen Menge an axonal präsentiertem Neuregulin 1 Typ III (Nrg1 Typ III), werden Schwannzellen, die ein großes Axon umhüllen (Axone  $>1 \mu\text{m}$ ), zu myelinisierenden Schwannzellen, während Schwannzellen die mehrere Axone  $<1 \mu\text{m}$  Durchmesser in sogenannten Remak-Bündeln umgeben, in einem nicht-myelinisierenden Stadium verbleiben (Taveggia et al. 2005). Im Rahmen des sogenannten *radial sorting* gehen die myelinisierenden Schwannzellen ein 1:1 Verhältnis mit den Axonen des peripheren Nervensystems ein. Diese Schwannzellen erhalten unter Ausbildung einer Basalmembran sowie in der Interaktion mit dem Axon eine radiale und longitudinale Polarität, die für den Beginn der Myelinisierung essentiell ist (Salzer 2003; Simons und Trotter 2007). Die Schwannzellen produzieren große Mengen von spezifischen Myelinproteinen wie basisches Myelinprotein (MBP), Myelinprotein 0 (MPZ) und peripheres Myelinprotein 22 kDa (PMP22) sowie von Phospholipiden, Glycosphingolipiden und Cholesterol die mit 70 % einen hohen Teil der Myelinmasse ausmachen. Myelinproteine und Lipide werden an die Zelloberfläche transportiert, interagieren in einer einzigartigen Weise miteinander und werden in die Zellmembran eingebaut. Bunge et al. konnten bereits 1989 zeigen, dass es zu einem Wachstum des inneren axonnahen Schwannzell-Fortsatz kommt, der das Axon spiralförmig umgibt. Dabei wird die Zellmembran viele Male um das Axon gewickelt und bildet so die Myelinscheide (Simons und Trotter 2007).

## 1.2 Charcot-Marie-Tooth-Erkrankung (CMT)

Neuropathien sind eine uneinheitliche Gruppe von Erkrankungen des peripheren Nervensystems. Diese können entweder an einem einzelnen Nerven (Mononeuropathie) oder an mehreren Nerven (Polyneuropathie) auftreten. Klinisch können sich periphere Neuropathien durch Sensibilitätsstörungen und Störungen der Motorik sowie Beeinträchtigung der Muskeleigenreflexe äußern. Neurographisch zeigen sich eine Einschränkung der Nervenleitgeschwindigkeit (NLG) oder der Muskelsummenaktionspotentiale (MSAP). Die peripheren Neuropathien können in Axonopathien, das heißt Schädigungen des Axons bei erhaltener Nervenscheide und Myelinopathien, Störungen der Myelinscheide bei zunächst erhaltenem Axon, unterschieden werden. Neben der Einteilung nach Lokalisation der Schädigung ist auch eine Einteilung nach der Ätiologie der Schädigung möglich. So können die peripheren Neuropathien nach ihrer Ursache in primäre und sekundäre Neuropathien eingeteilt werden. Während die primären Neuropathien in der Regel genetisch bedingt sind, können die sekundären Neuropathien eine große Zahl an Ursachen haben. Die häufigsten Gründe für eine

sekundäre Neuropathie sind metabolische Erkrankungen wie Diabetes mellitus, neurotoxische Substanzen wie Ethanol, zyklische Kohlenwasserstoffe oder Chemotherapeutika sowie autoimmunologische Erkrankungen wie das Guillain-Barré-Syndrom.

Die Charcot-Marie-Tooth (CMT)-Erkrankungen oder hereditäre motorisch sensible Neuropathie (HMSN) ist ein Oberbegriff für eine genetisch und klinisch heterogene Gruppe erblich bedingter Neuropathien. Mit einer Inzidenz von 1:2500 (Skre 1974; Krajewski et al. 2000) ist sie die häufigste genetisch bedingte Erkrankung des peripheren Nervensystems. Das Krankheitsbild wurde nach den Erstbeschreibern im Jahr 1886, dem französischen Pathologen Jean-Martin Charcot und dem Neurologen Pierre Marie, sowie dem britischen Neurologen Howard Henry Tooth benannt. CMT kann nach dem betroffenen Gen in verschiedene Typen und Untertypen eingeteilt werden (Lupski et al. 2010).

**Tabelle 1: Einteilung der CMT nach Lupski et al. (2010)**

Typ	Name
CMT/HMSN1	demyelinisierende Form
CMT/HMSN2	axonale Form
CMT/HMSN3	Déjerine-Sottas-Syndrom
CMT/HMSN4	Morbus Refsum
CMT/HMSN5	spastische Paraplegie mit Amyotrophie
CMT/HMSN6	hereditäre motorisch sensible Neuropathie mit optischer Atrophie
CMT/HMSN7	hereditäre motorisch sensible Neuropathie mit Retinitis pigmentosa

Klassifikation der wichtigsten demyelinisierenden, hereditären Neuropathien. Abkürzungen: CMT Charcot-Marie-Tooth-Erkrankung, HMSN Hereditäre motorisch sensible Neuropathie. Modifiziert nach Lupski et al. (2010).

Die CMT/HSMN1 lässt sich weiterhin einteilen:

**Tabelle 2: Unterteilung der CMT/HSMN1 modifiziert nach Suter und Scherer (2003)**

Name	Merkmal	Gen	Lokus
CMT1A	häufigste Form der CMT, symmetrische, distal betonte Muskelatrophie	<i>PMP22</i> -Duplikation	17p11.2-12
CMT1B	ähnliche Symptomatik wie bei der CMT1A	<i>MPZ/P0</i>	1q22
CMT1C	ähnliche Symptomatik wie bei der CMT1A	<i>LITAF</i>	16p13.3-p12
CMT1D	ähnlich wie CMT1A jedoch breite klinische Ausprägung	<i>EGR2</i>	10q21.1-q22.1
HNPP	Rezidivierende Drucklähmungen, histologisch Ausbildung von Tomaculae	<i>PMP22</i> -Deletion	17p11.2

Untertypen der CMT1. Die CMT1A ist mit ca. 50-60 % aller CMT-Formen die hereditäre Neuropathie mit der größten klinischen Relevanz (Schenone et al. 2011). Abkürzungen: HNPP *hereditary neuropathy with liability to pressure palsies*; *PMP22 peripheral myelin protein 22*; *MPZ/P0 myelin protein zero*; *LITAF lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor- $\alpha$* ; *EGR2 early growth response protein 2*. Tabelle modifiziert nach Suter und Scherer (2003)

### 1.2.1 Charcot-Marie-Tooth-Erkrankung Typ 1A (CMT1A)

Die Charcot-Marie-Tooth-Erkrankung Typ 1A (CMT1A) ist die häufigste Unterform der hereditären Neuropathien. Synonym wird im klinischen Kontext auch der Begriff hereditäre motorische sensible Neuropathie 1A (HMNS1A) verwendet (Schenone et al. 2011). Sie wird durch eine Duplikation des Gens für das periphere Myelinprotein 22 kDa (PMP22) auf Chromosom 17p11.2-12 (Lupski et al. 1991) verursacht und unterliegt einem autosomal dominanten Erbgang, kann jedoch auch durch ein ungleiches Crossing-over neu entstehen (Palau et al. 1993; Patzkó und Shy 2011). Die Erkrankung wird in der Regel im jungen Erwachsenenalter diagnostiziert. In vielen Fällen haben Patienten jedoch anamnestisch bereits länger Beschwerden wie mangelnde Leistungsfähigkeit beim Laufen. Die Ausprägung der Erkrankung sowie das Alter des Patienten beim Auftreten der ersten Krankheitssymptome sind sehr variabel. Die Ursache hierfür ist bisher noch nicht abschließend geklärt. Diskutiert werden hier unter anderem epigenetische Faktoren (Pareyson und Marchesi 2009; Reilly et al. 2011). Klinisch zeichnet sich die CMT1A-Erkrankung insbesondere durch eine symmetrische, distal betonte Muskelschwäche mit einer Betonung der unteren Extremität aus (Birouk et al. 1997b). Durch die neurogene Muskelatrophie kommt es im langsam progredienten Verlauf der Erkrankung zu einer Hohlfuß- und Krallenzehenausbildung mit einem charakteristischem Steppergang (Dyck et al. 1993). Hinzu kommen sensible Defizite wie mangelnde Propriozeption oder gestörte Schmerz Wahrnehmung. Das Zusammenspiel aus motorischer

Schwäche und verminderter Propriozeption kann bis zur Bindung an den Rollstuhl führen. Eine Minderung der Lebenserwartung ist üblicherweise mit der Erkrankung nicht verbunden. Elektrophysiologisch zeigt sich in der Regel eine Minderung der NLG  $< 40$  m/s sowie ein reduziertes MSAP. Histologisch zeigt sich in peripheren Nerven das Bild einer segmentalen Demyelinisierung mit axonalem Verlust. Außerdem lassen sich so genannte *onion-bulb*-Formationen als Zeichen einer gleichzeitig ablaufenden De- und Remyelinisierung nachweisen (Gabreëls-Festen und Wetering 1999). Die Elektrophysiologie und die histologische Untersuchung an Nervenbiopsien aus dem Suralisnerv waren lange Zeit der Goldstandard zur Diagnostik einer CMT-Erkrankung. Dies wurde in den vergangenen Jahren durch den genetischen Nachweis der *PMP22*-Duplikation ergänzt (Slater et al. 2004).

Der genaue Pathomechanismus von der Duplikation des *PMP22*-Gens zum Phänotyp der CMT1A ist noch nicht abschließend geklärt. Die Wichtigkeit der genauen Gendosis wird durch die Tatsache bestärkt, dass das Fehlen einer Kopie des Gens zu einer mildereren Form der CMT, der hereditären Neuropathie mit Neigung zu Drucklähmungen (HNPP) führt. Mutationen mit mehr als drei Kopien führen wiederum zur Ausbildung eines sehr schweren Phänotyps. In-vitro-Experimente haben gezeigt, dass eine erhöhte *PMP22*-Gendosis in Schwanzzellen zu einer geringeren Proliferationsrate und zu einem späteren Eintritt in die S-Phase der Mitose führt. Dies zeigt, dass *PMP22* eine Rolle im Zellzyklus und Zellwachstum spielt (Zoidl et al. 1995). Neuere Studien zeigen zudem, dass Schwanzzellen in *Pmp22*-transgenen Ratten einen Differenzierungsdefekt und eine Imbalance im PI3K-AKT und MAPK-ERK-Signalweg aufweisen (Fledrich et al. 2014). Andere Autoren beschreiben einen Zusammenhang zwischen der *PMP22*-Überexpression und einer abnormal hohen Konzentration von intrazellulärem  $Ca^{2+}$  durch eine Überexpression des P2X-Kalziumkanals in Schwanzzellen (Nobbio et al. 2009).

### 1.2.2 Peripheres Myelinprotein 22 (PMP22)

*PMP22* wurde erstmalig aus Maus-Fibroblasten als *growth arrest specific gene 3* (*GAS3*) isoliert (Schneider et al. 1988). Nachfolgend wurde das Gen *SR13* in Rattennerven identifiziert. Dieses zeigte sich homolog zu dem vorher isolierten *GAS3* (Manfioletti et al. 1990). Im weiteren Verlauf erkannte man, dass das Protein *GAS3/SR13* in kompaktem Myelin lokalisiert ist und ein Molekulargewicht von 22 kDa aufweist (Snipes et al. 1992). Es wurde daher in peripheres Myelinprotein 22 (PMP22) umbenannt. PMP22 ist ein hydrophobes Protein, das vom *PMP22*-Gen enkodiert wird. Das Protein enthält vier Transmembrandomänen, zwei extrazelluläre Schleifen und eine intrazelluläre Schleife. Es macht etwa 3 – 5 % der Gesamtmasse des Proteins im peripheren Myelin aus und ist im kompakten Myelin lokalisiert (Suter und Scherer 2003). PMP22 wird im peripheren Nervensystem von Myelin-bildenden Schwannzellen exprimiert (Snipes et al. 1992). Während der Embryogenese gibt es auch eine transiente Expression in anderen Geweben. So wurde *PMP22*-Expression unter anderem in Neuronen der dorsalen Hinterwurzelganglien, dem Hirnstamm, Cortex und dem Rückenmark (Parmantier et al. 1995; Taylor et al. 1995) sowie in Geweben außerhalb des Nervensystems

(Baechner et al. 1995) nachgewiesen. Beim Menschen befindet sich das Gen auf dem Chromosom 17p11.2 (15,13 – 15,17 Mb) und umfasst etwa 40 kb. Es besteht aus sechs Exons und ist zwischen den verschiedenen Spezies hoch konserviert (Patel et al. 1992; Jetten und Suter 2000). Das erste Exon umfasst zwei verschiedene Transkripte (Exon 1a und Exon 1b), die sich nicht in ihrer codierenden Sequenz, sondern nur in ihrem untranslatierten 5' Ende unterscheiden (Suter und Patel 1994). Die codierende Region von *PMP22* umfasst die Exons 2 bis 5. In vitro wurde gezeigt, dass PMP22 zunächst als 18 kDa Vorläuferprotein synthetisiert und, wie andere Membranproteine auch, vorübergehend im endoplasmatischen Retikulum und Golgi-Apparat verbleibt, dort posttranslational durch N-Glykosylierung zu einem 22 kDa Protein modifiziert wird und erst danach die Zellmembran erreicht (Pareek et al. 1993). PMP22 scheint eine maßgebliche Rolle in der Bildung und Aufrechterhaltung des kompakten Myelins zu haben. Zum aktuellen Zeitpunkt ist die Funktion von PMP22 noch nicht vollständig verstanden (Watila und Balarabe 2015).

### 1.2.3 Tiermodelle der CMT

Die Entwicklung neuer Behandlungsmethoden und die Untersuchung von Krankheitsursachen sind aufwendige und kostenintensive Prozesse. Aus praktischen und ökonomischen, aber auch aus ethischen Gründen ist eine Untersuchung am Menschen häufig nicht möglich. Transgene Tiermodelle hereditärer Erkrankungen können den Verlauf von Erkrankungen des Menschen widerspiegeln. In der medizinischen und grundlagenwissenschaftlichen Forschung dienen sie als Werkzeug zur Untersuchung von Pathomechanismen menschlicher Erkrankungen und können helfen die Wirksamkeit und Sicherheit neuer Therapien zu überprüfen. Für die verschiedenen Subtypen der CMT gibt es sowohl natürliche Mutanten, wie auch künstlich erzeugte transgene Tiere (Sereda und Nave 2006; Fledrich et al. 2012b). Ein Austausch von Leucin 16 mit Prolin in der ersten Transmembrandomäne von *Pmp22* verursacht bei der natürlichen Trembler-J-Mausmutante eine periphere Neuropathie und im Menschen die schwere Neuropathie Déjerine-Sottas-Syndrom (Jetten und Suter 2000). Daneben wurden *Pmp22*-überexprimierende Mäuse- (Huxley et al. 1996; Magyar et al. 1996; Huxley et al. 1998) und Rattenlinien generiert (Sereda et al. 1996). Die *Pmp22*-transgene Ratte trägt ein 43 kb großes Restriktionsfragment, das das gesamte *Pmp22*-Transkript enthält und aus einer genomischen Maus-Cosmid-Bibliothek kloniert wurde. Southern-Blot-Analysen ergaben, dass das *Pmp22*-Transgen aus drei Kopien besteht (Sereda et al. 1996). In verschiedenen Tiermodellen der CMT1A mit unterschiedlich starker *Pmp22*-Überexpression wurde eine Korrelation zwischen der Schwere der manifesten Erkrankung und der Anzahl ins Genom integrierter Transgen-Kopien dargestellt (Huxley et al. 1998). Eine stark erhöhte Gendosis (16 – 30 Transgen-Kopien) führten in einer transgenen Maus zu einem vollständigen Fehlen der Myelinscheiden (Magyar et al. 1996). Auch in homozygot *Pmp22*-transgenen Ratten sind die Schwanzzellen von Geburt an nicht in der Lage, Myelin zu bilden (Niemann et al. 2000). Expressionsstudien in heterozygoten transgenen Ratten zeigen eine mäßige Überexpression von *Pmp22* von etwa 1,6 gegenüber den Wildtyp-Tieren (Sereda et al. 2003). Insbesondere

für die *Pmp22*-überexprimierende Ratte konnte in der Vergangenheit gezeigt werden, dass sie den Krankheitsverlauf der CMT1A im Menschen gut widerspiegelt. Diese Tiere entwickeln eine Muskelschwäche und eine Gangstörung. Elektrophysiologisch sind die NLG sowie die Muskelsummenaktionspotentiale reduziert. Histologisch lässt sich eine Demyelinisierung mit sekundärem axonalem Verlust und Ausbildung von *onion-bulb*-Formationen zeigen (Sereda et al. 1996; Niemann et al. 1999; Sereda und Nave 2006; Fledrich et al. 2019). Im Jahr 2012 konnte zudem gezeigt werden, dass die *Pmp22*-transgene Ratte die aus dem Menschen bekannte Variabilität in der Ausprägung der Erkrankung und dem Alter des Erkrankungsbeginns widerspiegelt (Fledrich et al. 2012a).

### 1.3 Experimentelle Therapien der CMT1A

In den vergangenen 20 Jahren gab es bereits große Bemühungen eine Therapiemöglichkeit für die CMT1A zu finden. Insbesondere die oben beschriebene Entwicklung von Tiermodellen, aber auch der bessere Einblick in die Pathomechanismen der CMT1A und das genauere Verständnis der Myelinisierung haben zu großen Fortschritten geführt. Eine wirkungsvolle Therapie steht in der Klinik nach wie vor jedoch nicht zur Verfügung.

Ein vielversprechender Therapieansatz ergab sich durch die Beobachtung, dass Ascorbinsäure die Myelinisierung *in vitro* unterstützt (Eldridge et al. 1987). Weitere Untersuchungen zeigten, dass Ascorbinsäure in der Lage ist, über eine Reduzierung der cAMP (zyklisches Adenosin-Monophosphat)-Level die *Pmp22*-Expression zu hemmen (Kaya et al. 2007). In einem Mausmodell der CMT1A führte eine Hochdosistherapie mit Ascorbinsäure zu einer signifikanten Verbesserung der motorischen Fähigkeiten. Die in diesem Experiment verwendete *Pmp22*-überexprimierende Mauslinie zeigte eine reduzierte Lebenserwartung gegenüber Wildtyp-Mäusen. Die Behandlung mit Ascorbinsäure konnte die Lebenserwartung der transgenen Tiere annähernd verdoppeln (Passage et al. 2004). Mehrere, randomisierte, doppelt geblindete Studien mit unterschiedlichen Dosierungen an Patienten verschiedener Altersgruppen konnten jedoch keinen signifikanten Effekt einer Therapie mit Ascorbinsäure zeigen (Burns et al. 2009; Micallef et al. 2009; Verhamme et al. 2009; Pareyson et al. 2011; Lewis et al. 2013).

Ein weiterer pharmakologischer Ansatz zur Behandlung der CMT1A ist die Verwendung eines Progesteronantagonisten. Der Progesteronrezeptor wird von Schwannzellen exprimiert (Jung-Testas et al. 1996) und Progesteron von Schwannzellen synthetisiert (Robert et al. 2001). Progesteron spielt eine wichtige Rolle in der Myelinisierung des peripheren Nervensystems (Schumacher et al. 2001) und führt zu einer gesteigerten Expression von *Pmp22* in Schwannzellen (Sereda et al. 2003). Die Behandlung transgener Ratten mit einem Progesteronantagonisten ist in der Lage die Überexpression von *Pmp22* zu reduzieren und den Phänotyp der Tiere zu verbessern (Sereda et al. 2003; Meyer zu Horste et al. 2007). Eine Langzeittherapie mit dem verwendeten Progesteronrezeptorantagonisten Onapristone scheiterte jedoch bisher an den damit verbundenen Nebenwirkungen.



In HeLa-Zellen wurde beobachtet, dass Pmp22-Protein mit der Trembler- oder Trembler-J-Mutation (Punktmutationen im *Pmp22*-Gen) im endoplasmatischen Retikulum akkumuliert und eine Apoptose der Zellen einleitet. Eine Behandlung der Zellen mit Curcumin, einem Gewürz- und Aromastoff aus der Wurzel der Kurkumapflanze, konnte die Apoptoserate der Zellen vermindern. Eine Behandlung von neugeborenen Trembler-J-Mäusen mit Curcumin konnte ebenfalls die Apoptose von Schwanzzellen reduzieren, die motorischen Fähigkeiten verbessern sowie die Myelindicke erhöhen (Khajavi et al. 2007). Eine Therapiestudie in der *Pmp22*-transgenen Ratte konnte jedoch bisher keinen überzeugenden Effekt von Curcumin nachweisen (Weiss 2014).

## 1.4 Lithium

### 1.4.1 Einsatz von Lithium in der Medizin

Lithium ist ein chemisches Element mit der Ordnungszahl 3. Es ist das erste Alkalimetall im Periodensystem. Aufgrund seiner hohen Reaktivität kommt Lithium in der Natur nicht gediegen vor. Lithium wird in Form seiner Salze klinisch seit den 50er Jahren erfolgreich für die Behandlung psychiatrischer Erkrankungen eingesetzt. Der genaue Wirkmechanismus ist jedoch bisher weitgehend unverstanden. Zahlreiche Studien haben sich mit der Rolle von Lithium für verschiedene neurologische Erkrankungen befasst. Insbesondere sind neuroprotektive Eigenschaften von Lithium im Zusammenhang mit M. Alzheimer, Amyotropher Lateralsklerose, Chorea Huntington und traumatischen Hirnverletzungen beschrieben worden (Rowe und Chuang 2004; Aghdam und Barger 2007; Yu et al. 2012). Auch zeigt Lithium positive Effekte auf axonale, Chemotherapie-induzierte Neuropathien im Tiermodell (Alimoradi et al. 2012; Mo et al. 2012). Weiterhin wurden in mehreren Studien immunmodulatorische und anti-entzündliche Effekte von Lithium beschrieben. So reduziert Lithium die Immunantwort von Mäusen mit experimenteller autoimmuner Encephalomyelitis, dem Tiermodell für Multiple Sklerose, und verbessert den Krankheitsverlauf der Tiere (De Sarno et al. 2008; Rowse et al. 2012). Bei der Einnahme von Lithium besteht keine Abhängigkeitsgefahr und in richtiger Dosierung zeigt sich eine gute Verträglichkeit. Die therapeutische Breite von Lithium ist, vermutlich aufgrund der geringen Affinität zu Ionenpumpen und der resultierenden Gefahr einer intrazellulären Akkumulation, relativ schmal, so dass in der klinischen Praxis regelmäßige Kontrollen der Lithiumspiegel im Serum erfolgen müssen (Delva und Hawken 2001). Lithium-Intoxikationen können zu Neurotoxizität, Kardiotoxizität sowie Nephrotoxizität führen (Delva und Hawken 2001). Sehr selten können Lithium-Intoxikationen das periphere Nervensystem mit einer axonalen Affektion betreffen (Chan et al. 2012). Die neurologischen Symptome sind nach Absetzen der Medikation reversibel (Delva und Hawken 2001; Chan et al. 2012). Am häufigsten treten zu Beginn der Behandlung mit Lithium gastrointestinale Nebenwirkungen auf.

### 1.4.2 Einfluss von Lithium auf die Myelinisierung im peripheren und zentralen Nervensystem

Ein Effekt von Lithium auf myelinbildende Zellen des Nervensystems wurde erstmals 1987 in In-vitro-Experimenten zur Schwanzzell-Proliferation (Yoshino und DeVries 1987) beschrieben. Einen direkten Einfluss von Lithium auf die Remyelinisierung von Schwanzzellen zeigten Analysen nach einer akuten peripheren Nervenschädigung. In experimentellen Nerventraumata des Facialis- sowie des Ischiasnerven in Ratten konnte nachgewiesen werden, dass eine Therapie mit Lithium die Remyelinisierung verletzter Nerven fördert und die funktionelle Wiederherstellung der betroffenen Nerven verbessert. Dabei induziert Lithium über eine Inhibition der Glykogensynthasekinase 3 beta (GSK3b) und konsekutive Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs die Expression der Myelogene Myelinprotein 0 (*Mpz*) und *Pmp22* (Makoukji et al. 2012). Eine wichtige Rolle des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs für die Differenzierung und Myelinisierung wurde in den letzten Jahren sowohl für Schwanzzellen als auch für Oligodendrozyten beschrieben (Tawk et al. 2011). Eine Dysregulation des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs wurde dabei als wichtige Komponente für die fehlende Remyelinisierung im zentralen Nervensystem beschrieben (Fancy et al. 2009). Lithium entfaltet seine Wirkung jedoch nicht nur über den Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg. Weitere wichtige, durch Lithium aktivierte intrazelluläre Signalkaskaden sind der PI3K/AKT- sowie der MAPK/ERK-Signalweg (Einat et al. 2003; Pardo et al. 2003; Sinha et al. 2005; Pasquali et al. 2010). Beide Transduktionswege sind für die Entwicklung des peripheren Nervensystems und die Myelinbildung essentiell (Taveggia et al. 2010; Salzer 2012). Der Effekt von Lithium auf die PI3K/AKT- und MAPK/ERK-Signalwege in Schwanzzellen während der physiologischen Myelinisierung wie auch in demyelinisierenden Erkrankungen ist bisher nicht untersucht worden. Auch wurde die Bedeutung des Lithium-Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs während der Entwicklung von Schwanzzellen und in chronisch demyelinisierenden Neuropathien in vivo bisher nicht analysiert. Verschiedene Autoren konnten außerdem eine Erhöhung des *brain-derived neurotrophic factors* (BDNF) durch eine Behandlung mit Lithium im Blut von Menschen (Leyhe et al. 2009) bzw. im Hirn von Ratten (Fukumoto et al. 2001) zeigen. BDNF hat wiederum zahlreiche Effekte auf Neurogenese und neuronale Plastizität (Foltran und Diaz 2016) sowie auf die Myelinisierung (Funakoshi et al. 1993; Chan et al. 2001; Cosgaya et al. 2002).

## 1.5 Ziele der Arbeit

Lithium kann vielfältige Einflüsse auf das zentrale und periphere Nervensystem haben. Verschiedene Studien konnten einen neuroprotektiven Effekt von Lithium zeigen. Im peripheren Nervensystem ist Lithium in der Lage die Remyelinisierung nach Nervenverletzungen zu verbessern oder eine Chemotherapie-induzierte Neuropathie abzumildern. Der Einfluss von Lithium auf zahlreiche, für die Myelinisierung wichtige Signalwege wurde bereits gezeigt (Gabreëls-Festen und Wetering 1999). Auch eine direkte Beeinflussung der Expression von Myelinproteinen durch Lithium wurde publiziert (Makoukji et al. 2012).

In der vorliegenden Arbeit soll zunächst der Einfluss von Lithium auf die Myelinisierung in Wildtyp-Ratten untersucht werden. Dazu sollen Ratten mit Lithium behandelt und der Einfluss von Lithium auf das periphere Nervensystem zu zwei Zeitpunkten während der Myelinisierung sowie zu einem Zeitpunkt nach Abschluss der Myelinisierung histologisch und molekularbiologisch untersucht werden. In einem zweiten Schritt soll die Kultivierung von primären Schwanzzellen und die Analyse des Einflusses von Lithium auf die Expression von ausgewählten Genen sowie die Aktivierung von myelinassoziierten Signalwegen erfolgen. Außerdem soll der Einfluss von Lithium auf die In-vitro-Myelinisierung in einer Co-Kultur aus primären Schwanzzellen und Neuronen aus dorsalen Hinterwurzelganglien der Ratte untersucht werden. Im klinischen Alltag wird Lithium als zugelassenes Medikament regelhaft zur Behandlung der bipolaren Störung eingesetzt. Seine Verträglichkeit und Sicherheit sind bereits mehrfach gezeigt worden. Für die CMT1A ist trotz großer Fortschritte in der Forschung noch keine Therapie verfügbar. Um die Möglichkeit einer bereits verfügbaren und gut verträglichen medikamentösen Behandlung zu untersuchen, soll der Einfluss von Lithium auf den Krankheitsverlauf in einem Rattenmodell der CMT1A histologisch und molekularbiologisch untersucht werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien und Bioreagenzien

Tabelle 3: Chemikalien und Bioreagenzien

Chemikalien und Bioreagenzien	Hersteller	Stadt/Land
Acrylamid	Sigma-Aldrich	Schnelldorf
Agarose	Bio-Rad	Hercules, USA
Ammoniumacetat	Merck	Darmstadt
Ammoniumperoxiddisulfat (APS)	Merck	Darmstadt
Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich	Schnelldorf
Aqua-Poly/Mount	Polysciences, Inc.	Eppelheim
Azur-II-Farbstoff	Merck	Darmstadt
Bromphenolblau	International Biotechnology Inc.	Eldersburg, USA
Beta-Mercaptoethanol	Merck	Darmstadt
Bleicitrat	Merck	Darmstadt
Bovines Pituitary Extract (BPE)	Sigma-Aldrich	Schnelldorf
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich	Schnelldorf
Chloroform	Merck	Darmstadt
3-3'-diaminobenzidin (DAB)	Zytomed	Berlin
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Boehringer	Mannheim
2-Duodecenylnsuccinacidanhydrid (DDSA)	Serva	Heidelberg
1,4-Dithiotreitol (DTT)	GibcoBRL	Karlsruhe
Essigsäure	Merck	Darmstadt
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck	Darmstadt
Ethanol	Merck	Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich	Schnelldorf
Eukitt (Einbettmedium)	Kindler GmbH	Freiburg

<b>Chemikalien und Bioreagenzien</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Stadt/Land</b>
Fetales Kälberserum (FCS)	PAN Biotech	Aidenbach
Ficoll (Typ 400)	Sigma-Aldrich	Schnelldorf
Formol	Merck	Darmstadt
Formvar	Merck	Darmstadt
Forskolin	Sigma-Aldrich	Schnelldorf
Gelatine	Sigma-Aldrich	Schnelldorf
Glutardialdehyd	Merck	Darmstadt
GlutaMax	GibcoBRL	Karlsruhe
Hanks Balanced Salts Solution (HBSS)	GibcoBRL	Karlsruhe
Isopropanol	Merck	Darmstadt
Kaliumchlorid (KCl)	Merck	Darmstadt
Ketamin (Ketanest®)	Parke-Davis	Berlin
Lithiumcarbonat ( $\text{Li}_2\text{CO}_3$ )	Merck	Darmstadt
Magnesiumchlorid	Merck	Darmstadt
Methanol	Merck	Darmstadt
Modified Eagle's Medium (MEM)	Invitrogen	Darmstadt
Methylenblau	Merck	Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	Merck	Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat-2-hydrat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ )	Merck	Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Merck	Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat-hydrat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )	Merck	Darmstadt
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck	Darmstadt
Nerve growth factor (NGF)	Alamone Labs	Jerusalem, Israel
Osmiumtetroxid	Serva	Heidelberg
Paraformaldehyd	Serva	Heidelberg
Phosphatase Inhibitor PhosSTOP	Roche	Grenzach
Proteinase Inhibitor	Roche	Grenzach

<b>Chemikalien und Bioreagenzien</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Stadt/Land</b>
Salzsäure (HCl)	Serva	Heidelberg
Sodium-Dodecyl-Sulfat (SDS)	Sigma-Aldrich	Schnelldorf
Sucrose	Sigma-Aldrich	Schnelldorf
Taq-Polymerase Puffer	Promega	Walldorf
Tris-HCl Base	Sigma-Aldrich	Schnelldorf
Triton X 100	Sigma-Aldrich	Schnelldorf
Trypsin	Merck	Darmstadt
Uranylacetat	Merck	Darmstadt
Xylol	Merck	Darmstadt
Xylazin (Rompun®)	Bayer	Leverkusen
Ziegenserum	Invitrogen	Darmstadt

### 2.1.2 Verbrauchsmaterial

**Tabelle 4: Verbrauchsmaterial**

<b>Verbrauchsmaterial</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Stadt/Land</b>
CO <sub>2</sub> -Gas	Air Liquide	Ludwigshafen
Coverplates für Immunhistochemie	Dako Cytomation	Hamburg
Deckgläschen	Marienfeld	Lauda-Königshofen
Einmalhandschuhe	Hartmann	Heidenheim
Falcon Röhrchen	Becton & Dickinson	Heidelberg
Injektionskanülen	Becton & Dickinson	Freiburg
Kupfergrids für Elektronenmikroskopie	Plano	Wetzlar
Mikroreaktionsgefäße	Eppendorf	Hamburg
NuPage 4-12 % Bis-Tris Gele	Invitrogen	Darmstadt
Objektträger	Gerhard Menzel	Braunschweig
Objektträger	Marienfeld	Lauda-Königshofen
Papiertücher	Wepa Professional	Arnsberg
PCR-Mikrotiterplatten 96well	ABgene	Surrey, UK

<b>Verbrauchsmaterial</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Stadt/Land</b>
PCR-Mikrotiterplatten 384-well	Roche	Mannheim
PCR-Plattenfolie	ABgene	Surrey, UK
Pipettenspitzen	Molecular Bioproduct	San Diego, USA
Präparationsbesteck	Fine Science Tools	Heidelberg
PVDF-Membran Hybond-PTM	GE Healthcare	Freiburg
Spritzen	Henke Saas Wolf	Tuttlingen
Spritzen	Becton & Dickinson	Freiburg
Sterilfiltrationseinheit	Corning	Amsterdam, NL
Stickstoff flüssig	Air Liquide	Ludwigshafen
Tierfutter	SSniff Spezialdiäten	Soest
Trockeneis	Air Liquide	Ludwigshafen
Zellkulturplatten	Becton & Dickinson	Freiburg
Zellkulturplatten und -schalen	Thermo Fisher Scientific Inc.	Braunschweig

### 2.1.3 Geräte

**Tabelle 5: Geräte**

<b>Geräte</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Stadt/Land</b>
Agarose-Gelkammer mit Kämmen	Hauswerkstatt MPI exp. Med.	Göttingen
Agarosegeldokumentation Image Master VDS	Amersham Pharmacia Biotech	Freiburg
Blotkammern für Western Blots	Invitrogen	Darmstadt
Binokular M125	Zeiss	Jena
CCD Kamera für EM	TRS	Moorenweis
Diamantmesser Diatome Ultra 35°	Diatome	Biel, CH
Elektronenmikroskop EM900	Zeiss	Hamburg

<b>Geräte</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Stadt/Land</b>
Elektrophysiologiegerät Neuroscreen	Jaeger Toennies, Erich Jaeger GmbH	Höchberg
Feinwaage	Heraeus Instruments	Langenselbold
Fräse für Epon-Präparate EM TRIM	Reichert	Wien, AT
Gefrierschrank -20 °C	Liebherr	Ochsenhausen
Gefrierschrank -80 °C	New Brunswick Scientific	Nürtingen
Gewebe-Einbettautomat Lynx el	Vision BioSystems Inc	Norwell, USA
Gewebe-Einbettautomat EM TP	Leica Microsystems	Wetzlar
Gewebehomogenisierer Ultraturrax PT3000	IKA Labortechnik	Staufen
Gewebehomogenisator Precellys 24	PEQLAB Biotechnologie	Erlangen
Glaswaren	Schott	Mainz
Griffstärkemesser	Hauswerkstatt MPI exp. Med.	Göttingen
Kaffeemaschine Bar	Mellita	Minden
Laborwaagen	Sartorius	Göttingen
Lichtmikroskop Axio Imager Z1	Zeiss	Jena
Lichtmikroskop Observer Z	Zeiss	Jena
Magnetrührer RCT basic Ikamag	Omnilab	Bremen
NanoDrop200 Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific Inc.	Braunschweig
Thermomax microplate reader	MWG-Biotech	Ebersberg
Thermomixer 5436	Eppendorf	Hamburg
Pipettierhilfe Pipetboy	Integra Biosciences	Fernwald
PCR-Thermocycler T3	Biometra	Göttingen
PCR Versiegler 4s <sup>2</sup>	4titude	Berlin
Pipettenspitzen	Gilson	Villiers-le-Bel, FR
Probenmischgerät Vortexer	Bender & Hobein	München
Real-Time-PCR-System LightCycler® 480	Roche Applied Sciences	Mannheim
Reinstwasseranlage	Sartorius	Göttingen



Geräte	Hersteller	Stadt/Land
Rotationsmikrotom Leica RM 2155	Leica Microsystems	Wetzlar
SDS-Page Kammer X-cell sure lock	Invitrogen	Darmstadt
Wasserbad	Memmert	Schwabach
Western Blot Gel Imager	Intas	Göttingen
Zellkulturinkubator Function Line	Heraeus Instruments	Langenselbold
Zentrifuge Heraeus Biofuge 13	Heraeus Instruments	Langenselbold
Zentrifuge Laboratory Centrifuge 4K15	Sigma Laborzentrifugen	Osterode Harz
Zentrifuge Labofuge 400	Heraeus Instruments	Langenselbold
Kühlzentrifuge 5415R	Eppendorf	Hamburg
Zentrifuge Optima TLX	Beckman	Krefeld

#### 2.1.4 Reaktionkomplettausstattungen

**Tabelle 6: Reaktionskomplettausstattungen**

Reaktionskomplettausstattungen	Hersteller	Stadt/Land
Chemilumineszenzkit (Western Blot)	Perkin Elmer	Rodgau
Desoxyribonukleosid-Triphosphate (dNTPs)	Boehringer	Mannheim
DNA-Größenmarker Lambda/HindIII	Promega	Mannheim
DNA-Größenmarker PhiX174/HaeIII	Promega	Mannheim
DNeasy 96™ Kit für DNA-Isolation	Qiagen	Hilden
GoTaq™ DNS-Polymerase	Promega	Mannheim
Lowry Assay	Bio-Rad	Hercules, USA
nexttec™ Genomic DNA Isolation Kit	nexttec Biotechnologie GmbH	Hilgertshausen
Power Sybr® Green PCR Master Mix	Applied Biosystems	Waltham, USA
Precision Plus Protein™ Standard Dual Color	Bio-Rad	Hercules, USA
Proteinase K	Boehringer	Mannheim
randomisierte Nonamer-Primer	DNA Core Facility MPI exp. Med.	Göttingen

Reaktionskomplettausstattungen	Hersteller	Stadt/Land
RNeasy™Mini Kit für RNA-Isolation	Quiagen	Hilden
Superscript III™ RT-Kit	Invitrogen	Darmstadt
Taq-Polymerase Puffer	Promega	Mannheim
Taq-DNA-Polymerase (5 U/μl)	Boehringer	Mannheim
QIAzol Lysis Reagent	Quiagen	Hilden

### 2.1.5 Lösungen und Puffer

Tabelle 7: Lösungen und Puffer

DNA-Probenpuffer	
Bromphenolblau	0,25 g
Xylenyanol	0,25 g
Ficoll (Typ 400)	5 g in 100 ml H <sub>2</sub> O
Blocking-Lösung für Immunzytochemie	
BSA	2 g
Horse Serum	2 g
Gelatine	0,1 g
In 100 ml d-PBS lösen.	
TAE-Puffer (50x Lösung, 1000 ml)	
Tris-HCl Base	242 g
Essigsäure 100 %	57,1 ml
EDTA (0,5 M; pH 8)	100 ml
auf 1000 ml mit ddH <sub>2</sub> O auffüllen	

---

**PBS (phosphat-gepufferte Salzlösung (10x Stammlösung, 1000 ml))**

---

NaCl	100 g
KCl	2,5 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2 H <sub>2</sub> O	7,2 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,5 g

auf 900 ml mit H<sub>2</sub>O auffüllen; pH 7,2 mit 10 N NaOH einstellen; auf 1000 ml mit H<sub>2</sub>O auffüllen; autoklavieren; zur Verwendung die Stammlösung 1:10 verdünnen (1x PBS)

---

**TBS (1000 ml)**

---

Tris-HCl 1 M, pH 8,8	50 ml (50 mM)
NaCl (5 M)	30 ml (150 mM)

auf 1000 ml mit ddH<sub>2</sub>O auffüllen, pH 7,4 mit 1 M HCl einstellen

---

**Sucrosepuffer**

---

Sucrose	320 mM
Tris-HCl 1 M, pH 8,8	10 mM
NaHCO <sub>3</sub>	1 mM
MgCl <sub>2</sub>	1 mM

---

**6x Sample Buffer/Loading Buffer**

---

0.5 M Tris (pH 6.8)	7 ml
Glycerol	2.6 ml
DTT	1 g
10 % Brom Blue	60 µl
10 % SDS	400 µl

---

 K&S Fixans nach Karlsson und Schultz (1965) für Licht- und Elektronenmikroskopie
 

---

Natriumdihydrogenphosphat x H <sub>2</sub> O	0,36 g
Dinatriumhydrogenphosphat x 2 H <sub>2</sub> O	3,1 g
NaCl	1 g
Glutardialdehydlösung 25 %	20 ml
Paraformaldehyd (PFA)	8 g

PFA in 60 ml ddH<sub>2</sub>O lösen. Unter Rühren auf 60 – 70 °C erhitzen. Mit ddH<sub>2</sub>O auf 80 ml auffüllen. Langsam 1 M NaOH zugeben bis Lösung klar wird. Lösung steril filtrieren und mit 1 M HCL auf pH 7,4 einstellen. Salze in 100 ml ddH<sub>2</sub>O lösen und zu PFA geben. Anschließend 20 ml Glutardialdehydlösung zugeben.

---

 Kunstharzmischung Epon nach Luft (1961)
 

---

## Epon Lösung A:

Glycidether	67,5 g
Dodecenylnsuccinicanhydrid (DDSA)	88,2 g

eine Stunde mit Magnetrührer rühren

## Epon Lösung B:

Glycidether	82,3 g
Methylnadicanhydrid (MNA)	73,3 g

eine Stunde mit Magnetrührer rühren

## Gebrauchslösung Epon:

Epon Lösungen A und B im Verhältnis 1:1 mischen; 1,8 % 2,4,6-Trisdimethylaminomethylphenol (DMP 30) zufügen.

---

 Laufpuffer für Polyacrylamidgele (20x):
 

---

MOPS	1 M
Tris Base	1 M
SDS	69,3 mM
EDTA	20,5 mM

## Lysepuffer für Proteinlysaten aus Ischiasnerven:

---

Sucrose	320 mM
Tris	10 mM
NaHCO <sub>3</sub>	1 mM
MgCl <sub>2</sub>	1 mM

Proteinase-Hemmer (Complete, Roche) und Phosphatase-Hemmer (PhosSTOP, Roche), je eine Tablette für 10 ml Lösung

## Protein-Probenpuffer (2x):

---

Glyzerin	20 %
SDS	4,6 %
Bromphenolblau	0,4 %
Tris-Base	125 mM

auf 50 ml mit ddH<sub>2</sub>O auffüllen. Mit HCL auf pH 6,8 einstellen. Zu 20 µl Probenpuffer vor Probenzugabe 1 µl β-Mercaptoethanol (5 %) zugeben.

---

---

## 2.1.6 Nukleinsäuren und Nukleotide

### 2.1.6.1 Primer zur Genotypisierung transgener Ratten

**Tabelle 8: Primer zur Genotypisierung transgener Ratten**

---

*PMP22*

Sense: 5'-GACAAACCCAGACAGTTG-3'

Antisense: 5'-CCAGAAAGCCAGGGAAGTC-3'

---

---

### 2.1.6.2 Primer für semiquantitative Real-Time-PCR

Primer für semiquantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR) wurden mit Hilfe des Roche Universal ProbeLibrary Assay Design Center [https://www.roche-applied-science.com/sis/rtPCR/upl/index.jsp?id=uplct\\_030000](https://www.roche-applied-science.com/sis/rtPCR/upl/index.jsp?id=uplct_030000) (abgerufen 16.08.2020) designed. Dabei wurden Primer so gewählt, dass sie Introns umspannen, um die Gefahr der Amplifikation genomischer DNA zu vermindern. Die Primer wurden mit Hilfe der Software Oligo-Analyser auf Bildung von Hairpins und Self- oder Heterodimeren untersucht und soweit

möglich Oligonukleotide mit einem  $\Delta G > -3$  kcal/mol ausgewählt. Anschließend wurden die Primer mit NCBI/ Primer-BLAST <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/> (abgerufen 16.08.2020) auf ihre Spezifität getestet. Die Oligonukleotide wurden durch die DNA Core Facility des MPI für experimentelle Medizin hergestellt.

**Tabelle 9: Primer für qRT-PCR**

<i>Bdnf</i>	
Sense:	5'-GACAAACCCAGACAGTTG-3'
Antisense:	5'-CCAGAAAGCCAGGGAAGCTC-3'
<i>Cyclophilin</i>	
Sense:	5'-AGCACTGGGGAGAAAGGATT-3'
Antisense:	5'-AGCCACTCAGTCTTGGCAGT-3'
<i>Cx43/Gja1</i>	
Sense:	5'-TCCACTCTCGCCTATGTCT-3'
Antisense:	5'-GTAGTTCGCCAGTTTTC-3'
<i>Gsk3b</i>	
Sense:	5'-GCCACAGGAAGTCAGTTAC-3'
Antisense:	5'-GCAATCGGACTATGTTACAG-3'
<i>Hmger</i>	
Sense:	5'-CACAGTGCCACATAACAATTCG-3'
Antisense:	5'-CACAGTGCCACATAACAATTCG-3'
<i>Krox20/Egr2</i>	
Sense:	5'-CTACCCGGTGGAAGACCTC-3'
Antisense:	5'-TCAATGTTGATCATGCCATCTC-3'
<i>Mbp</i>	
Sense:	5'-CCATGGGAGATCCAGAGC-3'
Antisense:	5'-GGCACGCTTCCAAAATCT-3'
<i>Mp̄</i>	
Sense:	5'-TGCCCTGCTCTTCTCTCTT-3'
Antisense:	5'-TCCCTGTCCGTGTAAACCAC-3'
<i>Oaz1</i>	
Sense:	5'-GCCTGAGGGCAGTAAGGAC-3'
Antisense:	5'-GGAGTAGGGCGGCTCTGT-3'

---

*Oct6/Pou3f1*

---

Sense: 5'-GAGCGCAGACCCTCTCTG-3'  
Antisense: 5'-CATTTTTCGTTTCGTTTACCC-3'

---

*Periaxin*

---

Sense: 5'-AGAGCTATGGAGGCCAGGA-3'  
Antisense: 5'-CTCCACGATAATCTCCACCAA-3'

---

*Pmp22*

---

Sense: 5'-TGTACCACATCCGCCTTGG-3'  
Antisense: 5'-GAGCTGGCAGAAGAACAGGAAC-3'

---

*Rplp0*

---

Sense: 5'-GATGCCCAGGGAAGACAG-3'  
Antisense: 5'-CACAAATGAAGCATTGTTGGGTAG-3'

---

*Scap*

---

Sense: 5'-AAACAAGGAGAGCCCAGTGA-3'  
Antisense: 5'-CGAATATCTGCTGGATGTATGC-3'

---

*Ki67*

---

Sense: 5'-TGATGCTAAACTGGAAAATGGA-3'  
Antisense: 5'-CATCTGCTGCTGCTTCTCCT-3'

---

---

## 2.1.7 Antikörper

Tabelle 10: Antikörper

Epitop	Verdünnung	Spezies	Hersteller und Artikelnummer
Primärantikörper:			
Anti-Actin	1:5000	Maus	Sigma \#A3853
Anti-pAKT	1:1000	Kaninchen	Cell signaling \#3787
Anti-AKT	1:1000	Kaninchen	Cell signaling \#4691
Anti- GAPDH	1:5000	Maus	Stressgene \#CSA-335
Anti-pMAPK	1:1000	Kaninchen	Cell signaling \#9101
Anti-MAPK	1:1000	Kaninchen	Cell signaling \#4695
Anti-Tuj1	1:400	Kaninchen	Covance \#PRB-435P
Anti-MBP	1:5000	Kaninchen	Dako \#A0623
Sekundärantikörper:			
Maus-HRP	1:5000	Ziege	Dianova \#115035003
Kaninchen-HRP	1:5000	Ziege	Dianova \#111035003
Mouse-A488	1:2000	Affe	Invitrogen \#A21202
Mouse-A555	1:2000	Affe	Invitrogen \#A31570
Rabbit-A488	1:2000	Affe	Dianova \#711545152
Rabbit-A555	1:2000	Affe	Dianova \#111545144



### 2.1.8 Software

Tabelle 11: Software

Typ	Software	Hersteller	Stadt/Land
Bildanalysesoftware	Fiji/ImageJ 1,5	Wayne Rasband, NIH	Bethesda, USA
Bildbearbeitung	Gimp 2.8	The GIMP Team	Berkeley, USA
Mikroskopsoftware Elektronenmikroskopie	ImageSP	TRS image SysProg	Moorenwies
Mikroskopsoftware Lichtmikroskopie	Zeiss ZEN 2.1	Carl Zeiss Microscopy GmbH	Jena
Oligoanalyser	OligoAnalyzer 3.1	Integrated DNA Tech- nologies, Inc.	Coralville, USA
Statistiksoftware	Graph Pad PRISM 6	Graphpad Software, Inc.	La Jolla, USA
Text und Tabellenverar- beitung	Microsoft Office für Mac 16	Microsoft Corporation	Redmond, USA

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Versuchstiere

Die Haltung der Tiere erfolgte unter standardisierten Bedingungen und entsprechend der Empfehlungen der deutschen Gesellschaft für Versuchstierkunde im Tierhaus des Max-Planck-Instituts für Experimentelle Medizin in Göttingen. Die Raumtemperatur lag für alle Tiere bei  $22 \pm 1$  °C, die relative Luftfeuchtigkeit bei  $55 \pm 10$  %. Die Luftwechselrate lag bei 15-fach pro Stunde. Die Beleuchtung erfolgte mit Kunstlicht von 4:30 bis 16:30 Uhr MEZ mit einer Lichtintensität von 300 Lux, gemessen in einer Höhe von einem Meter über dem Fußboden in der Raummitte. Futter und Wasser waren zu jeder Zeit ad libitum verfügbar. Alle Versuche erfolgten entsprechend des Tierversuchsantrags 33.9.42502-04-017/09 beim Niedersächsischen Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit.

#### 2.2.1.1 Identifikation der Tiere und Schwanzbiopsien

Zur Genotypisierung der Versuchstiere wurde im Alter von drei Wochen beim Absetzen von der Mutter eine circa 0,5 cm lange Schwanzbiopsie entnommen und bis zur weiteren Verarbeitung bei  $-20$  °C gelagert. Gleichzeitig wurden die Tiere mit einer Ohrlochmarkierung zur späteren Identifikation versehen. Jede Ohrlochmarkierung wurde einem eindeutigen Identi-

fikationscode, bestehend aus einer Kennziffer für die jeweilige Tierlinie und einer fortlaufenden Nummer, zugeordnet. Dieser Identifikationscode wurde zusammen mit dem Geburtsdatum, Geschlecht und der Tierlinie auf einer Karte vermerkt und diese am Käfig befestigt. Für den Zeitraum der Versuche wurden diese Karten durch handgeschriebene Karten ersetzt, die keine Zuordnung zu Genotyp oder Behandlungsgruppe ermöglichten.

#### 2.2.1.2 Einteilung der Versuchstiere

In der vorliegenden Arbeit wurden zum einen Wildtyp-Ratten, zum anderen *Pmp22*-transgene Ratten verwendet. Wildtyp-Tiere wurden zu den Alterszeitpunkten postnataler Tag 0 bis postnataler Tag 6, postnataler Tag 0 bis postnataler Tag 21 und postnataler Tag 30 bis postnataler Tag 117 untersucht (im Folgenden p0 – p6 bzw. entsprechend genannt). Für die Behandlung der juvenilen Wildtyp-Tiere (p0 – p6 und p0 – p21) wurden neugeborene Wildtyp-Ratten randomisiert in zwei Gruppen eingeteilt. Für die Gruppe der adulten Tiere von p30 – p117 wurden die Tiere gewogen und in jeweils zwei gleich schwere Gruppen eingeteilt. Diese Einteilungen wurden von Herrn Dr. Bernhard G. Weiss durchgeführt.

Vor Behandlung der *Pmp22*-transgenen Versuchstiere sowie deren Wildtyp-Kontrollen wurden im Alter von 28 Tagen der Griffstärketest und eine Bestimmung des Körpergewichts durchgeführt. Die Ergebnisse wurden durch Herrn Dr. Bernhard G. Weiss ausgewertet und transgene Tiere und Wildtyp-Kontrollen in jeweils zwei in Gewicht und Muskelkraft vergleichbare Gruppen eingeteilt.

#### 2.2.1.3 Kraftmessung/Griffstärke

Mit Hilfe des Griffstärketests wurde die maximale Kraft der Versuchstiere untersucht. Die Messung der Griffstärke der vorderen und hinteren Extremität erfolgte im Alter von 3, 10, 13 und 16 Wochen. Alle Messungen wurden im Verlauf der Studie unter Blindung von Genotyp und Gruppenzugehörigkeit durchgeführt. Jede Messung wurde pro Extremität sieben Mal wiederholt. Der minimale und maximale Wert worden zur Vermeidung von Ausreißern eliminiert. Aus den verbleibenden fünf Werten wurde ein Mittelwert berechnet. Zur Messung der Griffstärke wurden die Tiere mit der Vorder- bzw. Hinterpfote auf eine horizontale, mit einem Kraftmesser verbundene Stange gesetzt. Nach dem Zugreifen der Tiere wurde ein horizontaler Zug auf den Schwanz ausgeübt und die maximale Kraft bis zum Loslassen des Tieres durch den Kraftmesser registriert (siehe Meyer zu Horste et al. 2007).

#### 2.2.1.4 Elektrophysiologische Analyse

Die elektrophysiologische Analyse der Lithium-behandelten *Pmp22*-transgenen Ratten und Kontrolltiere erfolgte geblendet für Genotyp und Gruppenzugehörigkeit im Alter von 16 Wochen. Die Tiere wurden durch eine intraperitoneale Injektion mit Ketaminhydrochlorid (100 mg/kg/KG) und Xylazinhydrochlorid (8 mg/kg/KG) anästhesiert. Zur Aufrechterhaltung der Körpertemperatur wurden die Tiere umgehend auf eine 37 °C temperierte

Wärmematte gelegt. Die Messung der Muskelsummenaktionspotentiale (MSAP) und der Nervenleitgeschwindigkeit (NLG) wurde am Schwanz durchgeführt.

Zur Bestimmung der motorischen NLG wurden zwei Stahlelektroden zur Stimulation an der Basis des Schwanzes (proximale Stimulation), sowie 2 cm distal davon (distale Stimulation) subkutan eingebracht. Die Ableitung erfolgte durch zwei weitere, 3 cm distal der Schwanzbasis eingebrachte Stahlelektroden. Die Stimulation durch supramaximale, 100  $\mu$ s dauernde Reize, sowie die Aufzeichnung erfolgte mittels eines Toennis Neuroscreen Elektrophysiologie-Geräts. Als Amplitude wurde die Differenz zwischen maximalem und minimalem Ausschlag definiert. Die NLG wurde automatisch aus der Differenz der Latenzen von proximaler und distaler Stimulation und der Strecke zwischen distaler und proximaler Stimulation berechnet.

Die Messung der sensiblen NLG erfolgte wiederum mittels des Toennis Neuroscreen Elektrophysiologie-Geräts in orthodromer Technik. Es wurden zwei Ableitungselektroden an der Schwanzbasis subkutan eingestochen. Eine Erdungselektrode wurde subkutan in der Haut des Rückens eingebracht. Die Stimulation erfolgte 2 cm distal durch zwei weitere Stahlelektroden. Zur Ableitung wurden die Summennervenaktionspotentiale aus 20 – 30 Stimulationen gemittelt. Die sensible NLG wurde aus der Distanz zwischen Stimulations- und Ableitungselektroden und der Latenz errechnet.

#### 2.2.1.5 Tötung von Versuchstieren und Präparation von Gewebe

Zur Gewinnung von Proben wurden die Tiere durch Einleiten von CO<sub>2</sub>-Gas in einen gasundurchlässigen Käfig getötet. Direkt nach Tötung der Tiere wurde durch Punktion des rechten Herzventrikels Blut zur Messung des Lithiumspiegels gewonnen. Für histologische und molekularbiologische Untersuchungen wurden Ischias- und Tibialisnerven entnommen. Nervenpräparate für molekularbiologische Untersuchungen wurden von Bindegewebe und Perineurium befreit, in flüssigen Stickstoff überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Biopsien zur histologischen Analyse wurden bis zur Einbettung in Fixativ nach Karlsson und Schultz fixiert.

#### 2.2.1.6 Bestimmung des Lithium-Serumspiegels

Die Bestimmung des Lithium-Serumspiegels wurde durch ein kommerzielles Labor (Labor Lademannbogen, Dr. med. Lämmel, Hamburg) für den Untersucher geblindet durchgeführt. Die Bestimmung erfolgte nach dem Verfahren der ionenselektiven Elektrode (Potentiometrie).

## 2.2.2 Lichtmikroskopie und Elektronenmikroskopie

### 2.2.2.1 Einbettung und Schneiden von Gewebe zur histologischen Untersuchung

Zur Anfertigung von Semi- oder Ultradünnschnitten wurden die fixierten Nerven in das Epoxydharz Epon eingebettet. Das Epon wurde aus 21,4 ml Glycidether 100, 14,4 ml DDSA, 11,3 ml MNA und 0,84 ml DMP-30 nach der Methode nach Luft (1961) hergestellt. Es erfolgte eine Vorkontrastierung mit Osmiumtetroxid, sowie die Entwässerung und Eponinfiltration mit Hilfe der automatischen Einbettmaschine Leica EM TP entsprechend des folgenden Schemas:

**Tabelle 12: Protokoll Epon-Einbettung von Gewebe zur Licht- und Elektronenmikroskopie**

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

Im Anschluss wurden die infiltrierte Nerven in Epon eingegossen und zur Polymerisation für 24 h auf 60 °C erhitzt. Die Epon-Blöckchen wurden mit Hilfe einer Leica EM TRIM Fräse in Form gefräst und mit einem Reichert Ultracut S Rotationsmikrotom und einem Diatome Ultra 35° Diamantmesser 0,5 µm Semidünnschnitte für Lichtmikroskopie angefertigt. Diese wurden auf einen Objektträger transferiert und bei 60 °C auf einer Wärmeplatte getrocknet. Zur elektronenmikroskopischen Analyse wurden Ultradünnschnitte in einer Dicke von 50 nm angefertigt. Diese wurde auf Formvar-befilmte Kupfergrids überführt und getrocknet.

#### 2.2.2.2 Färbung der Semidünnschnitte

Die Färbung der Semidünnschnitte erfolgte mit der Methylen-Azur-II-Färbung (Richardson et al. 1960). Die Methylenblau-Lösung und Azur-II-Lösung wurden im Verhältnis 1:1 gemischt und filtriert. Die fertige Lösung wurde auf die Schnitte gegeben und für 1 min bei 60 °C inkubiert und mit destilliertem Wasser abgespült. Die gefärbten Schnitte wurden 10 min bei 60 °C getrocknet und anschließend mit dem histologischen Einschlussmittel Eukitt® mit einem Deckglas verklebt.

#### 2.2.2.3 Lichtmikroskopie und Auswertung der Semidünnschnitte

Zur histologischen Auswertung und Beurteilung von axonalem Verlust und Demyelinisierung wurden mikroskopische Bilder der Semidünnschnitte angefertigt. Die mikroskopischen Aufnahmen wurden mit einem Zeiss Axiophot Lichtmikroskop mit einer Videomikroskopie-Kamera und der Software Zeiss Zen angefertigt. Dabei wurde der Nerv in einer Vergrößerung von 100x überlappend abfotografiert und von der Zeiss Bildverarbeitungssoftware zu einem Bild zusammengefügt. Die Quantifizierung der myelinisierten Axone erfolgte mit Hilfe der Software Fiji/ImageJ 1.5 (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) und dem Cell-Counter Plugin.

#### 2.2.2.4 Befilmen von Kupfergrids für Elektronenmikroskopie

Vorgeputzte Objektträger wurden in einer speziellen Glasküvette mit Ablaufvorrichtung mit 0,25 % Formvar-Lösung benetzt. Das Ventil der Küvette wurde geöffnet, sodass die Formvar-Lösung in einem gleichmäßigen Tempo an dem Objektträger entlanglief. Nach kurzem Trocknen wurde der so entstandene Formvar-Film an allen vier Seiten des Objektträgers mit einer Rasierklinge abgeschnitten. Schließlich wurde der Film durch Eintauchen im Winkel von ca. 25° mit der Schmalseite in eine bis zum Rand mit destilliertem Wasser gefüllte Küvette vom Objektträger abgelöst. Nach Abschwimmen der Formvar-Folie wurden die Kupfergrids mit der Unterseite nach oben auf den schwimmenden Film gelegt. Anschließend wurde der Film mit den Grids durch zügiges Eintauchen eines mit Papier beklebten Objektträgers von der Wasseroberfläche aufgenommen und zum Trocknen auf ein Papiertuch gestellt.

#### 2.2.2.5 Kontrastierung von Ultradünnschnitten für Elektronenmikroskopie

Biologische Gewebe streuen die vom Elektronenmikroskop auftreffenden Elektronen nur leicht. Daraus resultieren ein unzureichender Kontrast und ein flaes Bild. Zur Steigerung des Kontrastes können die Gewebe mit Schwermetallen behandelt werden. Die Kontrastierung der Ultradünnschnitte erfolgte für 30 min mit Uranylacetat und für 6 min mit Bleicitrat nach Reynolds (1963).

#### 2.2.2.6 Elektronenmikroskopie

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen erfolgten mit einem Zeiss EM 900 Transmissions-Elektronenmikroskop mit einer wide-angle dual speed 2K-CCD-Kamera (TRS, Moonweis) und der ImageSP Software (TRS, SysProg). Pro Nerv wurden 20 – 30 repräsentative Bilder über die gesamte Fläche des Nervens verteilt in einer Vergrößerung von 3000x aufgenommen. Zur Analyse der Kompaktierung des Myelins bzw. Messung der Abstände der Myelin-Hauptlinien (*major dense lines*) wurden zusätzlich Aufnahmen von myelinisierten Axonen mit einer Vergrößerung von 12000x angefertigt.

#### 2.2.2.7 g-ratio

Die g-ratio ist das Verhältnis zwischen Axondurchmesser und Myelindicke und ein Maß für die Myelinisierung der Axone (Quotient aus dem Durchmesser des Axons und der gesamten Faser). Als Standardwert für die g-ratio in gemischten Nerven der Ratte gilt ein Wert von ca. 0,68 (Fahrenkamp und Friede 1987). Pro Tier wurde auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen des Tibialisnerven mit der Software ImageJ 1.5 der Umfang und die Fläche von 150 bis 200 Axonen pro Versuchstier gemessen und daraus die g-ratio berechnet.

#### 2.2.2.8 Messung Abstände der Myelin-Hauptlinien (*major dense lines*)/Kompaktierung des Myelins

Zur Bestimmung der Dicke der einzelnen Myelinschichten wurde in elektronenmikroskopischen Aufnahmen von myelinisierten Nerven in einer Vergrößerung von 12000x die Dicke der Myelinschicht gemessen und durch Zählung der *major dense lines* die Anzahl der Myelinschichten bestimmt. Aus der Myelindicke und der Schichtanzahl wurde die durchschnittliche Dicke einer Myelinschicht bestimmt.

### 2.2.3 Zellkultur

#### 2.2.3.1 Kultivierung primärer Schwanzzellen aus Ratten

Ratten im Alter von zwei Tagen wurden durch Dekapitation getötet. Anschließend wurde der Körper mit 70 % Ethanol desinfiziert und beide Ischiasnerven präpariert und in eine Zellkulturschale mit DMEM überführt. Die Nerven wurden mit 0,03 % Collagenase und 0,25 % Trypsin für 30 min bei 37 °C lysiert. Die Lyse wurde durch Zugabe von fetalem Kälberserum

(FCS) gestoppt und die Zellen durch Zentrifugation für 5 min bei 800 rpm pelletiert. Anschließend wurden die Zellen in DMEM mit 10 % FCS resuspendiert und auf Poly-L-Lysin beschichtete Zellkulturplatten oder Schalen ausplattiert. Da die Schwannzellen im Gegensatz zu Fibroblasten ohne Stimulation nur sehr langsam proliferieren, wurde nach 24 h für drei Tage auf DMEM mit 10 % FCS und 0,01 mM Cytarabin als Mitosegift gewechselt, um Fibroblasten zu entfernen. Im Anschluss wurden die Zellen mit PBS gewaschen, um noch vorhandenes Cytarabin zu entfernen und auf das Expansionsmedium (DMEM, 10 % FCS, 0,77 % Rinder-Hypophysenextrakt und 4  $\mu$ M Forskolin) gewechselt. Zur Behandlung der Rattenschwannzellen mit Lithium wurde in konfluenten Kulturen dem Medium für 72 h entweder 1 mM/l  $\text{Li}_2\text{CO}_3$ , 1 mM/l  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  und Forskolin oder nur Forskolin zugegeben. Forskolin ist ein Aktivator der Adenylatcyclasen und führt zu einer Erhöhung des intrazellulären cyclischen Adenosinmonophosphats (cAMP). Ein erhöhter intrazellulärer cAMP-Spiegel führt in Schwannzellen zu Proliferation (Sobue et al. 1986), Differenzierung (Morgan et al. 1991) sowie zur Expression von Myelinen (LeBlanc et al. 1992).

#### 2.2.3.2 Einfrieren, Auftauen und Passagieren von Ratten-Schwannzellen

Konfluente Zellkulturschalen wurden mit PBS gewaschen und für 5 min bei 37 °C mit Trypsinlösung inkubiert. Die Lyse wurde durch Zugabe von DMEM mit FCS gestoppt, die Zellen resuspendiert und durch Zentrifugation für 5 min bei 800 rpm pelletiert. Danach wurden die Zellen in Medium resuspendiert und in der gewünschten Dichte auf Zellkulturplatten oder -schalen ausplattiert. Zum Einfrieren der Zellen wurden diese in DMEM mit 10 % DMSO und 12,5 % FCS resuspendiert und bei -80 °C, bzw. -196 °C für längere Lagerzeiten, eingefroren. Zum Auftauen wurden gefrorene Zellen zügig in warmem Medium resuspendiert, durch Zentrifugation pelletiert, in frischem Medium resuspendiert und auf Zellkulturplatten ausplattiert. Zur Vermehrung der Schwannzellen wurden diese maximal dreimal passagiert.

#### 2.2.3.3 Präparation von DRG-Neuron-Schwannzell-Co-Kulturen aus Ratten

Co-Kulturen aus Schwannzellen und DRG-Neuronen wurden nach einer modifizierten Methode nach Kleitman et al. (1998) präpariert. Trächtige E18 Rattenweibchen wurden durch Einleiten von  $\text{CO}_2$  in einen gasundurchlässigen Käfig getötet, der Uterus entfernt und in gekühltes MEM überführt. Die E18 Rattenembryonen wurden vorsichtig aus dem Uterus entfernt und die dorsalen Hinterwurzelganglien präpariert und für 45 min bei 37 °C in 5 % Trypsin lysiert. Die Lyse wurde durch Zugabe von FCS gestoppt und 10  $\mu$ l Suspension zur Zählung in einer Neubauer Zählkammer entnommen. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 800 rpm für 8 min pelletiert und in MEM mit 10 % FCS und 50 ng/ml NGF resuspendiert. Es wurden 200000 Zellen in 40  $\mu$ l Medium pro Deckglas ausplattiert. Nach 24 h wurde 1 ml Medium pro Deckglas aufgefüllt und für sieben Tage wachsen gelassen. Nach einer Woche wurde die Myelinisierung in vitro durch Wechsel auf MEM mit 10 %

FCS, 50 ng/ml NGF und 50 µg/ml Ascorbinsäure induziert. Während der Induktion der Myelinisierung wurde das Medium dreimal pro Woche gewechselt.

#### 2.2.3.4 Immunzytochemie von DRG-Neuron-Schwanzzell-Co-Kulturen aus Ratten

16 Tage nach Induktion der Myelinisierung wurden die Zellen für 10 min bei Raumtemperatur mit 4 % PFA fixiert und dreimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen durch 10 min Inkubation bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  in 95 % Methanol und 5 % Azeton permeabilisiert, erneut mit PBS gewaschen und unspezifische Antikörperbindungen durch zweistündige Inkubation mit 2 % Pferdeserum, 2 % BSA und 0,1 % Gelatine in PBS abgesättigt. Zur Darstellung von myelinisierten Segmenten erfolgte die Inkubation mit den Primärantikörpern anti-MBP, polyclonal rabbit (DAKO) 1:500 und Tuj-1, monoclonal mouse (Babco) 1:250 in 2 % Pferdeserum, 2 % BSA und 0,1 % Gelatine in PBS über Nacht bei Raumtemperatur. Als Sekundärantikörper kamen Alexa-488-goat-anti-rabbit (Invitrogen) 1:400 und Cy3-goat-anti-mouse (Jackson Immuno Research) 1:1000 für 45 min zum Einsatz. Gleichzeitig erfolgte eine Kernfärbung mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) 1:20000. Die myelinisierten Segmente wurden mit Hilfe eines Zeiss Observer Z Mikroskop gezählt.

### 2.2.4 Molekularbiologie

#### 2.2.4.1 Isolierung von genomischer DNA

Zur Genotypisierung der Versuchstiere wurde genomische DNA aus Schwanzbiopsien gewonnen. Die DNA-Extraktion erfolgte mit Hilfe des nexttec™ „DNA Isolation Kit for Tissue and Cells cleanPlates96“ entsprechend des Herstellerprotokolls. Dazu wurden die gefrorenen Biopsien aufgetaut und durch Proteinase K in dem Kit beiliegendem Puffer für 30 Minuten bei  $56\text{ }^{\circ}\text{C}$  und 200 rpm auf dem Schüttelinkubator verdaut. Das Lysat wurde auf die nexttec™cleanPlate überführt und die DNA nach einer Inkubationszeit von drei Minuten per Zentrifugation eluiert

#### 2.2.4.2 Genotypisierungs-Polymerasekettenreaktion aus genomischer DNA

Die Genotypisierung der Versuchstiere erfolgte durch Polymerasekettenreaktion (PCR) nach Mullis et al. (1986). Hierfür wurde das GoTaq-Reaktionssystem von Promega verwendet. Zur Anwendung kamen Primer, die spezifisch ein 495 Nukleotide langes Produkt des transgenen Maus-Pmp22 amplifizieren, jedoch an keine komplementären Bereiche innerhalb des Rattengenoms binden. Auf diese Weise konnte sicher zwischen transgenen und Wildtyp-Tieren unterschieden werden. Für die PCR wurde ein Reaktionsvolumen von 20 µl verwendet:



**Tabelle 13: Protokoll Genotypisierungs-PCR für *Pmp22*-transgene Tiere**

DNA	1 µl
5'-Primer (5 pmol/ µl)	1 µl
3'-Primer (5 pmol/ µl)	1 µl
dNTPs (je Nukleotid 2,5 mM)	1 µl
5x Buffer	4 µl
GoTaq	0,1 µl
ddH <sub>2</sub> O	11,9 µl

Die Amplifikation der DNA erfolgte nach folgendem Schema:

3 min	@ 95 °C	} 32 Zyklen
45 s	@ 56 °C	
60 s	@ 72 °C	
30 s	@ 95 °C	
60 s	@ 55 °C	
10 min	@ 72 °C	

#### 2.2.4.3 Agarosegelelektrophorese und Detektion zur Genotypisierung

Zur Detektion der amplifizierten DNA wurde eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Zur Verwendung kamen 1,5%ige Gele. Es wurde TAE-Puffer in der Mikrowelle erwärmt und die Agarose gelöst. Nach dem Zugeben von Ethidiumbromid (1 µg/ml) wurde die Agarose in eine Gelkammer gegossen und Gelkämme zur Herstellung von Probestaschen eingesetzt. Nach dem Erstarren der Agarose wurde das Gel mit TAE-Puffer übergossen und die PCR-Proben in die Taschen pipettiert. Zur späteren Identifizierung der Banden wurde zusätzlich ein Größenmarker verwendet (Promega 1 kb DNA Ladder). Nach dem Anlegen einer Spannung wandern die negativ geladenen Nukleinsäure-Moleküle im elektrischen Feld zur Kathode. Unterschiedlich lange Moleküle haben eine unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeit und lassen sich auf diese Weise nach ihrer Größe auftrennen. Durch Interkalierung des Ethidiumbromids in die DNA konnte diese unter UV-Licht sichtbar gemacht und abfotografiert werden. Alternativ zu Ethidiumbromid wurde der nicht mutagene Fluoreszenzfarbstoff GelRed™ (Biotium) verwendet.

#### 2.2.4.4 Präparation von RNA

Die Isolierung von RNA erfolgte mit Hilfe des RNeasy Mini Kit von Quiagen entsprechend des Herstellerprotokolls. Zur Isolierung von RNA aus bei -80 °C gelagerten Ischiasnerven wurden diese in einem 2 ml Eppendorf Reaktionsgefäß in 1 ml Quiazol Lysis Reagenz mit einem Ultra-Turrax Homogenisator zerkleinert. Der Homogenisator wurde nach jeder Probe dreimal mit destilliertem Wasser zur Vermeidung von Kontamination gereinigt. Anschließend wurden die Proben für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und mit 200 µl Chloroform versetzt. Nach Mischen mit dem Vortex und einer weiteren Inkubation von 3 min bei

Raumtemperatur erfolgte die Zentrifugation für 15 min bei 12000 g und 4 °C mittels Kühlzentrifuge. Anschließend wurde die wässrige, RNA-haltige Phase in ein neues Gefäß überführt, mit derselben Menge 70 % Ethanol versetzt, gemischt und auf die Silikat-Membran einer RNeasy-Säule pipettiert. Die RNA bindet an die Silikat-Membran der Säule, während die Lösung mit Hilfe des QuiVac24 Vakuumsystems durch die Säule gesaugt wurde. Es folgten Waschschriffe mit den mitgelieferten Puffern RW1 und RPE. Anschließend wurde die Säule in ein 2 ml Gefäß überführt, durch Zentrifugation bei 8000 g getrocknet, in ein neues 1,5 ml Gefäß überführt und die RNA mit 50 µl RNase freiem Wasser eluiert. Zur Isolierung von RNA aus kultivierten Schwannzellen wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Danach erfolgte die Lyse der Zellen mit RLT-Puffer und β-Mercaptoethanol (10 µl/ml RLT). Das Lysat wurde in ein neues 2 ml Gefäß überführt und mit derselben Menge 70 % Ethanol versetzt. Diese Lösung wurde auf die Membran einer RNeasy Säule pipettiert. Anschließend wurde wie vorher beschrieben fortgefahren.

#### 2.2.4.5 Reverse Transkription von RNA

Die Konzentrationsbestimmung der RNA erfolgte photometrisch anhand der OD260 mit Hilfe des NanoDrop 2000 Spectrophotometers (Thermo Scientific). Zur Synthese von komplementärer DNA (cDNA) wurden 500 ng RNA eingesetzt. Die Synthese erfolgte mit dem Reaktionssystem Superscript-III<sup>TM</sup>MRT (Invitrogen) entsprechend der Herstellerangaben. Zur spezifischen Transkription von messenger RNA (mRNA) wurden poly-Thymidin-Primer (dT-Primer 0,6 µM) verwendet. Zusätzlich wurden random nonamer primer (N9-Primer 120 µM) zur Effizienzsteigerung der reversen Transkription verwendet. Das Annealing erfolgte für 2 min bei 70 °C. Anschließend wurden 4 µl 5x *1st strand buffer*, 2 µl Dichlordiphenyltrichlorethan (DDT, 100 mM), 1 µl gemischte Nukleotide (10 mM), sowie 1 µl Superscript-III<sup>TM</sup>MRT-Polymerase mit einer Aktivität von 200 U/µl zugefügt. Die Elongation erfolgte für 10 min bei 25 °C, 45 min bei 45 °C und 45 min bei 55 °C.

#### 2.2.4.6 Semiquantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

Die qRT-PCR dient der relativen Quantifizierung von mRNA eines Gens im Vergleich zu einem konstant exprimierten Gen (Housekeeping-Gen). Die qRT-PCR erfolgte dabei nach dem Prinzip der PCR nach Mullis et al. (1986). Die Detektion der entstandenen PCR-Produkte erfolgte durch den asymmetrischen Cyanin-Farbstoff Sybr®Green, der in doppelsträngige Nukleinsäuren interkaliert und grünes Licht bei  $\lambda_{\max} = 521$  nm emittiert. Die Intensität der Fluoreszenz ist dabei proportional zur Menge der doppelsträngigen Nukleinsäuren (Rye et al. 1992). Die Registrierung erfolgte am Ende jeder Elongationsphase. Die Anzahl der PCR-Zyklen, bis zu der ein definierter Grenzwert der Fluoreszenz überschritten wird, wird als Ct (*threshold cycle*) definiert. Die Auswertung der PCR erfolgte nach der  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode (Livak und Schmittgen 2001). Dabei wird der Ct-Wert des Standardgens von dem Ct-Wert des untersuchten Gens abgezogen und der  $\Delta Ct$  eines Kalibrators von allen  $\Delta Ct$ -Werten abgezogen. Dieser  $\Delta\Delta Ct$ -Wert wird in die Formel „Expression =  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ “

eingesetzt. Die Expression wird dabei als n-fache Expression des Kalibrators angegeben. In der Regel wurden die Werte auf die Kontrollgruppe normalisiert. Die qRT-PCR wurde mit einem LightCycler© 480 von Roche im 384 well Format mit dem SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) durchgeführt. Pro Gen und Probe wurden vier technische Replikate erstellt und der Mittelwert gebildet. Es wurde der von Applied Biosystems empfohlene Reaktionsansatz verwendet:

**Tabelle 14: Protokoll qRT-PCR für Genexpressionsanalysen**

cDNA	2 µl
5'-Primer (50 pmol/ µl)	0,2 µl
3'-Primer (50 pmol/ µl)	0,2 µl
SYBR®-Green Master Mix	5 µl
H <sub>2</sub> O	2,6 µl

Die Amplifikation erfolgte nach folgendem Schema:

10 min	@ 95 °C	} 45 Zyklen
15 s	@ 56 °	
20 s	@ 72 °	
40 s	@ 95 °	

#### 2.2.4.7 Isolierung von Proteinen

Zur Durchführung von Western-Blot-Analysen wurden Proteine aus Ischiasnerven isoliert. Bei  $-80\text{ °C}$  gefrorene Ischiasnerven wurden in 2 ml Eppendorfgefäße mit 200 µl Sucrosepuffer (Sucrose 320 mM, Tris 10 mM,  $\text{NaHCO}_3$  1 mM,  $\text{MgCl}_2$  1 mM, Proteinaseinhibitor und Phosphataseinhibitor) und 25 mm Keramikugeln überführt und mit einem Precellys 24 Homogenisator (PeqLab) zweimal bei 3000 rpm für 10 s homogenisiert. Die Homogenisate wurden für 10 min bei 15000 rpm bei  $4\text{ °C}$  in der Kühlzentrifuge zentrifugiert, der Überstand in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und bis zur Verwendung bei  $-20\text{ °C}$  gelagert. Kultivierte Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit einem Cell Scraper in 100 µl Sucrosepuffer gescrap. Die Zellsuspension wurde durch mehrfaches pipettieren mit einer 200 µl Pipette homogenisiert und für 10 min bei 15000 rpm und  $4\text{ °C}$  in der Kühlzentrifuge zentrifugiert und der Überstand wiederum bei  $-20\text{ °C}$  gelagert.

#### 2.2.4.8 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinen erfolgte mit Hilfe des Bio-Rad DC Protein Assay Kit nach der Methode von Lowry et al. (1951) entsprechend des Herstellerprotokolls. Die Proteinmessung erfolgte photometrisch mit einem Thermo-Max Microplate reader bei  $\lambda = 600\text{ nm}$  auf einer 96-well Mikrotiterplatte. Die Standardisierung erfolgte mit einer Standardreihe mit  $0,1\text{ µg/µl}$ ,  $0,2\text{ µg/µl}$ ,  $0,4\text{ µg/µl}$ ,  $0,8\text{ µg/µl}$ ,  $1,2\text{ µg/µl}$ ,  $1,6\text{ µg/µl}$ ,  $2,0\text{ µg/µl}$  und  $3,0\text{ µg/µl}$  bovines Serum-Albumin (BSA). Von der Standardreihe wurden zwei technische Replikate durchgeführt, von jeder Probe drei technische Replikate.

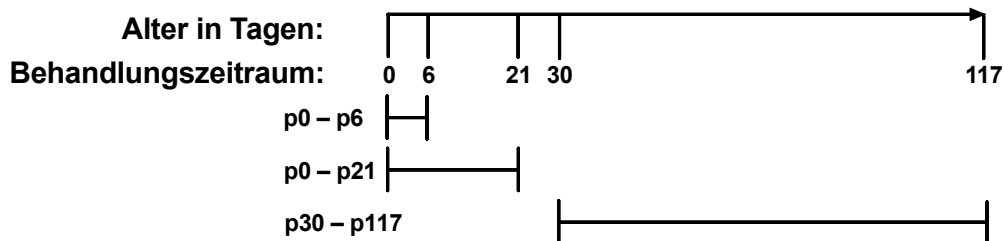
#### 2.2.4.9 Western Blot

Proteinextrakte wurden mit dem Probenpuffer versetzt und bei 80 °C für 10 min denaturiert. Es wurden 20 µg einer denaturierten Probe mit jeweils 4 µl β-Mercaptoethanol und 10 µl Loading Dye für die Gelelektrophorese eingesetzt. Für die SDS-PAGE-Gelelektrophorese wurde das NuPAGE-Gelelektrophoresesystem von Invitrogen mit dem Kammer-System Xcell SureLock und mit NuPAGE-Gelen mit zehn Taschen verwendet. Der Aufbau der Xcell SureLock Kammer erfolgte gemäß dem Herstellerprotokoll von Invitrogen. Die PVDF-Membran wurde vor dem Einsatz für 30 s in 100 % Methanol aktiviert und danach kurz in Transfer-Puffer gewaschen. Nach Anlegen der Spannung, wandern die Proteine von der Kathode zur Anode und werden auf der PVDF-Membran durch hydrophobe und elektrostatische Bindungen fixiert. Die gesamte Western-Blot-Apparatur wurde zur Kühlung in ein Eisbad gestellt. Bei 400 mA und 30 V wurden die Proteine für 2 h transferiert. Nach Beendigung des Blottes wurde die Membran für 1 h bei Raumtemperatur in Blocking-Puffer inaktiviert. Nun wurde die Membran mit dem primären Antikörper in entsprechender Verdünnung in Blocking-Puffer bei 4 °C über Nacht inkubiert, gefolgt von vier Waschschriften für je 10 min mit TBS-T. Folgend wurde der sekundäre HRP-konjugierte Antikörper (1:5000 verdünnt in TBS-T) für 60 bis 90 min appliziert. Nach erneutem Waschen mit TBS-T wurde die PVDF-Membran mit ECL-Lösung (PARKIN-ELMER) für 1 min nach Angaben des Herstellers inkubiert und in einer Plastiksutzfolie verpackt. Unter Lichtabschluss wurde die Membran je nach Signalstärke für unterschiedliche Zeiten (10 s bis 30 min) einem automatischen Western-Blot-System der Firma Intas exponiert. Zum erneuten Detektieren mit einem weiteren primären Antikörper, wurde die PVDF-Membran in einem Stripping-Puffer für 2 h bei 60 °C behandelt, zweimal 20 min mit TBS-T bei Raumtemperatur gewaschen. Die Auswertung der Western-Blot-Aufnahmen erfolgte mittels des Plug-in Gel-Analyser der Software ImageJ.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Einfluss von Lithium auf die Myelinisierung im peripheren Nervensystem von Wildtyp-Ratten

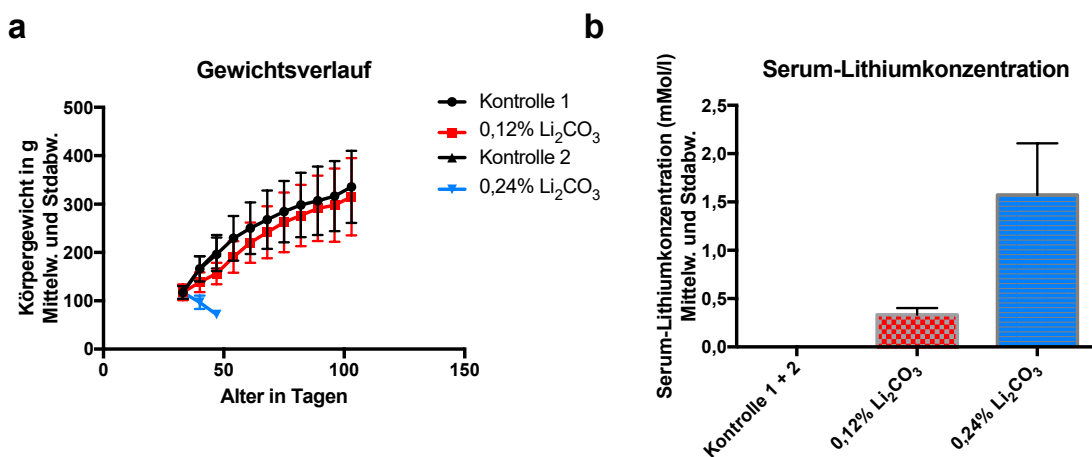
Um den Einfluss von Lithium auf die Myelinisierung zu untersuchen wurden zwei Zeitpunkte während der Myelinisierung (p0 – p6 und p0 – p21) sowie ein späterer Zeitpunkt nach Abschluss der Myelinisierung (p30 – p117) gewählt. Männliche, neugeborene Ratten wurden nach Geburt randomisiert in Gruppen aufgeteilt. Aufgrund der altersabhängigen Ernährung der neugeborenen Ratten über die Muttermilch hätte sich bei oraler Applikation von Lithium an die Muttertiere eine sehr unsichere Dosis von Lithium in den untersuchten Tieren ergeben. Daher wurde sich zu einer intraperitonealen Gabe von Lithiumchlorid entschieden. Hierzu wurden die Tiere täglich gewogen und 1 mMol LiCl/kg/KG (50 mg/kg/KG) intraperitoneal injiziert. Am 6. bzw. 21. Lebenstag wurden die Tiere getötet und Gewebe zur histologischen und molekularbiologischen Untersuchung entnommen. Männliche Ratten im Alter von 30 Tagen wurden in je zwei gleich schwere Behandlungs- und Kontrollgruppen aufgeteilt und ab dem 30. Lebenstag entweder mit Standardfutter (n = 20, Durchschnittsgewicht Tag 33 = 117 g), mit 0,12 % Lithiumcarbonat ( $\text{Li}_2\text{CO}_3$ ) (n = 10, Durchschnittsgewicht = 118 g) oder 0,24 %  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  (n = 10, Durchschnittsgewicht = 117 g) angereichertem Futter ernährt (Abbildung 1).



**Abbildung 1: Schematische Darstellung der Behandlung von Wildtyp-Ratten mit Lithium.** Behandlungszeiträume p0 – p6 (n = 5 je Gruppe) und p0 – p21 (n = 8 je Gruppe) während der Myelinisierung. Diese Tiere erhielten tägliche intraperitoneale Injektionen mit 1 mM LiCl/kg/KG (50 mg/kg/KG) bzw. physiologische Kochsalzlösung in der Kontrollgruppe. Behandlungszeitraum p30 – p117 (n = 10 je Gruppe) nach Abschluss der Myelinisierung. Diese Tiere erhielten Futter mit 0,12 %  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  bzw. 0,24 %  $\text{Li}_2\text{CO}_3$ . Die entsprechende Kontrollgruppe erhielt Standardfutter. Zum Abschluss des jeweiligen Behandlungszeitraums wurden die Tiere getötet und Gewebe zur histologischen und molekularbiologischen Analyse entnommen.

Die Tiere, die 0,24 %  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  erhielten, zeigten einen deutlichen Gewichtsverlust (Abbildung 2) sowie eine rapide Verschlechterung des Allgemeinzustandes. Das Gewicht der Tiere mit 0,24 %  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  betrug an Lebenstag 47 durchschnittlich nur 72 g (Tiere mit Standardfutter: 196 g, Tiere mit 0,12 %  $\text{Li}_2\text{CO}_3$ : 156 g). Daher wurde beschlossen die Versuchsgruppe mit 0,24 % zu beenden. Diese Tiere sowie die entsprechende Kontrollgruppe wurden getötet und Blut zur Bestimmung der Lithiumkonzentration entnommen. Aus technischen Gründen

(geringe Blutmenge) war nur bei vier Tieren aus der 0,24 %  $\text{Li}_2\text{CO}_3$ -Gruppe eine Konzentrationsbestimmung von Lithium im Blut möglich. Auf eine weitere histologische und molekularbiologische Untersuchung der entnommenen Gewebe wurde aufgrund des Gewichtsverlustes und des schlechten Allgemeinzustandes der Tiere verzichtet. Am 117. Tag wurden die übrigen Ratten gewogen und nach dem Töten Blut aus dem rechten Ventrikel entnommen. Außerdem wurden Gewebe zur histologischen und molekularbiologischen Untersuchung gewonnen. In der Gruppe mit 0,12 %  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  zeigte sich an Tag 117 im Durchschnitt ein Körpergewicht von 329 g (Standardfutter 351 g) und eine Serumkonzentration von 0,33 mmol/l, in der Gruppe mit 0,24 %  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  eine Serumkonzentration von 1,57 mmol/l (Tag 47) (Abbildung 2).



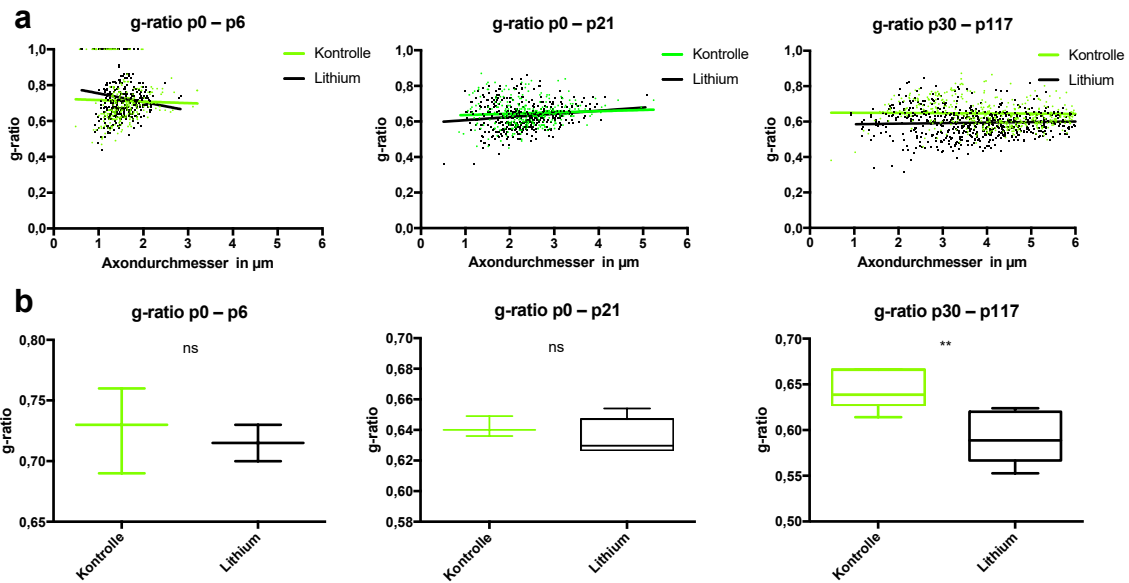
**Abbildung 2: Gewicht und Serum-Lithiumkonzentration in Wildtyp-Ratten nach Lithiumbehandlung.**

a) Darstellung des Gewichtsverlaufs nach oraler Gabe von Lithiumcarbonat (0,12 % und 0,24 %  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  sowie entsprechende Kontrollgruppen) über die Nahrung. Tiere aus der Gruppe mit 0,24 %  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  zeigten einen deutlichen Gewichtsverlust im Vergleich zu den anderen Gruppen (Gewicht an Tag 47: Mittelwert Kontrolle 1 = 196 g, 0,12 %  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  = 156 g, Kontrolle 2 = 201 g, 0,24 %  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  = 72 g, n = 10) b) Bestimmung der Serum-Lithiumkonzentration mittels ionenselektiver Elektrode (durchgeführt durch Labor Lademannbogen, Hamburg). Kontrolle n = 16, Mittelwert Serum-Lithiumkonzentration 0,12 %  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  = 0,33 mmol/l (Tag 117), n = 10, 0,24 %  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  = 1,57 mmol/l (Tag 47), n = 4.

### 3.1.1 Histologische Analyse von Tibialisnerven

Tibialisnerven wurden in Lösung nach Karlsson und Schultz (1965) fixiert, in Epoxidharz eingebettet und Schnitte für Elektronenmikroskopie angefertigt. Es wurden repräsentative Ausschnitte der Tibialisnerven mit dem Elektronenmikroskop in einer 3000x Vergrößerung abfotografiert, der Umfang von Axon und Myelinscheide gemessen und daraus die g-ratio als Maß für die relative Myelindicke (Fahrenkamp und Friede 1987) berechnet. Zu den beiden frühen Zeitpunkten während der Myelinisierung, p0 – p6 und p0 – p21, zeigte sich kein Unterschied in der g-ratio zwischen behandelten Tieren und der Kontrollgruppe. Die Gruppe der langzeitbehandelten Tiere nach Abschluss der Myelinisierung, p30 – p117, zeigte eine statistisch signifikant kleinere g-ratio (Mittelwert Kontrolle 0,6428, Mittelwert Lithium

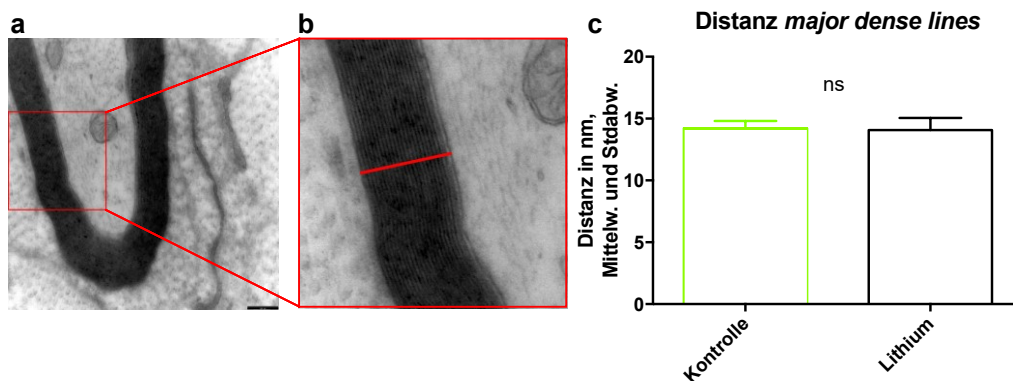
0,5936,  $p < 0,01$ ) als Ausdruck einer dickeren Myelinscheide im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (Abbildung 3).



**Abbildung 3: Histologische Analyse der relativen Myelindicke (g-ratio) in Tibialisnerven von Wildtyp-Ratten nach Lithiumbehandlung.** grün: Wildtyp-Ratten ohne Lithiumbehandlung (Kontrolle), schwarz: Wildtyp-Ratten nach Lithiumbehandlung. a) Auftragung der Myelindicke (g-ratio) auf den Axondurchmesser. In den Altersgruppen p0 – p6 und p0 – p21 fand sich kein statistisch signifikanter Unterschied. In der Gruppe p30 – p117 zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied der Höhe der linearen Regression ( $p < 0,0001$ ). Die Steigung der linearen Regression unterschied sich nicht. b) In den Altersgruppen p0 – p6 bzw. p0 – p21 zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied des mittleren g-ratios. In der Gruppe p30 – p117 zeigte sich nach Lithiumbehandlung ein statistisch signifikanter Unterschied des g-ratios, entsprechend einer Zunahme der Myelindicke nach Lithiumbehandlung. Boxplots mit Median, Quartil, Min./Max.. Mann-Whitney-U-Test (\*\*  $p < 0,01$ ). p0 – p6 n = 3 je Gruppe; p0 – p21 Kontrolle n = 3, Lithium n = 5; p30 – p117 Kontrolle n = 6, Lithium n = 7.

Schwanzellen umgeben die Axone mit ihrer Zellmembran spiralförmig und bilden so das Myelin. Die direkt aneinander liegenden Zellmembranen ohne dazwischen befindliches Zytoplasma bilden das kompakte Myelin. Die gegenüberliegenden Anteile der intrazellulären Membran stellen dabei die sogenannte *major dense line*, die gegenüberliegenden extrazellulären Anteile die *intra-period line* dar. Der Abstand zwischen zwei *major dense lines* beträgt im peripheren Nervensystem ca. 15 nm (Kirschner und Blaurock 1992). Um zu bestätigen, dass es sich bei der Abnahme der g-ratio um eine echte Zunahme der Myelindicke und nicht um eine Verbreiterung der einzelnen Schichten des Myelins bzw. eine Veränderung der Kompaktierung des Myelins handelte, wurden von Tieren aus der Gruppe p30 – p117 mikroskopische Aufnahmen der Myelinschicht von Tibialisnerven mit einer Vergrößerung von 12000x angefertigt. Die Dicke der Myelinschicht wurde gemessen und durch die Anzahl der *major dense lines* geteilt. Es zeigte sich ein durchschnittlicher Abstand der *major dense lines* von 14,23 nm in der Kontrollgruppe und 14,08 nm in der Lithiumgruppe (Mann-Whitney-U-Test,  $p = 0,9$ ). Es gab also keinen Unterschied in dem durchschnittlichen Abstand zwischen zwei *major dense*

*lines* zwischen behandelten und unbehandelten Tieren. Daraus lässt sich schließen, dass es sich um eine Zunahme der Myelindicke und nicht um eine Veränderung der Myelinkompaktierung handelte (Abbildung 4).



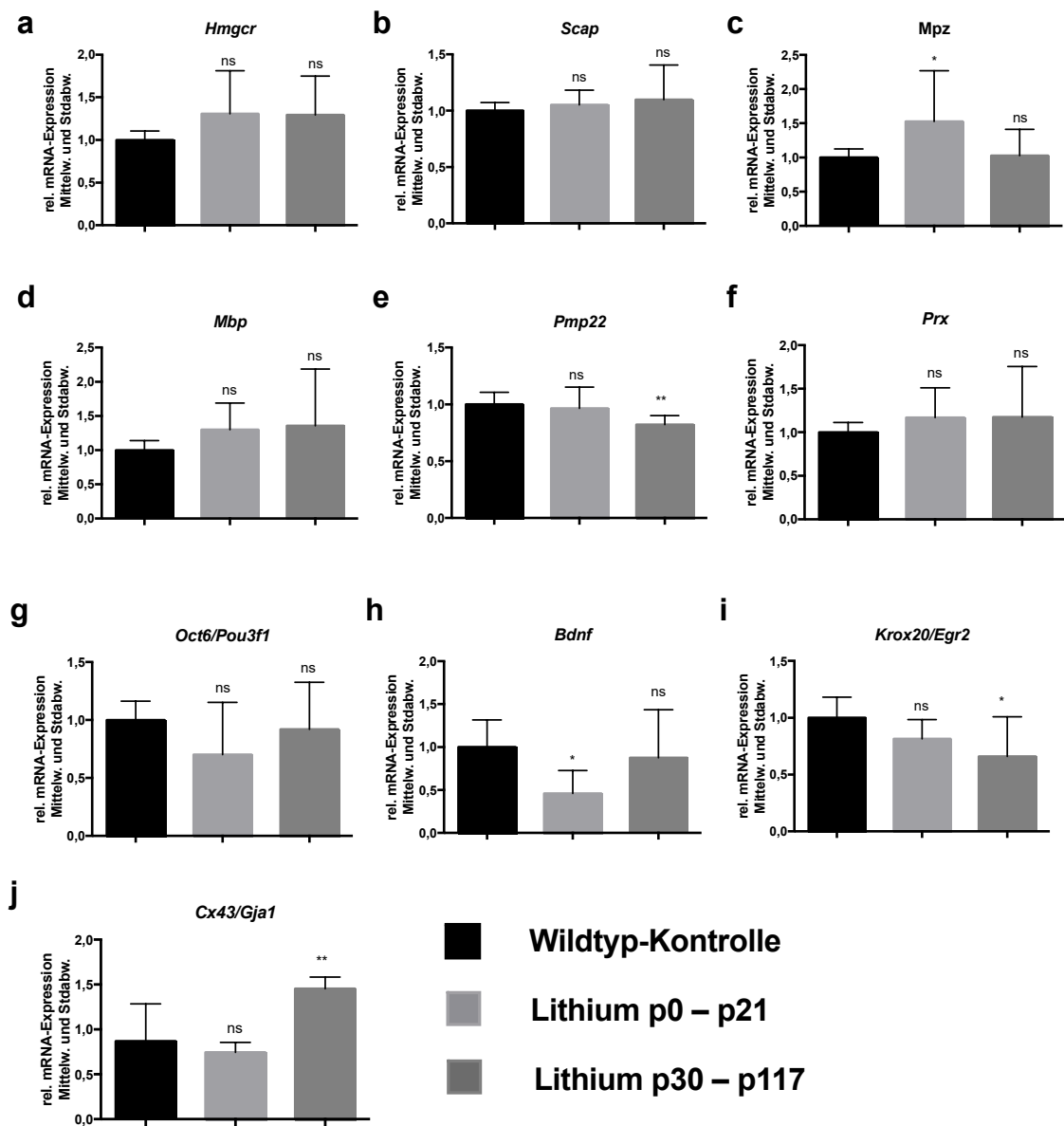
**Abbildung 4: Histologische Analyse der Myelinkompaktierung in Tibialisnerven von Wildtyp-Ratten nach Lithiumbehandlung.** grün: Wildtyp-Ratten p30 – p117 ohne Lithiumbehandlung (Kontrolle), schwarz: Wildtyp-Ratten p30 – p117 nach Lithiumbehandlung. a) Repräsentative, elektronenmikroskopische Aufnahme eines Axons mit Myelinscheide aus dem Tibialisnerv einer 117 Tage alten Ratte. 12000x Vergrößerung. b) Vergrößerter Ausschnitt aus a). Die Dicke der Myelinschicht wurde gemessen und durch die Anzahl der *major dense lines* dividiert. c) Durchschnittlicher Abstand der *major dense lines* als Maß für die Dicke der einzelnen Myelinlamellen (Myelinkompaktierung). Ein Unterschied zwischen Lithium-behandelten- und Kontrolltieren ergab sich nicht. Mann-Whitney-U-Test, n = 3 je Gruppe.

### 3.1.2 Genexpressionsanalysen aus RNA-Isolaten von Ischiasnerven

Aus entnommenen Ischiasnerven wurde RNA isoliert und nach erfolgter cDNA-Synthese die relative Expression verschiedener Gene normalisiert auf konstant exprimierte Gene mittels qRT-PCR in den Altersgruppen p0 – p21 und p30 – p117 gemessen. Hierbei wurde die Expression verschiedener Gene für Myelinproteine sowie der für die Cholesterinbiosynthese essentiellen Gene HMG-CoA-Reduktase (*Hmgcr*) und *sterol regulatory element-binding protein cleavage-activating protein* (*Scap*) untersucht. Außerdem wurde die relative Expression von Periaxin (*Prx*), der Transkriptionsfaktoren *Oct6/Pou3f1* und *Krox20/Egr* sowie des Neurotrophins *brain-derived neurotrophic factor* (*Bdnf*) bestimmt. Es zeigte sich nach 21 Tagen Behandlung eine statistisch signifikant höhere Expression des Myelinproteins 0 (*Mpz*) (Abbildung 5c) sowie tendenziell eine erhöhte Expression des basischen Myelinproteins (*Mbp*) (Abbildung 5d) sowie der für die Cholesterinsynthese geschwindigkeitsbestimmenden HMG-CoA-Reduktase (Abbildung 5a). Die Expression von *Bdnf* war in der Gruppe p0 – p21 statistisch signifikant auf etwa 50 % der Kontrollgruppe erniedrigt ( $p = 0,021$ ) während sich in der Gruppe p30 – p117 kein Unterschied in der *Bdnf*-Expression verglichen mit der Kontrollgruppe fand (Abbildung 5h). Das periphere Myelinprotein *Pmp22* (Abbildung 5e), der Transkriptionsfaktor *Krox20/Egr* (Abbildung 5i) sowie Connexin 43 (*Cx43*) (Abbildung 5j), als Indikator für eine Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs, waren lediglich zum Zeitpunkt p30 – p117 differentiell reguliert, während sich zu dem frühen Zeitpunkt kein signifikanter Unterschied fand. Die Expression von *Scap*, *Prx*, sowie des Transkriptionsfaktor



*Oct6/Pou3f1* waren weder in der Altersgruppe p0 – p21 noch in der Gruppe p30 – p117 nach Behandlung der Wildtyp-Ratten mit Lithium signifikant differentiell reguliert (Abbildung 5b,f,g).

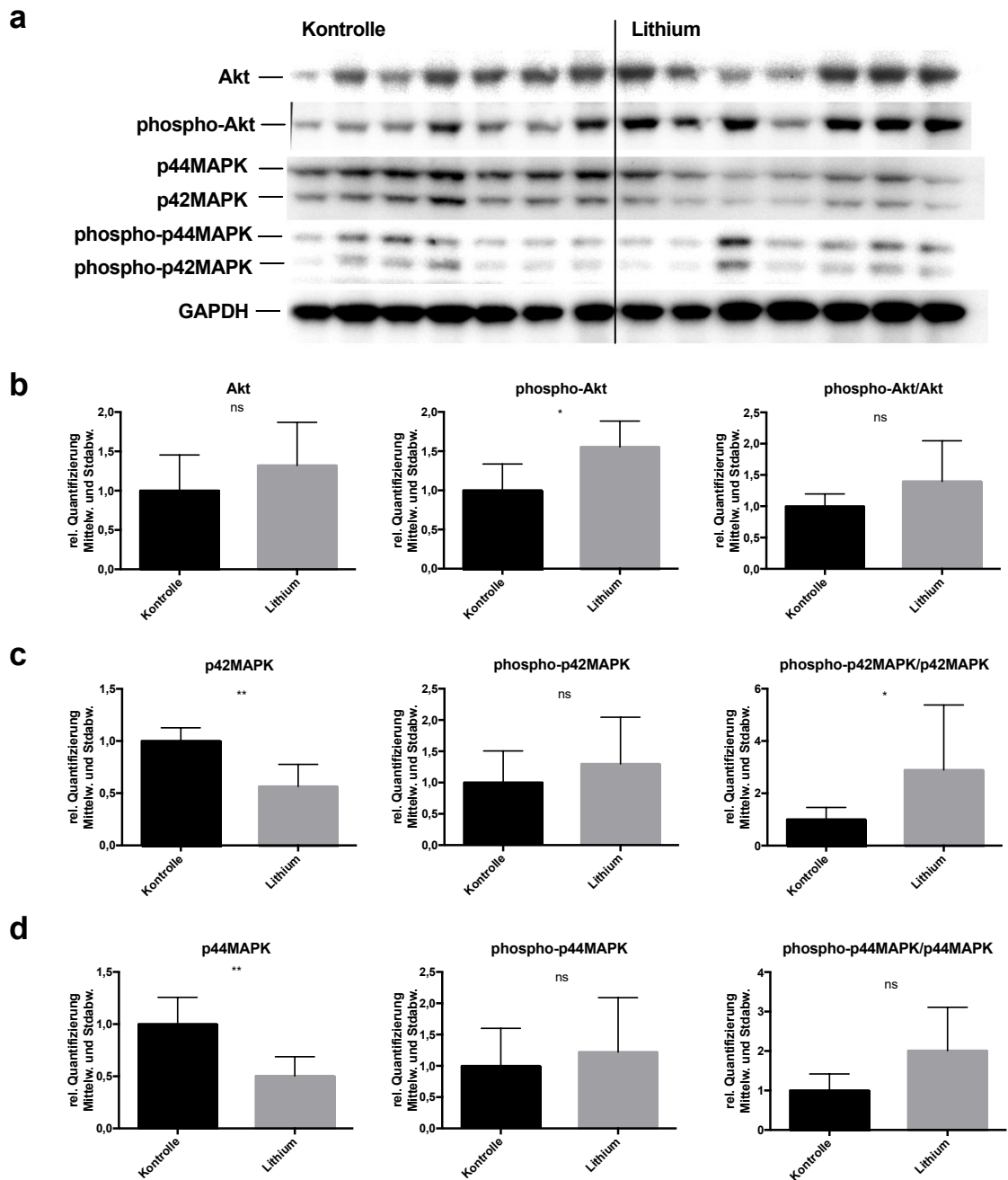


**Abbildung 5: Genexpressionsanalysen aus Ischiasnerven von Wildtyp-Ratten nach Lithiumbehandlung.** Relative mRNA-Expression normalisiert auf unbehandelte Wildtyp-Ratten. Standardisiert auf die konstant exprimierte Gene *Rplp0* und *Oaz1*. Wildtyp-Kontrolle: unbehandelte Wildtyp-Ratten n = 11; Lithium p0 – p21: Wildtyp-Ratten mit 1mM LiCl/kg/KG intraperitoneal behandelt n = 6; Lithium p30 – p117: Wildtyp-Ratten mit 0,12 % Li<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> p. o. behandelt n = 6. Mittelwert und Standardabweichung, One-way-ANOVA mit Tukey post-hoc-Test (\* p < 0,05, \*\* p < 0,01).

### 3.1.3 Proteinanalysen aus Proteinlysaten von Ischiasnerven

Lithium ist in der Lage über die Inhibition von GSK3b den Abbau von  $\beta$ -Catenin zu hemmen (Phiel und Klein 2001). Der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg stimuliert die Myelingenexpression. Eine Hemmung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs führt zu einer Hypomyelinisierung (Tawk et al. 2011). Neben diesem bekannten Signalweg ist Lithium auch in der Lage den

PI3K/AKT-Signalweg (Sinha et al. 2005) sowie den MAPK/ERK-Signalweg (Einat et al. 2003; Pardo et al. 2003) zu beeinflussen. Der PI3K/AKT-Signalweg spielt eine entscheidende Rolle in der Myelinisierung. So steuert der AKT-Signalweg die Umhüllung des Axons und reguliert die Dicke des Myelins im peripheren Nervensystem (Normén und Suter 2013; Domenech-Estevéz et al. 2016). Bei einer Überaktivierung des PI3K/AKT-Signalwegs in Schwanzzellen kommt es zu einer fokalen Hypermyelinisierung, Myelin *outfoldings* (zusätzliche Myelinschleifen, die sich innerhalb des Schwanzzell-Zytoplasmas befinden oder das Axon außerhalb der normalen Myelinscheide umgeben) und Ausbildung von Tomaculas (abnormale, fokale Verdickungen des Myelins) (Goebbels et al. 2012). Der MAP/ERK-Signalweg spielt eine wichtige Rolle in der Entwicklung des peripheren Nervensystems. Deletion von *ERK1/2* in Schwanzzell-Vorläuferzellen in Knock-Out-Mäusen führt zu einer Hypomyelinisierung (Newbern et al. 2011). Um zu überprüfen, inwiefern Lithium über einen dieser beiden Signalwege die Myelinisierung beeinflusst, wurden Western-Blot-Analysen aus Proteinlysaten von Ischiasnerven Lithium-behandelter Wildtyp-Ratten (p30 – p117 mit 0,12 %  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  p. o.) auf AKT/phospho-AKT sowie auf die 42 kDa und 44 kDa Isoformen der MAPK/phospho-MAPK durchgeführt (Abbildung 6a). Um zu untersuchen, ob es zu einer Aktivierung der unterschiedlichen Signalwege kommt, wurde nach Normalisierung auf die Ladekontrolle Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase der Quotient aus unphosphorylierter und phosphorylierter Form gebildet. Hier zeigte sich eine statistisch signifikante Aktivierung der p42MAPK als Ausdruck einer Aktivierung des MAPK/ERK-Signalwegs (Abbildung 6c). Es zeigte sich ebenfalls eine Aktivierung der p44MAPK-Isoform, aufgrund einer höheren Standardabweichung war der Unterschied jedoch statistisch nicht signifikant. Der Anteil des phospho-AKT war nach Lithiumbehandlung ebenfalls statistisch signifikant erhöht ( $p = 0,01$ ), normalisiert auf das Gesamt-AKT zeigte sich jedoch nach Lithiumbehandlung kein statistisch signifikanter Unterschied (Abbildung 6b).



**Abbildung 6: Proteinanalyse aus Ischiasnerven von adulten Wildtyp-Ratten nach Lithiumbehandlung.**

a) Repräsentative Western Blots mit Proteinlysaten aus Ischiasnerven adulter Wildtyp-Ratten mit Lithiumbehandlung (p30 – p117, 0,12 %  $\text{Li}_2\text{CO}_3$ ) und Kontrollgruppe ohne Lithiumbehandlung (p30 – p117). Alle Blots wurden auf GAPDH als Ladekontrolle normalisiert. Nach Lithiumbehandlung zeigte sich eine statistisch signifikante Aktivierung der p42-Isoform der MAPK sowie eine tendenzielle Aktivierung der p44-Isoform.  $n = 7$  je Gruppe, Mann-Whitney-U-Test (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ ).

## 3.2 Einfluss von Lithium auf die Schwannzell-Differenzierung und Myelinisierung in vitro

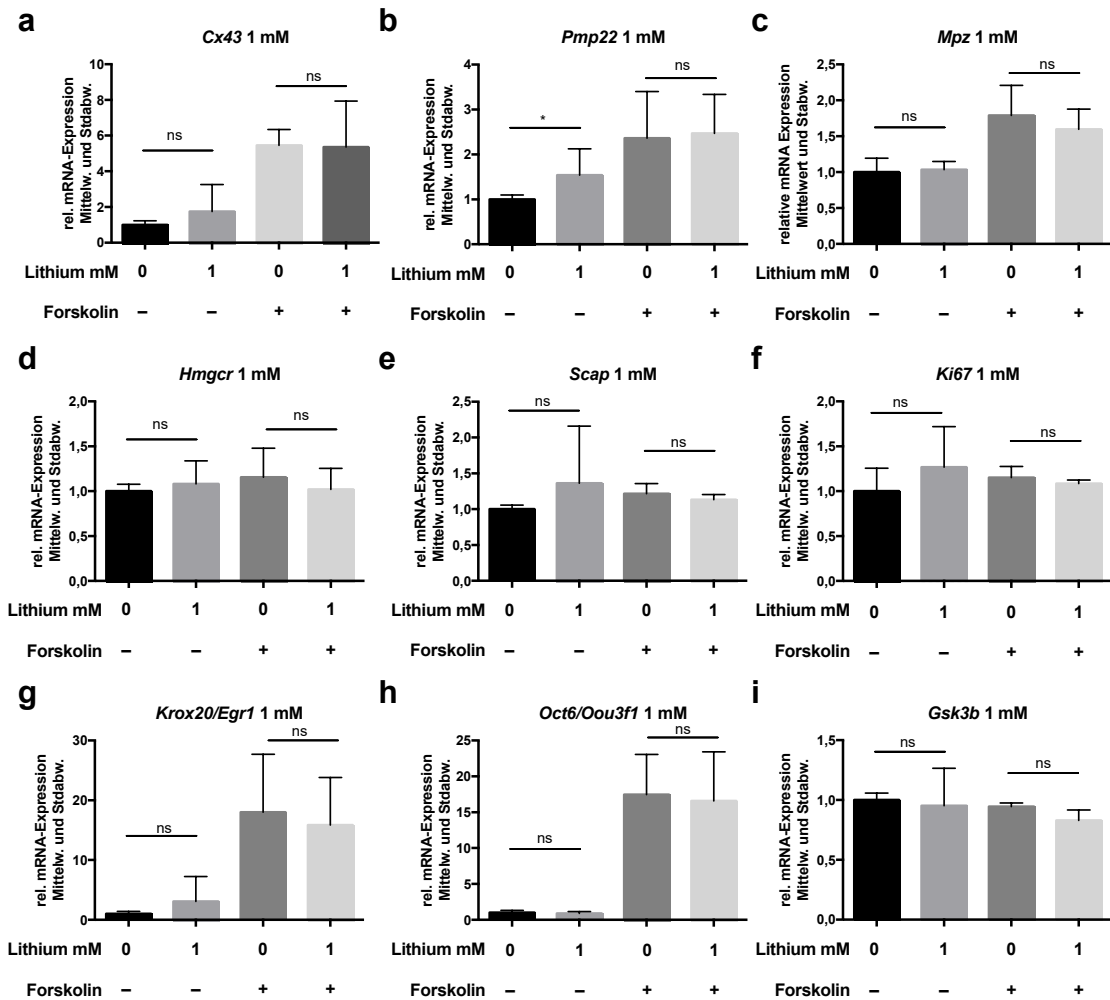
### 3.2.1 Genexpressionsanalysen aus primären Schwannzell-Kulturen

Primäre Schwannzell-Kulturen wurden aus Ischiasnerven zwei Tage alter Ratten präpariert. Nach Behandlung mit Cytarabin zur Elimination von Fibroblasten wurden die Zellen auf Zellkulturschalen ausplattiert und zur Vermehrung maximal dreimal passagiert. Forskolin ist ein Aktivator der Adenylatcyclasen und führt zu einer Erhöhung des intrazellulären cyclischen Adenosinmonophosphats (cAMP). Ein erhöhter intrazellulärer cAMP-Spiegel führt in Schwannzellen zu Proliferation (Sobue et al. 1986), Differenzierung (Morgan et al. 1991) sowie zur Expression von Myelinenen (LeBlanc et al. 1992). Um die Wirkung von Lithium auf Schwannzellen in vitro zu untersuchen, wurde in konfluenten Kulturen dem Medium für 72 Stunden entweder keine Zusätze, 1 mM  $\text{Li}_2\text{CO}_3$ , 1 mM  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  und 4  $\mu\text{M}$  Forskolin oder nur 4  $\mu\text{M}$  Forskolin zugegeben. Nach 72 Stunden Behandlung der Zellen wurde gemäß Herstellerprotokoll RNA isoliert, cDNA synthetisiert und Genexpressionsanalysen mittel qRT-PCRs durchgeführt.

Das Gap-Junction-Protein Connexin 43 (Cx43) ist ein bekanntes Target des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs (Van der Heyden et al. 1998) und ist selbst für die Aufrechterhaltung einer normalen Myelinscheide im peripheren Nervensystem notwendig (Anzini et al. 1997). Lithium wiederum ist in der Lage über die Inhibition der Glykogensynthasekinase 3 beta (GSK3b) den Wnt-Signalweg zu aktivieren (Hedgepeth et al. 1997). Eine Behandlung mit Lithium 1 mM/l für 72 h führte nicht zu einer erhöhten Expression von *Cx43*. Durch die Erhöhung des intrazellulären cAMP kam es zu einer etwa 5-fach erhöhten Expression von *Cx43*. Eine Kombination von Forskolin und Lithium führte zu keiner weiteren Erhöhung der *Cx43*-Expression (Abbildung 7a). Die Expression von *Gsk3b* wurde weder durch die Gabe von Lithium noch durch Forskolin verändert (Abbildung 7i).

Untersuchungen haben wiederholt gezeigt, dass die Gabe von Lithium in der Lage ist die Expression von Myelinenen zu induzieren (Makoukji et al., 2012; Fang et al., 2016). Nach Behandlung der Schwannzellen mit 1 mM  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  zeigte sich eine signifikant erhöhte Expression von *Pmp22* ( $p = 0,0317$ , Abbildung 7b). Die Expression des Myelinproteins 0 (*Mpz*) wurde durch die Zugabe von 1 mM  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  nicht beeinflusst (Abbildung 7c). Erwartungsgemäß kam es durch die Erhöhung des intrazellulären cAMPs durch Forskolin zu einer erhöhten Expression beider Myelinproteine. Die Zugabe von 1 mM Lithium und Forskolin zusammen führte nicht zu einer erhöhten Expression der Myelinproteine *Mpz* und *Pmp22* gegenüber der alleinigen Gabe von Forskolin (Abbildung 7b,c). Die mRNA-Level der HMG-CoA Reduktase (*Hmgcr*) sowie von *Sterol regulatory element-binding protein cleavage activating protein* (*Scap*), einem Schlüsseltranskriptionsfaktor der Cholesterinbiosynthese, sowie des Proliferationsmarkers *Ki67*, wurden weder durch die Gabe von 1mM Lithium noch durch Forskolin beeinflusst (Abbildung 7d,e,f).

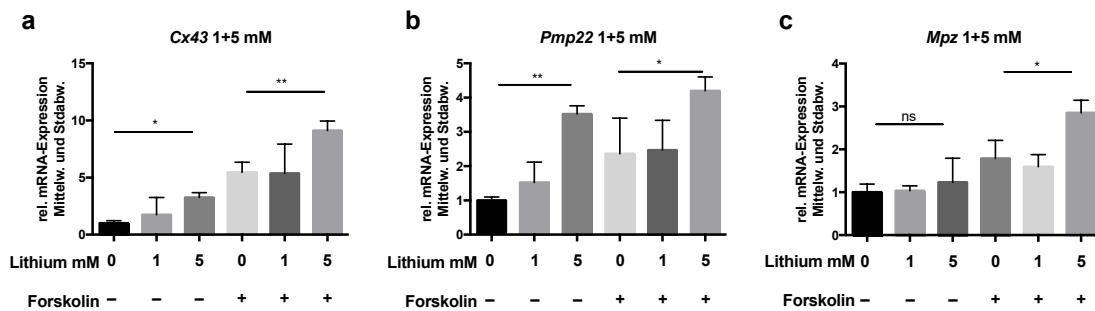
Die Expression der Schwanzzell-Differenzierungsmarker *Krox20/Egr1* und *Oct6/Pou3f1* wurde durch die Gabe von Forskolin stimuliert. Die Gabe von 1 mM Lithium führte weder in der Anwesenheit noch in der Abwesenheit von Forskolin zu einer Veränderung der Expression (Abbildung 7g,h).



**Abbildung 7: Genexpressionsanalysen aus primären Schwanzzell-Kulturen unter dem Einfluss von 1 mM Lithiumcarbonat und Forskolin.** Relative mRNA-Expression normalisiert auf die Kontrollgruppe (Lithium 0/Forskolin -). Für 72 Stunden wurden dem Nährmedium entweder keine Zusätze (Lithium 0/Forskolin -), nur 1 mM  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  (Lithium 1/Forskolin -), 1 mM  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  und 4  $\mu\text{M}$  Forskolin (Lithium 1/ Forskolin +) oder nur 4  $\mu\text{M}$  Forskolin (Lithium 0/Forskolin +) zugegeben. Die Erhöhung des intrazellulären cAMPs mit Forskolin führte zu einer Induktion von *Pmp22* (b), *Mpz* (c) sowie der Transkriptionsfaktoren *Oct6/POU3F1* (g) und *Krox20/Egr2* (h). Signifikante Induktion der Expression von *Pmp22* nach Behandlung mit 1 mM  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  ohne Forskolin (b). Eine statistisch signifikante Änderung der Expression durch Gabe von  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  zeigte sich in keinem anderen der untersuchten Gene.  $n = 6$  je Gruppe, One-way-ANOVA mit Tukey post-hoc-Test (\* $p < 0,05$ ).

Um zu überprüfen, inwieweit die Beeinflussung der Genexpression durch Lithium dosisabhängig war, wurden zusätzlich Schwanzzell-Kulturen für 72 Stunden mit 5 mM  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  ( $\pm$  Forskolin) behandelt. Hier zeigte sich gegenüber der Behandlung mit 1 mM eine statistisch signifikant erhöhte Expression von *Cx43* sowohl in Abwesenheit als auch Anwesenheit

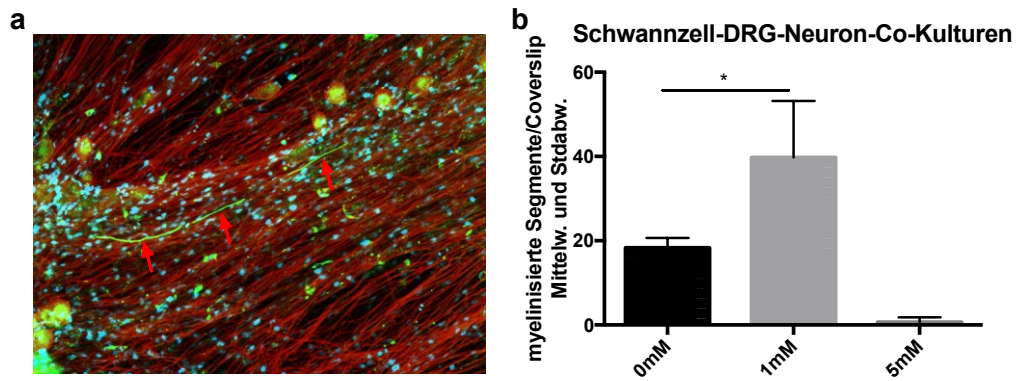
von Forskolin ( $p = 0,0238$  – Forskolin bzw.  $p = 0,0067$  + Forskolin, Abbildung 8a). Die Expression von *Pmp22* stieg nach Behandlung mit 5 mM Lithium gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe um etwa den Faktor 4,5 bzw. 5 nach zusätzlicher Stimulation mit Forskolin. Der Unterschied war statistisch signifikant ( $p = 0,049$  – Forskolin bzw.  $p = 0,0357$  + Forskolin, Abbildung 8b). Die Expression von *Mpz* war nach Behandlung der Schwanzzell-Kulturen mit 5 mM  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  ohne zusätzliche Stimulation mit Forskolin nicht statistisch signifikant verändert. Nach Behandlung der Zellen mit 5 mM  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  und Forskolin zeigte sich eine statistisch signifikante Induktion der *Mpz*-Expression um den Faktor 3 ( $p = 0,0238$ , Abbildung 8c).



**Abbildung 8: Genexpressionsanalysen aus primären Schwanzzell-Kulturen unter dem Einfluss von 1 mM und 5 mM Lithiumcarbonat und Forskolin.** Für 72 Stunden wurden dem Nährmedium zusätzlich zur vorhergehenden Untersuchung der Genexpression in Schwanzzellkulturen (vgl. Abbildung 7) zwei Dosierungsstufen hinzugefügt: nur 5mM  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  (Lithium 5/Forskolin –) und 5 mM  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  und 4  $\mu\text{M}$  Forskolin (Lithium 5/Forskolin +). Es zeigte sich nach Gabe von 5 mM  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  eine dosisabhängige Lithium-bedingte Induktion von *Cx43* (a), *Pmp22* (b) und *Mpz* (c). Alle Werte normalisiert auf die Kontrollgruppe (Lithium 0/Forskolin –),  $n = 3$  je Gruppe, One-way-ANOVA mit Tukey post-hoc-Test (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ ).

### 3.2.2 Myelinisierung in Schwanzzell-DRG-Neuron-Co-Kulturen

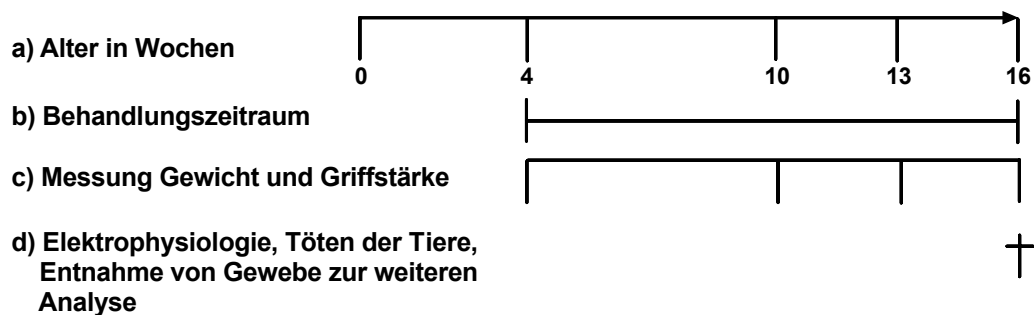
Co-Kulturen aus Neuronen der dorsalen Hinterwurzelganglien (DRG-Neurone) und Schwanzzellen sind in vitro in der Lage Myelin zu bilden. Diese myelinisierenden Co-Kulturen bieten die Möglichkeit den Einfluss von Substanzen auf die Myelinisierung in vitro zu untersuchen. Es wurden Kulturen nach einer modifizierten Methode nach Kleitman et al. (1998) präpariert. Mit Initialisierung der Myelinisierung mittels Ascorbinsäure (Eldridge et al. 1987) an Tag 7 wurden dem Medium 0 mM, 1 mM oder 5 mM  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  zugegeben. Nach 16 Tagen wurden die Kulturen fixiert und das *neuron-specific class III  $\beta$ -tubulin* (Tuj1) zur Darstellung der Axone sowie Mbp zur Darstellung des Myelins gefärbt. Das Experiment wurde an jeweils drei unabhängigen Kulturen durchgeführt. Auf jeweils drei Coverslips pro Gruppe wurde die Anzahl myelinisierter Segmente gezählt. Hier zeigte sich eine statistisch signifikante Zunahme der myelinisierten Segmente nach Behandlung mit 1 mM  $\text{Li}_2\text{CO}_3$ . Die Gruppe mit 5 mM  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  zeigte nahezu keine Myelinisierung sowie einen Untergang der DRG-Neurone (nicht quantifiziert) (Abbildung 9).



**Abbildung 9: Histologische Analyse der Myelinisierung von Schwanzzell-DRG-Neuron-Co-Kulturen nach Lithiumbehandlung.** a) Immunfluoreszenz-dreifachfärbung, rot: TuJ1 (Axone), grün: Mbp (Myelin), blau: DAPI-Kernfärbung. 1000x Vergrößerung. Repräsentativer Ausschnitt einer Schwanzzell-DRG-Neuron-Co-Kultur, rote Pfeile markieren myelinisierte Segmente. b) Quantifizierung der myelinisierten Segmente von Schwanzzell-DRG-Neuron-Co-Kulturen pro Coverslip. Zugabe von 0mM, 1mM oder 5mM Li<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> mit Initiierung der Myelinisierung. Statistisch signifikante Zunahme der Anzahl myelinisierter Segmente nach Zugabe von 1 mM Li<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ab Tag 7. n = 3 je Gruppe, One-way-ANOVA mit Tukey post-hoc-Test (\* p < 0,05).

### 3.3 Therapieversuch mit Lithium im transgenen Rattenmodell der CMT1A

In Nouri et al. (2009) und Makoukji et al. (2012) wurde der positive Einfluss von Lithium auf die Regeneration bzw. Remyelinisierung nach Nervenverletzungen im Rattenmodell dargestellt. Pourmohammadi et al. (2012) konnten eine Abmilderung einer Paclitaxel-induzierten Neuropathie durch eine Behandlung mit Lithium zeigen. Aufgrund der in der Literatur beschriebenen Einflüsse von Lithium auf Neuropathien und Nerventraumata sowie der vielversprechenden Ergebnisse aus der Voruntersuchung in Wildtyp-Tieren, entschlossen wir uns zu einem Therapieversuch im Rattenmodell der CMT1A (*Pmp22*-transgene Ratten; Sereda et al. 1996). Da sich in den Vorexperimenten bei Wildtyp-Ratten, während des Prozesses der Myelinisierung (p0 – p6 und p0 – p21), keine Unterschiede zeigten, entschlossen wir uns im Alter von 30 Tagen mit der Behandlung zu beginnen (vgl. Abbildung 3). Es wurde ein Behandlungszeitraum von insgesamt zwölf Wochen bis zum Alter von 16 Wochen gewählt, da sich zu dem späteren Zeitpunkt ein stärker ausgeprägter Phänotyp der transgenen Ratten zeigt (Sereda et al. 1996; Fledrich et al. 2012a) (Abbildung 10). Hierzu wurden 30 *Pmp22*-transgene Ratten und 24 Wildtyp-Kontrolltiere im Alter von 28 Tagen gewogen und die Griffstärke der Vorder- und Hinterbeine gemessen. Danach wurden die transgenen Ratten und die Wildtyp-Tiere in jeweils zwei durchschnittlich gleich starke und schwere Gruppen eingeteilt. Ab dem Alter von 30 Tagen bekamen jeweils eine Gruppe transgene Ratten (n = 15) und Wildtyp-Ratten (n = 12) für insgesamt zwölf Wochen Futter mit 0,12 %  $\text{Li}_2\text{CO}_3$ . Als Placebo-Kontrollen erhielten je eine Gruppe transgene Tiere (n = 15) und Wildtyp-Ratten (n = 12) Standardfutter. Im Alter von 10, 13 und 16 Wochen wurde die Griffstärke an Vorder- und Hinterläufen getestet. Im Alter von 16 Wochen wurde zusätzlich eine elektrophysiologische Untersuchung der peripheren Nerven am Schwanz der Tiere durchgeführt. Im Anschluss wurden die Tiere durch Einleitung von  $\text{CO}_2$  Gas getötet und Gewebe zur histologischen und molekularbiologischen Untersuchung entnommen.



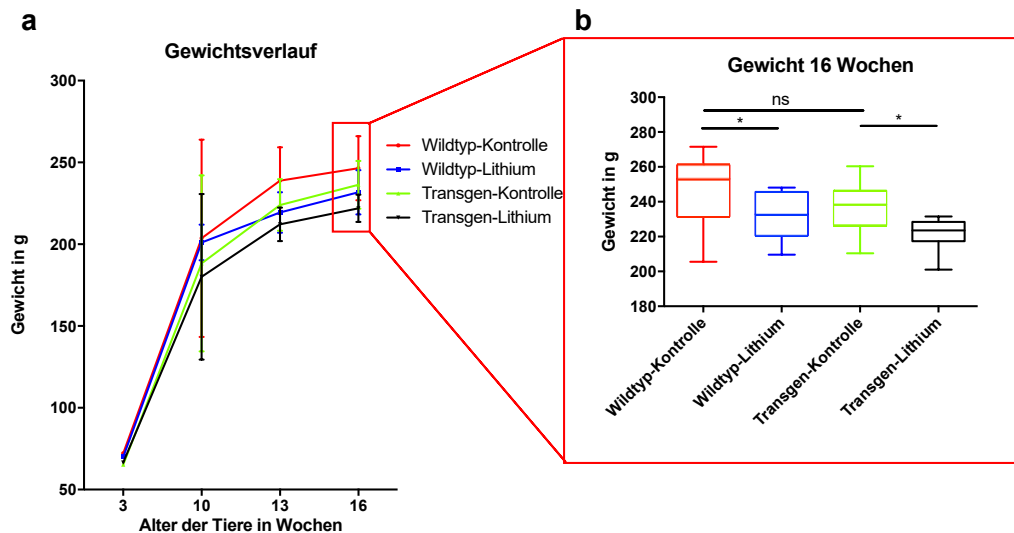
**Abbildung 10: Schematische Darstellung der Lithiumbehandlung von *Pmp22*-transgenen Ratten.**

a) Einteilung im Alter von vier Wochen nach Gewicht und Griffstärke in jeweils zwei gleichwertige transgene (n = 15) bzw. Wildtyp-Gruppen (n = 12). b) Ab dem 30. Tag Behandlung der Tiere mit  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  bzw. Standardfutter. c) Messung von Griffstärke und Gewicht im Alter von 10 und 13 Wochen. d) Im Alter von 16 Wochen Messung von Griffstärke und NLG. Im Anschluss Tötung der Tiere und Entnahme von Gewebe zur weiteren Analyse.



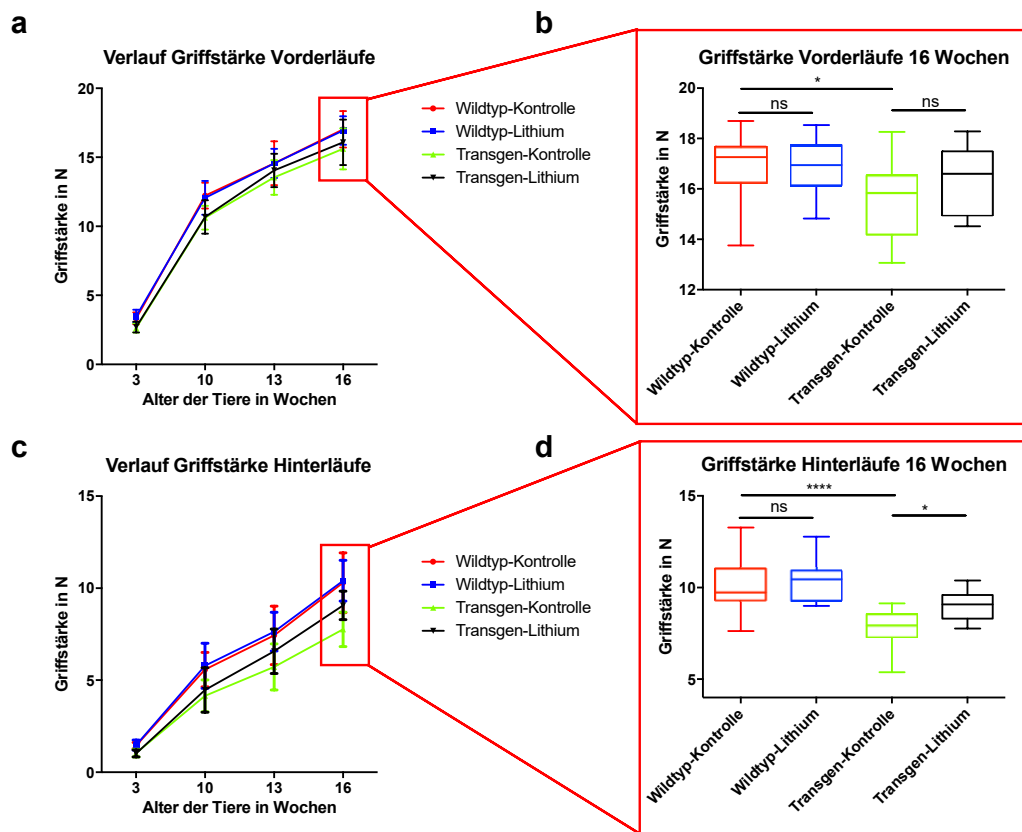
### 3.3.1 Phänotypische Untersuchung *Pmp22*-transgener Ratten

Wie auch bei Lithium-behandelten Wildtyp-Tieren (Abbildung 2) kam es bei den transgenen Tieren im Verlauf der Behandlung mittels Lithiumcarbonat zu einem Gewichtsverlust. Dieser war sowohl in der Gruppe der transgenen Ratten als auch bei den Wildtyp-Tieren zum Abschluss der Studie signifikant (transgene Ratten  $p = 0,0237$ , Wildtyp  $p = 0,0437$ , Abbildung 11).



**Abbildung 11: Gewichtsverlauf bei *Pmp22*-transgenen Ratten nach Lithiumbehandlung.** a) Im Alter von drei Wochen erfolgte die Einteilung der Gruppen nach Griffstärke und Gewicht, sodass die einzelnen Gruppen hier keinen Unterschied zeigten. Im Verlauf zeigte sich ein zunehmender Gewichtsverlust bei den Lithium-behandelten Ratten im Vergleich zu den Kontrollgruppen. b) Zum Abschluss der Studie (Alter von 16 Wochen) statistisch signifikanter Gewichtsverlust der Lithium-behandelten Ratten im Vergleich zu den Kontrollgruppen. Mittelwerte: Wildtyp-Kontrolle 246,5 g, Wildtyp-Lithium 231,7 g, Transgen-Kontrolle 236,4 g, Transgen-Lithium 221,9 g, Wildtyp-Kontrolle und Wildtyp-Lithium je  $n = 12$ , Transgen-Kontrolle und Transgen-Lithium je  $n = 15$ . Boxplot mit Median, Quartil, Min./Max.. One-way-ANOVA mit Tukey post-hoc-Test (\*  $p < 0,05$ ).

Im Alter von drei Wochen zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied in der Griffstärke der Vorder- und Hinterläufe zwischen *Pmp22*-transgenen und Wildtyp-Ratten, der im weiteren Verlauf konstant war (Abbildung 12). Während die Messung der Vorderläufe allenfalls eine geringe Verbesserung der Griffstärke der Lithium-behandelten transgenen Tiere ergab, zeigte sich an den Hinterläufen ab der 13. Woche eine signifikante Zunahme der Griffstärke bei den Lithium-behandelten transgenen Ratten im Vergleich zu den unbehandelten transgenen Tieren. Zum Abschluss der Therapie im Alter von 16 Wochen war dieser Unterschied signifikant ( $p = 0,0128$ ). Die Griffstärke der Wildtyp-Ratten mit Standardfutter und mit Lithium-Futter unterschied sich während des gesamten Verlaufs nicht, trotz eines zum Abschluss der Untersuchung statistisch signifikanten Gewichtsverlustes der Lithium-behandelten Tiere (Abbildung 11).

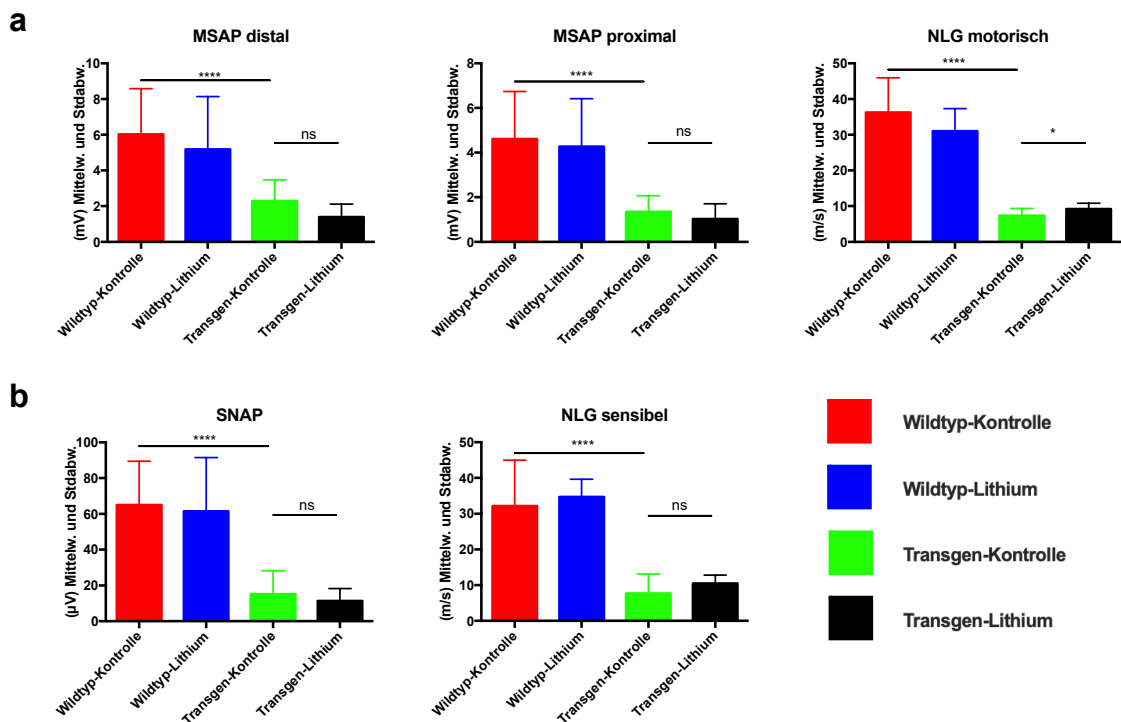


**Abbildung 12: Verlauf der Griffstärke von Vorder- und Hinterläufen bei *Pmp22*-transgenen Ratten nach Lithiumbehandlung.** a+c) Im Alter von drei Wochen zeigte sich bereits ein Unterschied in der Griffstärke von Vorder- und Hinterläufen zwischen *Pmp22*-transgenen- und Wildtyp-Ratten. Im Verlauf zunehmender Kraftverlust an Vorder- und Hinterläufen. b + d) Zum Abschluss der Studie (Alter von 16 Wochen) zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp- und *Pmp22*-transgenen Ratten. Nach Therapie mit  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  der *Pmp22*-transgenen Tiere statistisch signifikanter Unterschied der Kraft an den Hinterläufen (d) sowie statistisch nicht signifikanter Unterschied an den Vorderläufen im Vergleich zur transgenen Kontrollgruppe (b). Wildtyp-Kontrolle und Wildtyp-Lithium je  $n = 12$ , Transgen-Kontrolle und Transgen-Lithium je  $n = 15$ . Boxplot mit Median, Quartil, Min./Max.. One-way-ANOVA mit Tukey post-hoc-Test (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*\*  $p < 0,001$ ).

### 3.3.2 Elektrophysiologische Untersuchung an Schwanznerven *Pmp22*-transgener Ratten

Aus Untersuchungen an CMT1A-Patienten (Pareyson et al. 2006) sowie aus Experimenten am transgenen Rattenmodell der CMT1A (Sereda et al. 1996) ist eine Verringerung der Nervenleitgeschwindigkeit (NLG) sowie der Amplituden der Muskelsummenaktionspotentiale (MSAP) bei elektrophysiologischen Untersuchungen bekannt. Vor Abschluss der Therapie wurden die Tiere analgosediert, zur Erhaltung der Körpertemperatur auf einer Wärmematte gelagert und eine Messung der motorischen und sensiblen NLG an den Schwanznerven der Ratten durchgeführt. Erwartungsgemäß zeigte sich ein deutlicher Unterschied der NLG und der MSAP zwischen transgenen und Wildtyp-Ratten. Eine Verbesserung der MSAP zeigte sich zum Abschluss der Studie im Alter von 16 Wochen in den Lithium-behandelten Tieren

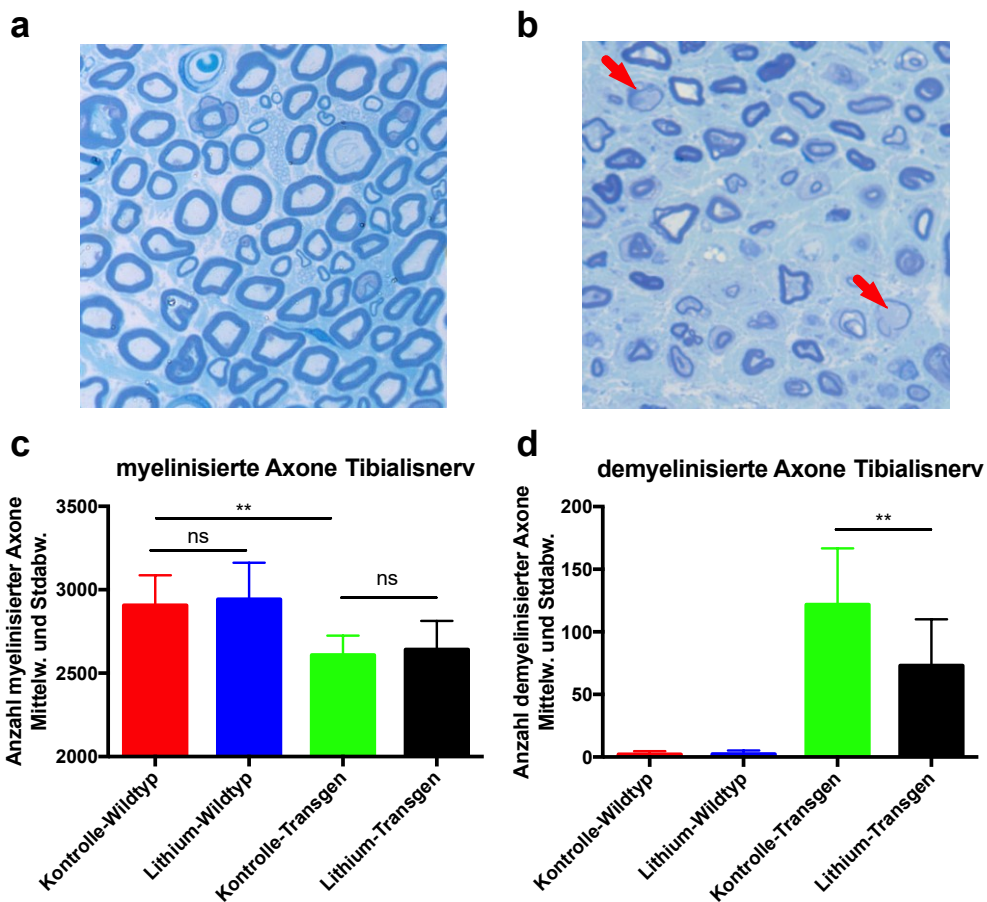
im Vergleich zu der Kontrollgruppe nicht. Durch die Behandlung mit Lithium ließ sich jedoch im Alter von 16 Wochen eine statistisch signifikante Verbesserung der NLG bei den transgenen Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe erzielen (Abbildung 13a). In der Messung der sensiblen Neurographie in orthodromer Richtung zeigte sich ebenfalls ein hoch signifikanter Unterschied der NLG sowie der sensiblen Nervenaktionspotentiale (SNAP) zwischen Wildtyp-Kontrollen und *Pmp22*-transgenen Tieren. In der Gruppe der Wildtyp-Kontrollen zeigte sich kein Unterschied zwischen Lithium-behandelten Tieren und Tieren mit Standardfutter. In der Gruppe der transgenen Tiere ließ sich durch die Lithiumbehandlung eine leichte, statistisch nicht signifikante Verbesserung der sensiblen NLG erzielen. Ein Unterschied in der Amplitude des SNAP zeigte sich nicht (Abbildung 13b).



**Abbildung 13: Messung der motorischen und sensiblen NLG bei *Pmp22*-transgenen Ratten nach Lithiumbehandlung.** Zum Abschluss der Studie (Alter von 16 Wochen) erfolgte die Messungen der Muskelsummenaktionspotentiale (MSAP) und Nervenleitgeschwindigkeit (NLG) am Schwanz der transgenen und Wildtyp-Ratten mit und ohne Lithiumbehandlung (0,12 %  $\text{Li}_2\text{CO}_3$ ). a) Statistisch signifikanter Unterschied der MSAP und NLG zwischen transgenen und Wildtyp-Ratten. Nach Behandlung mit 0,12 %  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  ließ sich eine Verbesserung der NLG im Vergleich zu unbehandelten transgenen Ratten erzielen. In Wildtyp-Ratten veränderte die Lithiumbehandlung weder MSAP noch NLG. b) statistisch signifikanter Unterschied der sensiblen NLG und Summennervenaktionspotentiale (SNAP) zwischen unbehandelten transgenen und Wildtyp-Ratten. Kein signifikanter Unterschied durch Lithiumbehandlung sowohl in transgenen als auch in Wildtyp-Ratten. Wildtyp-Kontrolle und Wildtyp-Lithium je  $n = 12$ , Transgen-Kontrolle und Transgen-Lithium je  $n = 15$ . One-way-ANOVA mit Tukey post-hoc-Test (\*  $p < 0,05$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ).

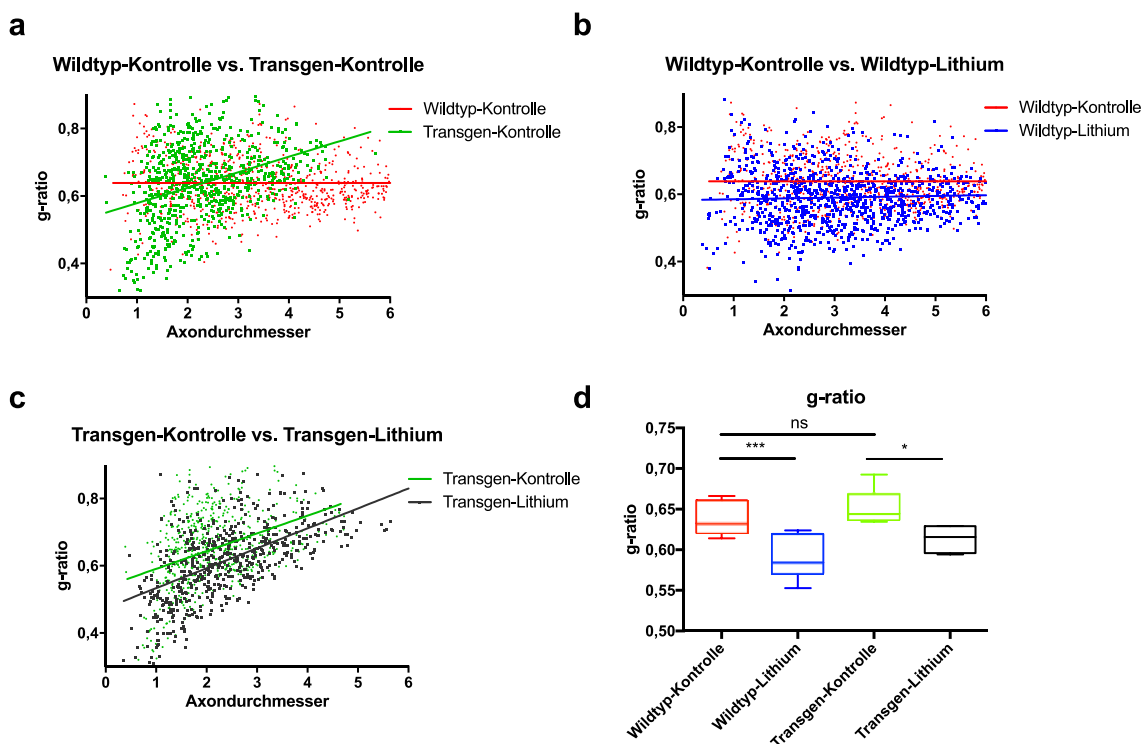
### 3.3.3 Histologische Untersuchung von Tibialisnerven *Pmp22*-transgener Ratten

Bei der CMT1 kommt es im Verlauf der Erkrankung zu einer Demyelinisierung und zu einem axonalen Verlust (Sereda et al. 1996; Meyer zu Horste et al. 2007). Daher wurden die nach Studienende entnommenen Tibialisnerven histologisch analysiert. Dazu wurden Tibialisnerven unter 100x Vergrößerung lichtmikroskopisch vollständig abfotografiert, mittels der Zeiss Mikroskopiesoftware zu einem vollständigen Bild des Nerven zusammengesetzt und die Gesamtanzahl myelinisierter Axone quantifiziert. Hier zeigte sich nach Abschluss der Behandlung ein statistisch signifikanter Verlust myelinisierter Axone der transgenen Tiere im Vergleich mit Wildtyp-Tieren.



**Abbildung 14: Histologische Analyse der Anzahl myelinisierter und demyelinisierter Axone in Tibialisnerven von *Pmp22*-transgenen Ratten nach Lithiumbehandlung.** Repräsentative, lichtmikroskopische Aufnahmen von Tibialisnerven der Wildtyp-Ratte (a) und *Pmp22*-transgenen Ratte (b) 100x Vergrößerung. Hypomyelinisierung und axonaler Verlust als Zeichen der Neuropathie. Rote Pfeile zeigen Beispiele demyelinisierter Axone c) transgene Ratten zeigten einen statistisch signifikanten Verlust myelinisierter Axone im Vergleich zu Wildtyp-Ratten. Ein statistisch signifikanter Unterschied der Anzahl myelinisierter Axone zwischen den Gruppen mit Lithiumbehandlung und den Kontrollgruppen zeigte sich nicht. d) Nach Lithiumbehandlung zeigte sich eine verminderte Anzahl demyelinisierter Axone in Tibialisnerven von transgenen Ratten. Wildtyp-Ratten n = 12 je Gruppe, transgene Ratten n = 10 je Gruppe. One-way-ANOVA mit Tukey post-hoc-Test (\*\* p < 0,01).

In beiden Gruppen zeigte sich jedoch tendenziell eine erhöhte Anzahl myelinisierter Axone (Abbildung 14). In der gleichen Untersuchung wurden ebenfalls demyelinisierte Axone gezählt. Während sich in den Wildtyp-Gruppen erwartungsgemäß nahezu keine demyelinisierten Axone nachweisen ließen, zeigten Lithium-behandelte transgene Tiere jedoch eine verminderte Anzahl demyelinisierter Axone im Vergleich zu den unbehandelten transgenen Ratten ( $p = 0,0026$ , Abbildung 14d). Neben der Quantifizierung myelinisierter Axone in lichtmikroskopischen Aufnahmen erfolgten außerdem Messungen der relativen Myelindicke auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Tibialisnerven mit einer Vergrößerung von 3000x. Hierzu wurden bei jeweils 100 – 200 Nervenfasern pro Tier der Quotient aus dem Umfang von Axon und Myelin bestimmt (g-ratio).



**Abbildung 15: Histologische Analyse der relativen Myelindicke (g-ratio) in Tibialisnerven von *Pmp22*-transgenen Ratten nach Lithiumbehandlung.** Die Auswertung erfolgte an elektronenmikroskopischen Bildern in 3000x Vergrößerung. a-c) Auftragung der Myelindicke (g-ratio) auf den Axondurchmesser. a) Die Wildtyp-Kontrollgruppe (rot) zeigte eine physiologische Verteilung der Myelinschichtdicke. In der Gruppe der transgenen Kontrollen (grün) zeigte sich eine Hypomyelinisierung von großen und eine Hypermyelinisierung kleiner Axone. b) Lithium-behandelte Wildtyp-Ratten (blau) zeigten im Vergleich zur Kontrollgruppe (rot) eine Zunahme der Myelinschichtdicke. Zu einer Veränderung der Verteilung der Myelinschichtdicke kam es nicht. c) Lithium-behandelte transgene Ratten (schwarz) zeigten eine Zunahme der Myelinschichtdicke bei weiterhin unphysiologischer Hypomyelinisierung von großen und Hypermyelinisierung von kleinen Axonen. d) Mittelwerte der g-ratios aus a-c. Statistisch, signifikanter Unterschied des mittleren g-ratios nach Lithiumbehandlung sowohl in der Wildtyp- wie auch in der transgenen Gruppe. Kein Unterschied des mittleren g-ratios zwischen Wildtyp- und transgenen Kontrollratten.  $n = 5 - 9$  je Gruppe, mind. 100 Axone pro Tier. Boxplot mit Median, Quartil, Min./Max.. One-way-ANOVA mit Tukey post-hoc-Test (\*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ).

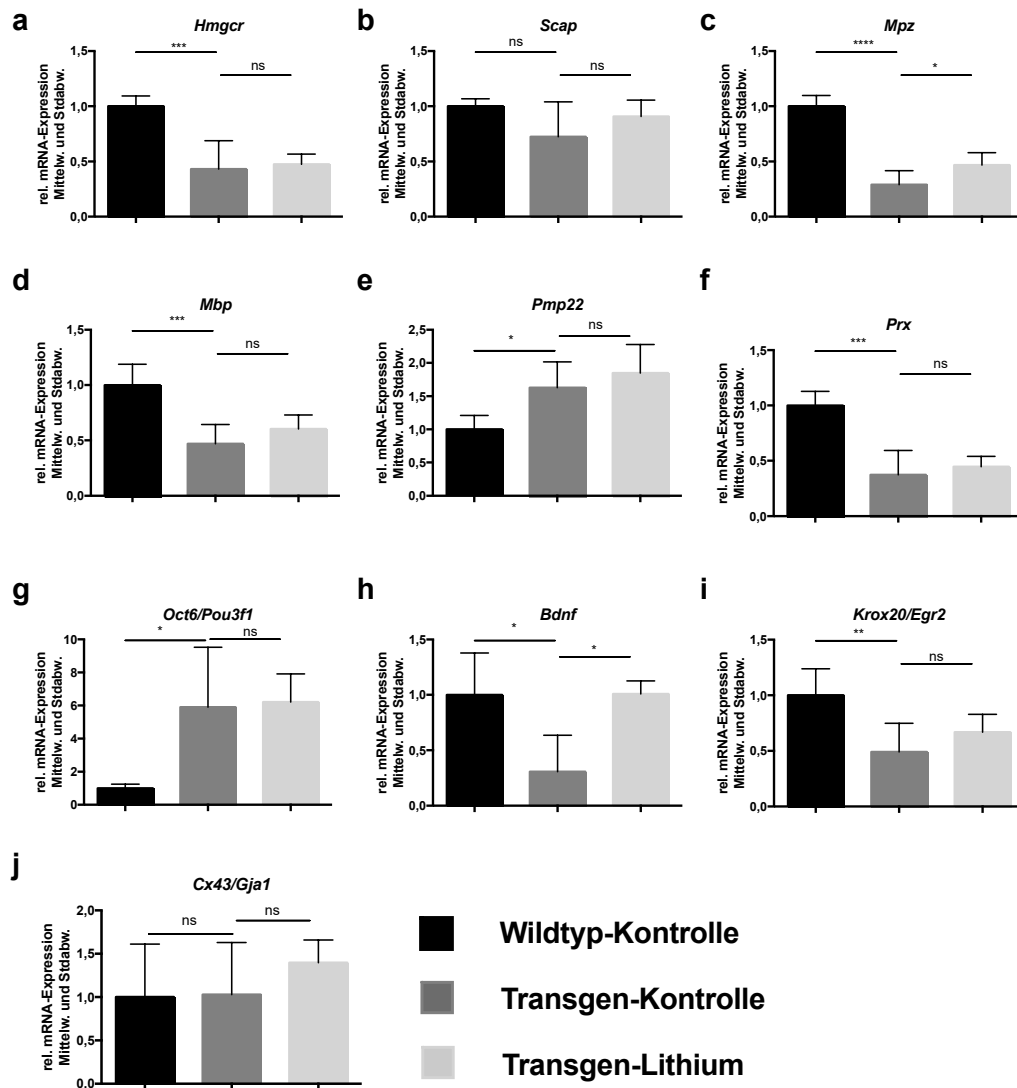
Hier zeigte sich in den *Pmp22*-transgenen Ratten insbesondere die von Meyer zu Horste et al. (2007) bekannte unphysiologische Hypermyelinisierung kleinerer Axone und Hypomyelinisierung größerer Axone im Vergleich zu Wildtyp-Kontrollen (Abbildung 15a). Ein statistisch signifikanter Unterschied in der gemittelten g-ratio zwischen transgenen- und Wildtyp-Kontrollen zeigte sich nicht (Abbildung 15d). Insgesamt zeigte jedoch die Gruppe der Lithium-behandelten Tiere, sowohl in dem Studienarm mit Wildtyp-Tieren als auch bei transgenen Tieren unabhängig von der Axongröße eine Zunahme der Myelindicke (Abbildung 15). Eine Änderung der unphysiologischen Verteilung der Myelindicke mit Hypermyelinisierung kleinerer Axone und Hypomyelinisierung größerer in *Pmp22*-transgenen Ratten ließ sich durch eine Behandlung mit Lithium nicht erzielen (Abbildung 15c).

### 3.3.4 Genexpressionsanalysen aus RNA-Isolaten von Ischiasnerven *Pmp22*-transgener Ratten

Aus entnommenen und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagerten Ischiasnerven wurde RNA isoliert. Nach reverser Transkription wurden durch qRT-PCR mittels SYBR®Green Genexpressionsanalysen durchgeführt. Bestimmt wurden die relativen Expressionen von Connexin 43 (*Cx43*), der Myelinproteine Peripheres Myelinprotein 22 (*Pmp22*), Myelinprotein 0 (*Mpz*), und Basisches Myelinprotein (*Mbp*). Außerdem wurden die relative Expression der Transkriptionsfaktoren *Oct6/Pou3f1* und *Krox20/Egr2*, des Regulatorproteins der Cholesterinbiosynthese *Scap*, der HMG-CoA-Reduktase (*Hmgcr*), des Neurotrophins *Bdnf* und des Myelin-Stabilisierungsproteins Periaxin (*Prx*) durchgeführt. Die Werte wurden jeweils auf die konstant exprimierten Gene *ornithine decarboxylase anti-zyme 1* (*Oaz1*), *60S acidic ribosomal protein P0* (*Rplp0*) und *Cyclophilin* standardisiert und auf die Wildtyp-Kontrollgruppe normalisiert. Sobue et al. (1998) haben gezeigt, dass *Bdnf* nach Nervenverletzungen und bei peripheren Neuropathien differentiell reguliert ist. In den transgenen Tieren zeigte sich eine statistisch signifikante Erniedrigung der *Bdnf*-mRNA-Level. Durch die Behandlung mit Lithium ließen sich die mRNA-Level in den transgenen Tieren auf Wildtyp-Level bringen (Abbildung 16h). *Krox20/Egr2* ist ein für die Myelinisierung essentieller Transkriptionsfaktor. Er ist zusammen mit anderen Transkriptionsfaktoren für den Übergang von der pro-myelinisierenden Schwannzelle zur myelinisierenden Schwannzelle zuständig. Mutationen im *Krox20/Egr2*-Gen führen aufgrund der Differenzierungsstörung der Schwannzellen zu hereditären Myelinopathien (CMT1D) (Topilko et al. 1994; Warner et al. 1998). In den *Pmp22*-transgenen Tieren zeigte sich *Krox20/Egr2* signifikant erniedrigt. Eine Behandlung mit Lithium führte zu einer Erhöhung der *Krox20/Egr2*-mRNA-Level in transgenen Tieren, welche jedoch statistisch nicht signifikant war (Abbildung 16i). Periaxin ist ein Myelinprotein und für die Aufrechterhaltung der Myelinscheide notwendig (Dytrych et al. 1998). Mutationen im *Prx*-Gen führen zu einer peripheren Neuropathie (Boerkoel et al. 2001). In den transgenen Ratten zeigte sich eine signifikante Verringerung der *Prx*-mRNA-Level. Die Behandlung mit Lithium hatte keinen Einfluss auf die *Prx*-Expression (Abbildung 16f). *Oct6/Pou3f1* ist ein Transkriptionsfaktor

der gemeinsam mit *Krox20/Egr2* für den Übergang von der nicht myelinisierenden Schwannzelle zur myelinisierenden Schwannzelle notwendig ist (Jaegle et al. 1996). Eine veränderte Expression von *Oct6/Pou3f1* ist damit Ausdruck einer Differenzierungsstörung der Schwannzellen. In den transgenen Ratten war die Expression von *Oct6/Pou3f1* deutlich erhöht. Ein Unterschied durch die Therapie mit Lithium ließ sich nicht erzielen (Abbildung 16g). Aus Sereda et al. (2003) ist eine etwa 1,6-fache *Pmp22*-Überexpression in heterozygoten *Pmp22*-transgenen Ratten bekannt. Dies ließ sich in unserem Tierkollektiv ebenso darstellen. Eine signifikante Änderung der *Pmp22*-Expression ließ sich durch die Behandlung mit Lithium jedoch nicht erreichen (Abbildung 16e). Cholesterin ist mit ca. 25 % das häufigste Lipid in der Myelinscheide. Die HMG-CoA-Reduktase ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt in der Cholesterinbiosynthese. In den transgenen Tieren war die mRNA-Expression der *Hmgcr* signifikant reduziert. Die Behandlung mit Lithium hat in dieser Gruppe keinen Einfluss auf die Expression der *Hmgcr* (Abbildung 16a). *Sterol regulatory element-binding protein cleavage-activating protein* (*Scap*) bindet an *sterol regulatory element binding*-Proteine (*Srebp*) und ermöglicht so die Translokation in den Golgi-Apparat. Dort wird der *Srebp*-Komplex durch proteolytische Kaskaden gespalten. Das N-terminale Fragment kann anschließend in den Kern gelangen und aktiviert dort Lipidsynthese und Cholesterinmetabolismus. Während der Myelinisierung ist die mRNA-Expression von *Scap* stark hochreguliert (Leblanc et al. 2005). Mäuse mit einem Schwannzell-spezifischen *Scap*-Knock-Out zeigen eine kongenitale Hypomyelinisierung (Verheijen et al. 2009). *Pmp22*-transgene Ratten zeigten im Vergleich zu Wildtyp-Tieren eine verminderte *Scap*-Expression als Ausdruck der Myelinisierungsstörung. Nach Lithiumtherapie zeigte sich ein Anstieg der *Scap*-Expression, der jedoch statistisch nicht signifikant war (Abbildung 16b). Während das Myelinprotein 0 (*Mpz*) im zentralen Nervensystem nicht exprimiert wird, bildet es im peripheren Nervensystem eines der wichtigsten Strukturproteine. Es ist ein Glykoprotein und wird durch das *Mpz*-Gen codiert (Lemke et al. 1988). *Mpz* und *Pmp22* interagieren miteinander und formen gemeinsam Komplexe in der Myelin-Membran (D'Urso et al. 1999; Sereda 1999). Sereda (1999) mutmaßte, dass es durch die *Pmp22*-Überexpression zu einem gestörten Verhältnis von *Pmp22* und *Mpz* kommt. In Proteinextrakten von *Pmp22*-transgenen Ratten sind im Alter von 30 Tagen und 2,5 Monaten die Proteinlevel von *Mpz* signifikant verringert (Sereda 1999). Außerdem zeigt sich eine Erniedrigung der *Mpz*-mRNA-Expression (Sociali et al. 2016). Normalisiert auf die Expression der Wildtyp-Ratten ohne Behandlung zeigten die transgenen Tiere eine statistisch signifikante Verringerung der *Mpz*-Expression von etwa 0,29. Die mit Lithium behandelten Tiere zeigten eine erhöhte Expression von 0,47. Der Unterschied war statistisch signifikant (Abbildung 16c). Basische Myelinproteine (*Mbp*) machen etwa 15 – 20 % der Proteine des peripheren Nervensystems aus. Sie sind eine Gruppe von Proteinen, die durch unterschiedliches Splicing und posttranslationale Modifikation aus demselben Transkript entstehen. *Mbp* interagieren im Myelin mit Lipiden und stabilisieren die Struktur des Myelins (Deber und Reynolds 1991). Die Expression von *Mbp* war als Ausdruck einer Myelinisierungsstörung in den beiden transgenen Tiergruppen ebenfalls deutlich erniedrigt. Eine Behandlung

mit Lithium konnte keinen statistisch signifikanten Unterschied verursachen. *Cx43* ist ein *target gene* des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs. Bei einer Lithium-bedingten Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs ist ein Anstieg der *Cx43*-Expression zu erwarten. Im vorliegenden Fall zeigte sich zwar ein leichter Anstieg um 39,5 %. Anders als in vitro (vgl. Abbildung 8a), war der Unterschied hier jedoch statistisch nicht signifikant (Abbildung 16j).



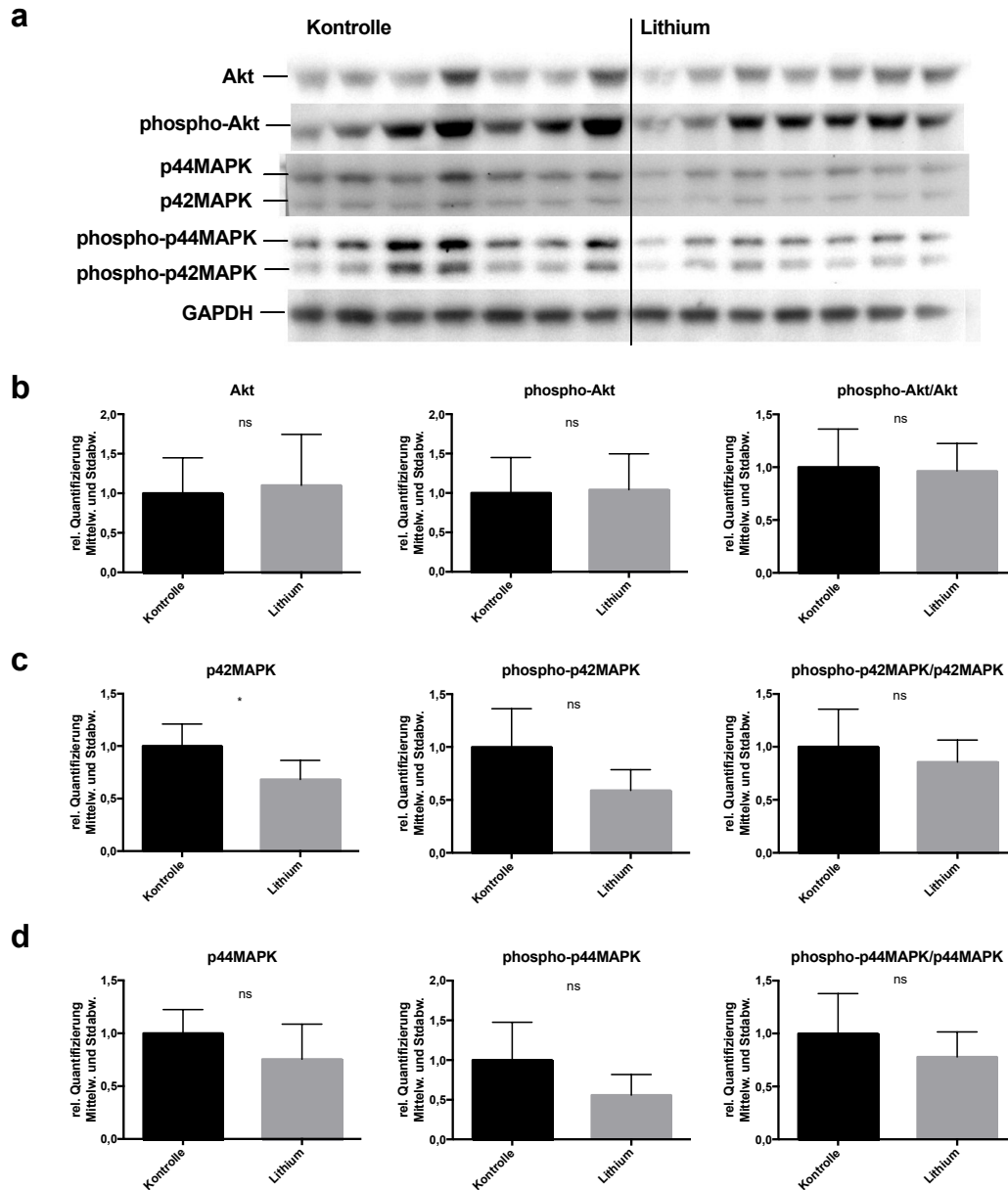
**Abbildung 16: Genexpressionsanalysen aus Ischiasnerven von *Pmp22*-transgenen Ratten nach Lithiumbehandlung.** Relative mRNA-Expression normalisiert auf unbehandelte Wildtyp-Ratten. Standardisiert auf die konstant exprimierten Gene *Rplp0*, *Oaz1* und *Cyclophillin*. Vergleich von unbehandelten Wildtyp-Kontrollen mit *Pmp22*-transgenen Ratten mit und ohne Lithiumbehandlung. n = 5 je Gruppe. One-way-ANOVA mit Tukey post-hoc-Test (\* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001, \*\*\*\* p < 0,0001).

### 3.3.5 Proteinanalyse aus Proteinlysaten von Ischiasnerven *Pmp22*-transgener Ratten

Wie in Abschnitt 3.1.3 beschrieben, sind die PI3K/AKT- und MAPK/ERK-Signalwege essentiell für die Myelinisierung und können durch Lithium beeinflusst werden. Analog zu Abschnitt 3.1.3 wurden nach Lithiumbehandlung von *Pmp22*-transgenen Ratten Western-Blot-Analysen auf AKT und phosphoryliertes AKT sowie die 42 kDa und 44 kDa Isoformen



ERK/phospho-ERK durchgeführt. Zu einer statistisch relevanten Aktivierung dieser Signalwege kam es in der Gruppe der *Pmp22*-transgenen Tiere nach Lithiumbehandlung nicht (Abbildung 17).



**Abbildung 17: Proteinanalyse aus Ischiasnerven von *Pmp22*-transgenen Ratten nach Lithiumbehandlung.** a) Repräsentative Western Blots mit Proteinlysaten aus Ischiasnerven *Pmp22*-transgener Ratten mit Lithiumbehandlung und ohne Lithiumbehandlung (Kontrolle). b-d) Semiquantitative Auswertung der Western Blots, standardisiert auf GAPDH als Ladekontrolle. In transgenen Ratten zeigte sich keine statistisch signifikante Aktivierung des PI3K- oder MAPK-Signalwegs. n = 7 je Gruppe. Mann-Whitney-U-Test (\* p < 0,05).

## 4 Diskussion

### 4.1 Einfluss von Lithium auf die Myelinisierung in Wildtyp-Ratten

In Ratten findet die Myelinisierung im peripheren Nervensystem früh postnatal statt und ist mit 21 Tagen weitgehend abgeschlossen (Garbay et al. 2000). Zur Untersuchung des Einflusses von Lithium auf die Myelinisierung von Wildtyp-Ratten wurden drei verschiedene Alterszeitpunkte analysiert. Dabei wurde mit p0 – p6 ein früher Zeitpunkt während der Myelinisierung sowie mit p0 – p21 ein Zeitraum gewählt, der die wesentliche Myelinisierung umspannt. Der Zeitraum p30 – p117 umfasst ein Alter mit abgeschlossener Myelinisierung. Aus praktischen Gründen wurde in dieser Gruppe die orale Applikation von Lithium gewählt. Wird für adulte Ratten eine tägliche Futtermenge von 100 bis 140 g/kg/KG angenommen (Kennedy und Mitra 1963; Laaksonen et al. 2013) entspricht dies bei 0,12 %  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  im Futter einer Lithiumaufnahme von ca. 120 bis 170 mg/kg/KG. Nach Abschluss der Studie wurde eine Serumkonzentration von 0,33 mmol/l in der Gruppe mit 0,12 %  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  im Futter erreicht, in der Gruppe mit 0,24 %  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  eine Serumkonzentration von 1,57 mmol/l (Tag 47). In der Literatur wird eine Plasma-Lithiumkonzentration von 0,2 bis 0,3 mmol/l als neuroprotektiv und neurotroph angenommen (Ledoux 2003). Die therapeutische Breite von Lithium ist sehr gering. In der Gruppe mit 0,24 %  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  ist von einer Akkumulation des Lithiums und einer chronischen Intoxikation als Ursache für den Gewichtsverlust und die Verschlechterung des Allgemeinzustandes auszugehen.

Oral verabreichtes Lithium wird in die Muttermilch sezerniert (Oruch et al. 2014). Eine Behandlung junger, noch gesäugter Ratten via Muttermilch nach oraler Lithiumapplikation an die säugenden Muttertiere ist so grundsätzlich möglich. Viguera et al. (2007) zeigten beim Menschen, dass in der Muttermilch stillender Mütter eine Lithiumkonzentration zwischen 16,7 und 73,3 % (Mittelwert 52,2 %) der Blut-Serumkonzentration erreicht wird. In den gestillten Kindern war eine Lithium-Serumkonzentration zwischen 4,9 und 56,1 % (Mittelwert 23,2 %) der mütterlichen Lithiumkonzentration nachweisbar. Um eine Lithium-Serumkonzentration von ca. 0,3 mmol/l zu erreichen, wäre daher ein Lithiumspiegel von etwa 1,5 mmol/l in den Muttertieren notwendig. Diese liegen in einem potentiell toxischen Bereich. Die in der Muttermilch sowie in gestillten Kindern nachgewiesenen Lithiumspiegel waren sehr variabel. Es ist anzunehmen, dass diese Ergebnisse aus dem Menschen auf Nager übertragbar sind. Die tatsächlich erreichbare Dosis in den Gruppen p0 – p6 und p0 – p21 wäre daher nach oraler Lithiumgabe sehr unsicher. Daher wurde sich in den Gruppen p0 – p6 und p0 – p21 zu einer intraperitonealen Gabe von Lithium entschieden. Makoukji et al. (2012) konnten nach intraperitonealer Gabe von Lithiumchlorid 50 mg/kg/KG (entsprechend 1,17 mmol/kg/KG) eine schnellere klinische und histologische Regeneration nach Verletzung des Facialnerven sowie eine Induktion der Expression von *Mp̄̄* und *Pmp22* zeigen. Daher wurde eine Dosis von 1 mmol/kg/KG/d i. p. gewählt. Leider war in

dieser Gruppe die Bestimmung der Lithium-Serumkonzentration aufgrund der geringen Blutmenge bei den erst 6 bzw. 21 Tage alten Tiere technisch nicht möglich.

Histologisch kam es nach einer Behandlung von adulten Wildtyp-Ratten zu einer statistisch signifikanten Zunahme der Myelinschichtdicke gegenüber unbehandelten Kontrolltieren. Eine Auflockerung des Myelins oder eine Verdickung der einzelnen Myelinschichten als Hinweis auf eine Veränderung der Myelinkompaktierung konnte durch eine Messung der Einzelschichtdicke auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen ausgeschlossen werden. In der Literatur ist ebenfalls eine Zunahme der Myelinschichtdicke (Verringerung der g-ratio) in Lithium-behandelten Tieren nach Verletzung des Ischias- und Facialisnerven (Makoukji et al. 2012) sowie nach traumatischem Austriss und Re-Implantation der Vorderwurzel aus dem Rückenmark (Fu et al. 2014; Su et al. 2014; Fang et al. 2016) beschrieben. Interessanterweise zeigte sich in unseren Versuchstieren keine Veränderung der Myelindicke in jungen Wildtyp-Tieren, die im Verlauf der Myelinisierung mit Lithium behandelt wurden (Gruppen p0 – p6 und p0 – p21).

Während die älteren Ratten der Gruppe p30 – p117 mit Lithiumcarbonat behandelt wurden, erfolgte in den Gruppen p0 – p6 und p0 – p21 eine Applikation von Lithiumchlorid. Lithiumsalze dissoziieren jedoch in wässriger Lösung in  $\text{Li}^+$  und  $\text{Cl}^-$  bzw.  $\text{CO}_3^{2-}$ .  $\text{Li}^+$ -Ionen, entsprechen in ihrer Permeabilität der von Natrium-Ionen und werden gut im Magen-Darm-Trakt sowie im Peritoneum resorbiert. Lediglich die Dissoziationsgeschwindigkeit der verschiedenen Lithiumsalze unterscheidet sich (Oruch et al. 2014). Daher sollte die Art der verschiedenen Lithiumsalze (Lithiumchlorid, Lithiumcarbonat) keinen wesentlichen Einfluss auf die Wirkung haben.

Neureguline sind eine Gruppe von transmembranen oder sekretierten Proteinen, die über eine *epidermal growth factor (EGF)-like*-Domäne verfügen. Die transmembranen Neureguline werden von einer Metalloproteinase abgespalten und wirken als paracrines Signalmolekül oder bleiben im Fall von Nrg1 Typ III als juxtacrines Signalmolekül über eine zweite transmembrane Domäne an die Zelle gebunden. Die EGF-Domäne bindet an ErbB-Rezeptoren, die auf der Schwanzzell-Oberfläche exprimiert werden (Nave und Salzer 2006). ErbB-Rezeptoren sind Rezeptortyrosinkinasen die eine Vielzahl von Downstream-Signalwegen wie z. B. Phospholipase C, MAPK und JNK aktivieren können (Ceresa und Vanlandingham 2008). Auf der Axonoberfläche präsentiertes neuronales Nrg1 Typ III scheint einer der entscheidenden Faktoren der Myelinisierung zu sein. Wird eine bestimmte Schwelle an axonal präsentiertem Nrg1 Typ III überschritten, so wird das Axon von einer Schwanzzelle myelinisiert (Taveggia et al. 2005). Außerdem reguliert die Menge des axonal präsentierten Nrg1 Typ III die Dicke der Myelinscheide (Michailov et al. 2004). Während autonome unmyelinisierte Axone geringe Mengen Nrg1 Typ III exprimieren, exprimieren z. B. Bdnf- und Nt3-abhängige, stark myelinisierte DRG-Neurone hohe Mengen Nrg1 Typ III. Wang et al. (2015) konnten zeigen, dass Bdnf in der Lage ist die Expression von *Nrg1 Typ III*-mRNA zu induzieren. Sowohl in der Wildtyp- als auch in der transgenen Gruppe der adulten Tiere, die nach

Lithiumbehandlung eine dickere Myelinscheide aufwiesen, zeigte sich ebenfalls eine erhöhte *Bdnf*-mRNA-Expression, während sich in den juvenilen Tieren keine Erhöhung der *Bdnf*-mRNA-Expression zeigte. Es ist daher möglich, dass die Zunahme der Myelindicke auf einer *Bdnf*-vermittelten Erhöhung des axonal präsentierten Nrg1 Typ III beruht. Hier wären weitere Untersuchungen zur immunhistochemischen oder molekularbiologischen Quantifizierung des Nrg1 Typ III sinnvoll.

Eine weitere denkbare Erklärung für die unterschiedliche Wirkung von Lithium in juvenilen Tieren während der Myelinisierung und adulten Tieren nach Abschluss der Myelinisierung liegt in der Applikationsform von Lithium. Möglicherweise wird in den adulten Tieren aufgrund der regelmäßigen Applikation von Lithium über die Nahrung ein gleichmäßig hoher Lithiumspiegel im Serum erreicht, während die einmal tägliche intraperitoneale Gabe eine geringere mittlere Serumkonzentration erzielt. Aufgrund der technisch zu geringen Blutmenge zur Lithiumbestimmung in den beiden Gruppen juveniler Tiere mit intraperitonealer Applikation von Lithium, bleibt die letztlich erzielte Serumkonzentration jedoch unklar. Auch die Zeitdauer der Behandlung kann in diesem Rahmen als möglicher Einflussfaktor gesehen werden. So reicht ggf. eine Behandlung von nur 6 bzw. 21 Tagen nicht aus, um einen signifikanten Einfluss auf die Myelinisierung zu erzielen. Dem steht gegenüber, dass Makoukji et al. (2012) in Mäusen bereits nach einer 4-tägigen intraperitonealen Behandlung mit 50 mg/kg/Tag eine signifikante klinische und histologische Verbesserung nach *nerve crush*-Experimenten des Facialisnerven zeigen konnten.

Neben der Zunahme der Myelindicke *in vivo* konnte in der vorliegenden Arbeit in einer myelinisierenden Co-Kultur aus Schwanzzellen und DRG-Neuronen eine Zunahme der myelinisierten Segmente nach Behandlung der Kulturen mit 1 mM Lithiumcarbonat für 16 Tage gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe mit Standardmedium gezeigt werden. Nach Behandlung mit 5 mM Lithium zeigten sich nahezu keine myelinisierten Segmente. Hier ist am ehesten von einer toxischen Wirkung des Lithiums auszugehen, da sich hier neben der fehlenden Myelinisierung ebenfalls eine starke Verminderung der kultivierten Neurone zeigte (nicht quantifiziert). Währenddessen ließ sich in den primären Schwanzzellkulturen eine relevante Aktivierung der Myelingenexpression sowie eine Induktion der Expression von *Cx43* als Target des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs erst bei einer Lithiumchlorid-Dosis von 5 mM nachweisen, wohingegen sich bei einer Behandlung der Kulturen mit 1 mM Lithiumchlorid keine relevante Aktivierung von Myelingenen oder mit Myelinisierung assoziierter Gene fand. Um den Einfluss von Lithium auf die Myelinisierung *in vitro* zu untersuchen, wären zusätzliche Untersuchungen mit weiteren Dosierungen und veränderten Behandlungszeiträumen sinnvoll.

Es konnte in der Literatur gezeigt werden, dass intrazelluläre Signalkaskaden, wie z. B. der PI3K/AKT-Signalweg und MAPK/ERK-Signalweg eine wichtige Rolle in der Initiierung und Aufrechterhaltung der Myelinisierung spielen (Norrmén und Suter 2013). Lithium ist in der Lage die Aktivität dieses Signalwegs zu beeinflussen (Phiel und Klein 2001; Pasquali et

al. 2010). Baraban (1994) wiederum beschrieb, dass es in vivo bei Säugetieren erst bei toxischen Lithiumdosierungen zu einer relevanten Beeinflussung des PI3K/AKT-Signalweg kommt. Zusätzlich wurde von den Autoren beschrieben, dass der Einfluss von Lithium auf den MAPK/ERK-Signalweg sich je nach Zelltyp unterscheidet und zeit- und dosisabhängig ist. Dies ist eine mögliche Erklärung dafür, dass sich in der vorliegenden Arbeit lediglich in der Gruppe p30 – p117 eine statistisch signifikante Aktivierung des MAPK/ERK-Signalwegs durch Lithium gezeigt hat.

In vivo zeigte sich in Wildtyp-Tieren bis auf eine mäßig erhöhte *Mpz*-Expression nach 21 Tagen Behandlung weder in der Gruppe p0 – p21 noch in der Gruppe p30 – p117 eine statistisch signifikante Regulation der Expression der Myelinproteine *Pmp22*, *Mbp* oder *Prx*, sowie der *Hmger* und von *Scap*. Im Gegensatz dazu wurde von Makoukji et al. (2012) eine dreifach erhöhte Expression von *Mpz* sowie eine sechsfach erhöhte Expression von *Pmp22* in Ischiasnerven von acht Wochen alten Mäusen nach Lithiumgabe (0,2 % LiCl im Trinkwasser für sieben Tage) gezeigt. In Facialisnerven konnte in derselben Publikation nach intraperitonealer Injektion von Lithiumchlorid (50 mg/kg/d über vier Tage) eine Verdopplung der Expression von *Pmp22* und *Mpz* gezeigt werden. In beiden Gruppen war eine experimentelle Verletzung des Nervens vorangegangen. Es handelte sich hier um einen demyelinisierten und konsekutiv in Remyelinisierung begriffenen Nerven. Es kommt zunächst zu einer wallerischen Degeneration mit Fragmentierung der Axone und Kollaps der Myelinscheiden (Stoll und Müller 1999). Die Folge ist eine Dedifferenzierung der Schwannzellen und eine Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden (Jessen und Mirsky 2002). Dies führt wiederum zu einer Hochregulation der Expression von neurotrophischen Faktoren und Oberflächenproteinen, die ein erneutes Auswachsen der Axone fördern. Dazu gehören *glial cell line-derived neurotrophic factor* (GDNF), *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF), Neurotrophin-3 (NT3), *nerve growth factor* (NGF), *vascular endothelial growth factor* (VEGF), Erythropoetin und weitere (Jessen und Mirsky 2016). Dies ermöglicht ein erneutes Auswachsen der Axone. Möglicherweise ist dieses durch Verletzung bedingte neurochemische Milieu zur Lithium-vermittelten Induktion von Myelinen notwendig.

*Oct6/Pou3f1* und *Krox20/Egr2* sind Transkriptionsfaktoren, die für den Übergang von Schwannzell-Vorläuferzellen zu myelinisierenden Schwannzellen notwendig sind. Ihre Expression ist ein Marker für unreife bzw. pro-myelinisierende Schwannzellen (Jaegle et al. 1996; Svaren und Meijer 2008). Die Expression beider Transkriptionsfaktoren war in Wildtyp-Tieren durch die Behandlung mit Lithium nicht beeinflusst. Folglich scheint die Therapie mit Lithium in Wildtyp-Tieren keinen Einfluss auf die Reifung von Schwannzellen zu haben.

In der vorliegenden Arbeit konnte in vivo im Gegensatz zu anderen Arbeiten (vgl. Meffre et al. 2015) keine wesentliche Induktion von Myelinen durch Lithium in Wildtyp-Ratten gezeigt werden. Neben den oben beschriebenen Erklärungsansätzen kann es sich bei der Induktion der Myelinge auch um ein temporäres Ereignis handeln, dass mit den durchgeführten Experimenten nicht erfasst wurde. Konträr dazu zeigte sich in Kulturen primärer

Schwannzellen dosisabhängig eine Induktion der Myelinproteine *Pmp22* und *Mpz*. Außerdem stellte sich *in vitro* eine Induktion der Expression von Connexin 43 (*Cx43*) dar. *Cx43* wird durch den Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg reguliert (Ai et al. 2000; Du et al. 2008). Lithium ist wiederum in der Lage den Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg zu aktivieren (Hedgepeth et al. 1997). Hieraus lässt sich schließen, dass die Wirkung von Lithium auf die Myelin-Genexpression zumindest teilweise auf der Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs beruht.

## 4.2 Einfluss von Lithium auf den Phänotyp und die Myelinisierung in einem transgenen Rattenmodell der CMT1A

Im Tiermodell hat es mehrere vielversprechende Ansätze zur Behandlung der CMT gegeben (Passage et al. 2004; Meyer zu Horste et al. 2007; Meyer zu Horste et al. 2011; Fledrich et al. 2014). Aufgrund positiver Ergebnisse aus dem Tierversuch wurden mehrere Studien mit Ascorbinsäure zur Behandlung der CMT1A beim Menschen durchgeführt. Ein 2015 publiziertes systematisches Review der Cochrane Library aller Studien mit Ascorbinsäure bei Menschen zeigte mit hoher Evidenz, dass Ascorbinsäure den Krankheitsverlauf der CMT1A nicht positiv beeinflusst. Nach wie vor ist keine wirkungsvolle Therapie für die CMT1A bei Menschen verfügbar.

Salze des Lithiums werden bereits seit 1850 medizinisch eingesetzt. Neben den bekannten Anwendungen bei bipolaren Affektstörungen, Manie, Depression und Cluster-Kopfschmerz (Phiel und Klein 2001) wurden in der Vergangenheit auch wiederholt neuroprotektive (Zhong et al. 2006) und antiapoptotische Effekte (Chuang 2005; Zhong et al. 2006) z. B. bei Alzheimer-Demenz (Noble et al. 2005; McBride et al. 2010) oder Morbus Parkinson (Youdim und Arraf 2004) beschrieben. Im Bereich des peripheren Nervensystems wurden vielversprechende Ergebnisse, z. B. nach Nervenverletzungen (Makoukji et al. 2012; Fang et al. 2016) oder Chemotherapie-induzierter Neuropathie (Alimoradi et al. 2012; Pourmohammadi et al. 2012) erzielt. Neben grundlagenwissenschaftlichen und tierexperimentellen Studien zur Wirkung von Lithium auf das Nervensystem gibt es mittlerweile auch erste klinische Ansätze zur Behandlung neurologischer Störungen mit Lithium. Eine Phase-III-Studie zu den neurotrophischen Effekten von Lithiumcarbonat nach Schlaganfall (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01112813) wurde im Juli 2017 abgeschlossen. Eine erste Publikation aus dem Jahr 2019 zeigte nach 60-tägiger Lithiumbehandlung von Patienten nach Schlaganfall eine Korrelation zwischen einer höheren Lithiumdosis und MR-tomographisch einem erhöhten Volumen der grauen Substanz im Hirn sowie einer besseren verbalen Erinnerungsleistung (Sun et al. 2019). Eine longitudinale randomisierte doppelblinde Placebo-kontrollierte Phase-IV-Studie zum präventiven Effekt von Lithiumcarbonat auf kognitive Störungen im Alter wird aktuell durchgeführt (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03185208). Erste Ergebnisse werden für das Jahr 2022 erwartet. Neben der langen Erfahrung in der Behandlung von bipolaren Störungen konnte in der Vergangenheit gezeigt werden, dass die

Behandlung mit Lithiumcarbonat trotz der geringen therapeutischen Breite nebenwirkungsarm und sicher ist (Delva und Hawken 2001; Macdonald et al. 2008).

Aufgrund der in der Literatur beschriebenen Effekte von Lithium sowie der Ergebnisse aus der Behandlung in Wildtyp-Tieren, wurde eine experimentelle Therapiestudie mit Lithiumcarbonat in *Pmp22*-transgenen Ratten durchgeführt. *Pmp22*-transgene Ratten sind ein anerkanntes Modell für die CMT1A (Sereda et al. 1996; Niemann et al. 1999; Fledrich et al. 2012a). Klinisch kommt es bei betroffenen Patienten wie auch bei den transgenen Ratten zu einer durch den sekundären axonalen Verlust bedingten neurogenen Muskelatrophie. Diese lässt sich im Rattenmodell gut anhand der Griffstärke von Vorder- und Hinterbeinen messen (Sereda et al. 2003; Meyer zu Horste et al. 2007). Im Verlauf des Behandlungszeitraumes von 16 Wochen kam es erwartungsgemäß zu einem statistisch signifikanten Verlust der Griffstärke in Vorder- und Hinterläufen in der Gruppe der transgenen Tiere im Vergleich mit der nicht betroffenen Kontrollgruppe. Die Therapie mit Lithium bewirkte in den transgenen Tieren eine Zunahme der Griffstärke, die jedoch bei einer großen Variabilität der Griffstärke der Vorderbeine, nur bei den Hinterläufen zum Abschluss der Studie statistisch signifikant war. Dies ist insbesondere unter dem Aspekt zu beachten, dass Lithium-behandelte Tiere gegenüber Tieren mit Standardfutter einen statistisch signifikanten Gewichtsverlust von ca. 6 % zeigten und damit mutmaßlich auch eine geringere Muskelmasse besaßen. Lithium-behandelte Wildtyp-Tiere zeigten keine Zunahme der Griffstärke gegenüber Tieren mit Standardfutter, so dass ein reiner anaboler Effekt von Lithium unwahrscheinlich ist.

Die verminderte NLG ist ein weiteres Merkmal der CMT1A (Birouk et al. 1997a). In der vorliegenden Untersuchung zeigten *Pmp22*-transgene Ratten analog zu menschlichen Patienten eine deutlich erniedrigte NLG. Nach Behandlung mit Lithium zeigten *Pmp22*-transgene Ratten eine signifikant erhöhte NLG gegenüber ihrer nicht behandelten Vergleichsgruppe. Die Muskelsummenaktionspotentiale in den Lithium-behandelten Gruppen waren leicht verringert. Dies ist im Zusammenhang mit dem Gewichtsverlust am ehesten als Zeichen einer geringeren Muskelmasse zu sehen. Passend zu der erhöhten NLG wiesen die behandelten Tiere eine signifikant geringere g-ratio als Ausdruck einer dickeren Myelinscheide auf. Dies entspricht den Ergebnissen aus der Behandlung der Wildtyp-Tiere. Die von Meyer zu Horste et al. (2007) beschriebene Hypermyelinisierung kleinkalibriger Axone und Hypomyelinisierung großer Axone *Pmp22*-transgener Ratten zeigte sich ebenfalls in den beiden transgenen Gruppen. Eine Beeinflussung der pathologischen Hyper- bzw. Hypomyelinisierung ließ sich durch die Behandlung mit Lithium nicht erzielen.

Histologisch zeigt sich in der CMT ein axonaler Verlust als Folge der Demyelinisierung. Meyer zu Horste et al. (2007) zeigten, dass es durch die therapeutische Gabe des Progesteronantagonisten Onapristone möglich ist, den axonalen Verlustes abzumildern, ohne die Myelinpathologie der CMT zu verändern. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich im Unterschied zu Meyer zu Horste et al. (2007) nach Behandlung mit Lithium nun eine Verbesserung des Phänotyps, eine Zunahme der Myelindicke und eine verringerte Anzahl demyelinisierter

Axone, ohne den axonalen Verlust der CMT statistisch signifikant aufhalten zu können. Im Gegensatz dazu finden sich in der Literatur Beispiele bei denen durch die Behandlung mit Lithium eine Zunahme der Anzahl myelinisierter Axone nach Nervenverletzung erzielt werden konnte (Makoukji et al. 2012; Fang et al. 2016).

Auf mRNA-Level zeigte sich in *Pmp22*-transgenen Ratten im Vergleich zu Wildtyp-Tieren eine statistisch signifikante Induktion der Expression des Transkriptionsfaktors *Oct6/Pou3f1* sowie eine Runterregulation von *Krox20/Egr2* und *Prx*. Gleichzeitig war die Expression myelinassoziierter Gene in den *Pmp22*-transgenen Tieren als Ausdruck einer Differenzierungs- und Myelinisierungsstörung der Schwanzzellen deutlich erniedrigt. Durch eine Behandlung der transgenen Ratten mit Lithium kam es zu einer statistisch signifikanten Induktion von *Mpx* sowie einer statistisch nicht signifikanten Erhöhung der übrigen Myelinassozierten Gene. Die Expression der Schwanzzell-Differenzierungsmarker war nicht verändert. Es ist davon auszugehen, dass Lithium die Myelinbildung stimuliert, ohne einen signifikanten Einfluss auf den Schwanzzell-Defekt zu nehmen (Jessen und Mirsky 2002; Fledrich et al. 2014).

Die transgenen Tiere zeigten eine Überexpression von *Pmp22* von etwa 1,6 gegenüber der Wildtyp-Gruppe. Dies entspricht den Literaturangaben zu der *Pmp22*-transgenen Ratte (Sereda et al. 1996). Eine Veränderung der toxischen *Pmp22*-Überexpression durch Lithiumbehandlung konnte nicht erreicht werden.

*Brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) ist ein endogener neurotropher Wachstumsfaktor. Strukturell ist er mit dem *nerve growth factor* (NGF) verwandt (Hohn et al. 1990). Er bindet mit hoher Affinität an den *tropomyosin-related kinase receptor B* (TrkB) (Barbacid 1995) sowie mit geringerer Affinität an den *p75 neurotrophin receptor* (p75NTR) (Rodriguez-Tébar et al. 1990). P75NTR gehört zur Gruppe der Tumor-Nekrosefaktor-Rezeptoren. Er hat in etwa die gleiche Affinität zu allen Neurotrophinen (Terenghi 1999). P75NTR vermittelt unter anderem über *nuclear factor  $\kappa$ B* (NF- $\kappa$ B) das Überleben von Neuronen (Hamanoue et al. 1999) und ist in der Lage über die Jun-Kinase/c-Jun-Kaskade p53 und andere proapoptotische Gene (Reichardt 2006) zu aktivieren. Außerdem wurde gezeigt, dass p75NTR über die Rho-GTPase RhoA ligandenabhängig das axonale Wachstum reguliert (Yamashita et al. 1999). Der TrkB bildet nach Aktivierung Dimere und initiiert die Autophosphorylierung intrazellulärer Tyrosinreste (Kaplan und Miller 2000). Phosphoryliertes TrkB ist wiederum in der Lage die Enzyme Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K), *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) und Phospholipase C (PLC) zu aktivieren. Hierüber wird eine Vielzahl von Prozessen, unter anderem synaptische Plastizität, Proteinbiosynthese, eine Steigerung des Dentritenwachstum sowie die Verzweigung von Axonen und vieles mehr beeinflusst (Kowiański et al. 2018). BDNF ist involviert in einer großen Anzahl neurophysiologischer Prozesse. Die bedeutendsten Funktionen von BDNF umfassen die Regulation von Neuro-, Glia- und Synaptogenese, Neuroprotektion, Entwicklungsprozesse des Nervensystems sowie die Beeinflussung von



Lernen und Kognition (Foltran und Diaz 2016). In der Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass BDNF neben den bekannten Aufgaben bei der neuronalen Plastizität und dem Überleben von Neuronen maßgebliche Funktionen in der Myelinisierung des peripheren Nervensystems hat. So ist exogen hinzugefügtes Bdnf in Co-Kulturen aus DRG-Neuronen und Schwannzellen in der Lage die Expression von Myelinen zu induzieren. In vivo konnte gezeigt werden, dass subkutane Injektionen von Bdnf zu einer vermehrten Myelinisierung des Ischiasnerven führen, während eine Blockierung von Bdnf mittels eines Fusionsproteins aus der extrazellulären Domäne des TrkB-Rezeptors und Fc-Fraktion von IgG zu einer verminderten Myelinisierung führte (Chan et al. 2001). *Bdnf*-überexprimierende Mäuse zeigen eine Zunahme der Myelindicke, ohne dass es zu einer Erhöhung der Anzahl myelinisierter Axone kommt (Tolwani et al. 2004). Außerdem publizierten Funakoshi et al. (1993), dass Schwannzellen nach Nervenverletzung Bdnf produzieren. Cosgaya et al. (2002) konnten zeigen, dass die pro-myelinisierende Wirkung von Bdnf über den p75<sup>NTR</sup>-Rezeptor vermittelt wird. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass *Pmp22*-transgene Ratten eine gegenüber Wildtyp-Ratten um ca. 70 % reduzierte *Bdnf*-Expression aufweisen. Ob es sich dabei um einen Teil des Pathomechanismus der CMT1A handelt, oder ob die verminderte *Bdnf*-Expression ein sekundärer Effekt ist, der durch die Schwanzzell-Dedifferenzierung hervorgerufen wird, sollte Ziel zukünftiger Untersuchungen sein. Lithium ist in der vorliegenden Arbeit in der Lage die erniedrigte *Bdnf*-Expression in *Pmp22*-transgenen Tieren annähernd auf Wildtyp-Niveau zu bringen. Ein ähnlicher Effekt wurde von Leyhe et al. (2009) bei Patienten mit einem Frühstadium der Alzheimer Erkrankung beschrieben. Betroffene Patienten zeigten einen erniedrigten BDNF-Spiegel im Serum. Nach Behandlung mit Lithium erhöhte sich der BDNF-Serumspiegel und der klinische Zustand besserte sich statistisch signifikant. In Ratten konnte eine Erhöhung des Bdnf-Spiegels im Gehirn nach oraler Lithiumgabe gezeigt werden (Fukumoto et al. 2001; Jornada et al. 2010; Wu et al. 2014). Die Erhöhung der *Bdnf*-mRNA-Expression wird epigenetisch über eine Verringerung der Methylierung des *Bdnf*-Promoters-IV reguliert (Dwivedi und Zhang 2014). Yasuda et al. (2009) beschrieben, dass die Aktivierung des *Bdnf*-Promoter-IV nach Behandlung mit Lithium über eine Inhibition der Glykogensynthasekinase 3 beta sowie nachfolgend die Histon-Deacetylase vermittelt wird.

Aus den vorliegenden Daten lässt sich schlussfolgern, dass die Lithium-vermittelte Induktion der Expression des Neurotrophins *Bdnf* ein möglicher Mechanismus der Zunahme der Myelindicke ist.

Insgesamt zeigte sich klinisch ein statistisch signifikanter Effekt von Lithiumcarbonat auf die Griffstärke sowie elektrophysiologisch auf die NLG. Molekularbiologisch ließ sich eine Induktion von Myelinen sowie eine erhöhte Expression des Neurotrophins *Bdnf* nachweisen. Histologisch zeigte sich eine Zunahme der Myelindicke sowie eine verminderte Anzahl demyelinisierter Axone. Die Ausprägung der klinischen, elektrophysiologischen und histologischen Verbesserung ist allerdings nur gering. Für eine medikamentöse Therapie mit Li<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

---

in menschlichen Patienten mit CMT1A sind daher weitere Experimente mit anderen Behandlungszeiträumen und Dosierungen notwendig, um die Möglichkeit einer verbesserten Wirkung auf den Phänotyp der CMT1A zu untersuchen. Schlussendlich ist eine effektive Therapie der CMT1A nur möglich, wenn es gelingt den sekundären axonalen Verlust zu verringern.

## 5 Zusammenfassung

Salze des Lithiums werden im klinischen Alltag zur Prophylaxe der bipolaren affektiven Störung sowie zur Behandlung von Major-Depressionen angewendet. Daneben gibt es vielfältige experimentelle Ansätze zur Behandlung von kognitiven Störungen und neurodegenerativen Erkrankungen mit Lithium. Die Anwendung von Lithium ist trotz der geringen therapeutischen Breite sicher und nebenwirkungsarm. In der Literatur werden zahlreiche neuroprotektive und neurotrophische Effekte von Lithium beschrieben. So ist Lithium in der Lage die Induktion von Myelinen sowie dem Neurotrophin *Bdnf* zu induzieren, die Remyelinisierung nach Nervenverletzungen zu verbessern und Chemotherapie-induzierte Neuropathien abzumildern. In der vorliegenden Arbeit wurde nun in einem ersten Schritt der Einfluss von Lithium auf die Myelinisierung im peripheren Nervensystem von Wildtyp-Ratten untersucht. Hierzu wurden junge Wildtyp-Ratten von Geburt bis zum 6. bzw. 21. Lebenstag durch tägliche intraperitoneale Injektionen von Lithiumchlorid 50 mg/kg/KG behandelt. Eine Gruppe adulter Ratten wurden vom 30. bis 117. Lebenstag durch orale Zufuhr von 0,12 % Lithiumcarbonat im Futter behandelt. Im Anschluss erfolgte die histologische und molekularbiologische Analyse des peripheren Nervensystems. Während sich in jungen Tieren, innerhalb des Prozesses der Myelinisierung, kein Einfluss auf die Myelindicke durch Lithium zeigte, kam es in älteren Tieren, die erst nach Abschluss der physiologischen Myelinisierung mit Lithium behandelt wurden, zu einer Zunahme der relativen Myelindicke. In Kulturen primärer Schwanzzellen von Wildtyp-Ratten ließ sich eine Induktion der Myelinenexpression von *Pmp22* und *Mpz* sowie von *Cx43* als Marker für eine Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs nach 72-stündiger Behandlung mit Lithiumchlorid nachweisen. Der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg ist entscheidend für die Regulation der embryologischen Entwicklung, Zellproliferation und Zelldifferenzierung. Co-Kulturen aus primären dorsalen Hinterwurzel-Neuronen (DRG-Neurone) und Schwanzzellen von Wildtyp-Ratten zeigten nach Induktion der Myelinisierung und zeitgleicher Behandlung mit Lithium eine Zunahme der Anzahl myelinisierter Segmente.

Um in einem weiteren Schritt Lithium als Therapieansatz bei einer peripheren Neuropathie zu testen, führten wir eine Therapiestudie in einem transgenen Rattenmodell der Charcot-Marie-Tooth-Erkrankung 1A (CMT1A) durch. Die CMT1A ist die häufigste genetisch bedingte periphere Neuropathie. In den meisten Fällen ist eine Duplikation des Gens für das periphere Myelinprotein 22 kDa (*Pmp22*) die Ursache der CMT1A. Hierdurch kommt es zu einer Demyelinisierung der Axone mit einem sekundären axonalen Schaden und führt in betroffenen Patienten zu einer progredienten, distal betonten Muskelatrophie. Die *Pmp22*-transgene Ratte zeigt eine mäßige Überexpression von *Pmp22* und spiegelt den Krankheitsverlauf im Menschen gut wider. *Pmp22*-transgene Ratten wurden ab dem Alter von vier Wochen für zwölf Wochen (bis zum Alter von 16 Wochen) mit 0,12 % Lithiumcarbonat p. o. behandelt. Im Verlauf des Behandlungszeitraums erfolgten regelmäßige Untersuchungen der Muskelkraft sowie zum Abschluss der Behandlung die elektrophysiologische Untersuchung

des peripheren Nervensystems. Nach Tötung der Tiere erfolgte die histologische und molekularbiologische Untersuchung des peripheren Nervensystems. Im Vergleich zur unbehandelten transgenen Kontrollgruppe zeigten die Tiere nach Lithiumbehandlung eine größere Kraft der Hinterbeine sowie elektrophysiologisch eine schnellere Nervenleitgeschwindigkeit in den Nerven des Schwanzes. Histologisch konnte eine Zunahme der Myelindicke bei unverändert pathologischer Hypermyelinisierung kleiner und Hypomyelinisierung großer Axone in Tibialisnerven festgestellt werden. Die Anzahl demyelinisierter Axone war in der behandelten transgenen Gruppe signifikant verringert, während sich kein Unterschied in der Gesamtanzahl der myelinisierenden Axone fand. Auf molekularbiologischer Ebene zeigten Lithium-behandelte Tiere eine Induktion der Expression des Myelins *Mpz* sowie des Neurotrophins *Bdnf* in Ischiasnerven. Die Induktion der *Bdnf*-Expression ist ein möglicher Mechanismus für die Zunahme der Myelindicke sowie für die neuroprotektive Wirkung von Lithium.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Behandlung mit Lithium zu einer Zunahme der Myelindicke in adulten Wildtyp-Ratten sowie zu einer Induktion von Myelinen und des Neurotrophins *Bdnf* führte. In einer myelinisierenden Co-Kultur aus DRG-Neuronen und Schwanzzellen führte Lithium zu einer Zunahme der myelinisierten Segmente. Außerdem zeigte sich ein positiver Einfluss von Lithium auf den Krankheitsverlauf in einem Rattenmodell der CMT1A. Für ein besseres Verständnis des Wirkungsmechanismus von Lithium auf das periphere Nervensystem sowie für die Evaluation von Lithium als mögliche medikamentöse Therapie peripherer Neuropathien beim Menschen sind jedoch noch weitere Untersuchungen notwendig.

## 6 Literaturverzeichnis

- Aghdam SY, Barger SW (2007): Glycogen synthase kinase-3 in neurodegeneration and neuroprotection: lessons from lithium. *Curr Alzheimer Res* 4, 21–31
- Ai Z, Fischer A, Spray DC, Brown AM, Fishman GI (2000): Wnt-1 regulation of connexin43 in cardiac myocytes. *J Clin Invest* 105, 161–171
- Alimoradi H, Pourmohammadi N, Mehr SE, Hassanzadeh G, Hadian MR, Sharifzadeh M, Bakhtiarian A, Dehpour AR (2012): Effects of lithium on peripheral neuropathy induced by vincristine in rats. *Acta Med Iran* 50, 373–379
- Anzini P, Neuberg DH, Schachner M, Nelles E, Willecke K, Zielasek J, Toyka KV, Suter U, Martini R (1997): Structural abnormalities and deficient maintenance of peripheral nerve myelin in mice lacking the gap junction protein connexin 32. *J Neurosci* 17, 4545–4551
- Baechner D, Liehr T, Hameister H, Altenberger H, Grehl H, Suter U, Rautenstrauss B (1995): Widespread expression of the peripheral myelin protein-22 gene (PMP22) in neural and non-neural tissues during murine development. *J Neurosci Res* 42, 733–741
- Baraban JM (1994): Toward a crystal-clear view of lithium's site of action. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 5738–5739
- Barbacid M (1995): Neurotrophic factors and their receptors. *Curr Opin Cell Biol* 7, 148–155
- Birouk N, Maisonobe T, Le Forestier N, Gouider R, Léger JM, Bouche P (1997a): Maladie de Charcot-Marie-Tooth : l'électromyogramme reste utile au diagnostic et à la classification. *Rev Neurol* 153, 727–736
- Birouk N, Gouider R, Le Guern E, Gugenheim M, Tardieu S, Maisonobe T, Le Forestier N, Agid Y, Brice A, Bouche P (1997b): Charcot-Marie-Tooth disease type 1A with 17p11.2 duplication. Clinical and electrophysiological phenotype study and factors influencing disease severity in 119 cases. *Brain* 120, 813–823
- Boerkoel CF, Takashima H, Stankiewicz P, Garcia CA, Leber SM, Rhee-Morris L, Lupski JR (2001): Periaxin mutations cause recessive Dejerine-Sottas neuropathy. *Am J Hum Genet* 68, 325–333
- Bunge RP, Bunge MB, Bates M (1989): Movements of the Schwann cell nucleus implicate progression of the inner (axon-related) Schwann cell process during myelination. *J Cell Biol* 109, 273–284
- Burns J, Ouvrier RA, Yiu EM, Joseph PD, Kornberg AJ, Fahey MC, Ryan MM (2009): Ascorbic acid for Charcot-Marie-Tooth disease type 1A in children: a randomised, double-blind, placebo-controlled, safety and efficacy trial. *Lancet Neurol* 8, 537–544
- Ceresa BP, Vanlandingham PA (2008): Molecular Mechanisms that Regulate Epidermal Growth Factor Receptor Inactivation. *Clin Med Oncol* 2, 47–61
- Chan CH, Leung AKH, Cheung YF, Chan PYC, Yeung KWA, Lai KY (2012): A rare neurological complication due to lithium poisoning. *Hong Kong Med J* 18, 343–345

- Chan JR, Cosgaya JM, Wu YJ, Shooter EM (2001): Neurotrophins are key mediators of the myelination program in the peripheral nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 14661–14668
- Chuang D-M (2005): The antiapoptotic actions of mood stabilizers. *Ann NY Acad Sci* 1053, 195–204
- Cosgaya JM, Chan JR, Shooter EM (2002): The neurotrophin receptor p75<sup>NTR</sup> as a positive modulator of myelination. *Science* 298, 1245–1248
- De Sarno P, Axtell RC, Raman C, Roth KA, Alessi DR, Jope RS (2008): Lithium prevents and ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 181, 338–345
- Deber CM, Reynolds SJ (1991): Central nervous system myelin: structure, function, and pathology. *Clin Biochem* 24, 113–134
- Delva NJ, Hawken ER (2001): Preventing lithium intoxication. Guide for physicians. *Can Fam Physician* 47, 1595–1600
- Domenech-Estevez E, Baloui H, Meng X, Zhang Y, Deinhardt K, Dupree JL, Einheber S, Chrast R, Salzer JL (2016): Akt Regulates Axon Wrapping and Myelin Sheath Thickness in the PNS. *J Neurosci* 36, 4506–4521
- Du W, Li J, Du W, Li J, Wang Q, Hou J, Yu B (2008): Lithium Chloride Regulates Connexin43 in Skeletal Myoblasts In Vitro: Possible Involvement in Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling. *Cell Commun Adhes* 15, 261–271
- D’Urso D, Ehrhardt P, Müller HW (1999): Peripheral myelin protein 22 and protein zero: a novel association in peripheral nervous system myelin. *J Neurosci* 19, 3396–3403
- Dwivedi T, Zhang H (2014): Lithium-induced neuroprotection is associated with epigenetic modification of specific BDNF gene promoter and altered expression of apoptotic-regulatory proteins. *Front Neurosci* 8, 457
- Dyck PJ, Chance P, Lebo R, Carney JA: Hereditary Motor and Sensory Neuropathy. In: Dyck PJ, Thomas PK, Griffin JW, Low PA, Poduslo JF (Hrsg.): *Peripheral Neuropathy*. 3rd edition; Saunders, London 1993, 1094–1136
- Dytrych L, Sherman DL, Gillespie CS, Brophy PJ (1998): Two PDZ domain proteins encoded by the murine periaxin gene are the result of alternative intron retention and are differentially targeted in Schwann cells. *J Biol Chem* 273, 5794–5800
- Einat H, Yuan P, Gould TD, Li J, Du J, Zhang L, Manji HK, Chen G (2003): The role of the extracellular signal-regulated kinase signaling pathway in mood modulation. *J Neurosci* 23, 7311–7316
- Eldridge CF, Bunge MB, Bunge RP, Wood PM (1987): Differentiation of axon-related Schwann cells in vitro. I. Ascorbic acid regulates basal lamina assembly and myelin formation. *J Cell Biol* 105, 1023–1034
- Fahrenkamp I, Friede RL (1987): Characteristic variations of relative myelin sheath thickness in 11 nerves of the rat. *Anat Embryol* 177, 115–121

- Fancy SPJ, Baranzini SE, Zhao C, Yuk D-I, Irvine K-A, Kaing S, Sanai N, Franklin RJM, Rowitch DH (2009): Dysregulation of the Wnt pathway inhibits timely myelination and remyelination in the mammalian CNS. *Genes Dev* 23, 1571–1585
- Fang X-Y, Zhang W-M, Zhang C-F, Wong W-M, Li W, Wu W, Lin J-H (2016): Lithium accelerates functional motor recovery by improving remyelination of regenerating axons following ventral root avulsion and reimplantation. *Neuroscience* 329, 213–225
- Fledrich R, Schlotter-Weigel B, Schnizer TJ, Wichert SP, Stassart RM, Meyer zu Hörste G, Klink A, Weiss BG, Haag U, Walter MC, et al. (2012a): A rat model of Charcot-Marie-Tooth disease 1A recapitulates disease variability and supplies biomarkers of axonal loss in patients. *Brain* 135, 72–87
- Fledrich R, Stassart RM, Sereda MW (2012b): Murine therapeutic models for Charcot-Marie-Tooth (CMT) disease. *Br Med Bull* 102, 89–113
- Fledrich R, Stassart RM, Klink A, Rasch LM, Prukop T, Haag L, Czesnik D, Kungl T, Abdelaal TAM, Keric N, et al. (2014): Soluble neuregulin-1 modulates disease pathogenesis in rodent models of Charcot-Marie-Tooth disease 1A. *Nat Med* 20, 1055–1061
- Fledrich R, Akkermann D, Schütza V, Abdelaal TA, Hermes D, Schäffner E, Soto-Bernardini MC, Götz T, Klink A, Kusch K, others (2019): NRG1 type I dependent autocrine stimulation of Schwann cells in onion bulbs of peripheral neuropathies. *Nat Commun* 10, 1467
- Foltran RB, Diaz SL (2016): BDNF isoforms: a round trip ticket between neurogenesis and serotonin? *J Neurochem* 138, 204–221
- Fu R, Tang Y, Ling Z-M, Li Y-Q, Cheng X, Song F-H, Zhou L-H, Wu W (2014): Lithium enhances survival and regrowth of spinal motoneurons after ventral root avulsion. *BMC Neurosci* 15, 84
- Fukumoto T, Morinobu S, Okamoto Y, Kagaya A, Yamawaki S (2001): Chronic lithium treatment increases the expression of brain-derived neurotrophic factor in the rat brain. *Psychopharmacology* 158, 100–106
- Funakoshi H, Frisén J, Barbany G, Timmusk T, Zachrisson O, Verge V, Persson H (1993): Differential expression of mRNAs for neurotrophins and their receptors after axotomy of the sciatic nerve. *J Cell Biol* 123, 455–465
- Gabreëls-Festen A, Wetering RV (1999): Human nerve pathology caused by different mutational mechanisms of the PMP22 gene. *Ann NY Acad Sci* 883, 336–343
- Garbay B, Heape A, Sargueil F, Cassagne C (2000): Myelin synthesis in the peripheral nervous system. *Prog Neurobiol* 61, 267–304
- Goebbels S, Oltrogge JH, Wolfer S, Wieser GL, Nientiedt T, Pieper A, Ruhwedel T, Groszer M, Sereda MW, Nave K-A (2012): Genetic disruption of Pten in a novel mouse model of tomaculous neuropathy. *EMBO Mol Med* 4, 486–499
- Hamanoué M, Middleton G, Wyatt S, Jaffray E, Hay RT, Davies AM (1999): p75-mediated NF- $\kappa$ B activation enhances the survival response of developing sensory neurons to nerve growth factor. *Mol Cell Neurosci* 14, 28–40

- Hedgepeth CM, Conrad LJ, Zhang J, Huang H-C, Lee VM, Klein PS (1997): Activation of the Wnt signaling pathway: a molecular mechanism for lithium action. *Dev Biol* 185, 82–91
- Hohn A, Leibrock J, Bailey K, Barde YA (1990): Identification and characterization of a novel member of the nerve growth factor/brain-derived neurotrophic factor family. *Nature* 344, 339–341
- Huxley C, Passage E, Manson A, Putzu G, Figarella-Branger D, Pellissier JF, 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, 563–569
- Huxley C, Passage E, Robertson AM, Youl B, Huston S, Manson A, Sabéran-Djoniedi D, Figarella-Branger D, Pellissier JF, Thomas PK, Fontés M (1998): Correlation between varying levels of PMP22 expression and the degree of demyelination and reduction in nerve conduction velocity in transgenic mice. *Hum Mol Genet* 7, 449–458
- Jaegle M, Mandemakers W, Broos L, Zwart R, Karis A, Visser P, Grosveld F, Meijer D (1996): The POU factor Oct-6 and Schwann cell differentiation. *Science* 273, 507–510
- Jessen KR, Mirsky R (2002): Signals that determine Schwann cell identity. *J Anat* 200, 367–376
- Jessen KR, Mirsky R (2005): The origin and development of glial cells in peripheral nerves. *Nat Rev Neurosci* 6, 671–682
- Jessen KR, Mirsky R (2016): The repair Schwann cell and its function in regenerating nerves. *J Physiol* 594, 3521–3531
- Jetten AM, Suter U (2000): The peripheral myelin protein 22 and epithelial membrane protein family. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 64, 97–129
- Jornada LK, Moretti M, Valvassori SS, Ferreira CL, Padilha PT, Arent CO, Fries GR, Kapczinski F, Quevedo J (2010): Effects of mood stabilizers on hippocampus and amygdala BDNF levels in an animal model of mania induced by ouabain. *J Psychiatr Res* 44, 506–510
- Jung-Testas I, Schumacher M, Robel P, Baulieu EE (1996): Demonstration of progesterone receptors in rat Schwann cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 58, 77–82
- Kaplan DR, Miller FD (2000): Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol* 10, 381–391
- Karlsson U, Schultz RL (1965): Fixation of the central nervous system for electron microscopy by aldehyde perfusion: I. Preservation with aldehyde perfusates versus direct perfusion with osmium tetroxide with special reference to membranes and the extracellular space. *J Ultrastruct Res* 12, 160–186
- Kaya F, Belin S, Bourgeois P, Micaleff J, Blin O, Fontés M (2007): Ascorbic acid inhibits PMP22 expression by reducing cAMP levels. *Neuromuscul Disord* 17, 248–253
- Kennedy G, Mitra J (1963): Body weight and food intake as initiating factors for puberty in the rat. *J Physiol* 166, 408–418



- Khajavi M, Shiga K, Wiszniewski W, He F, Shaw CA, Yan J, Wensel TG, Snipes GJ, Lupski JR (2007): Oral curcumin mitigates the clinical and neuropathologic phenotype of the Trembler-J mouse: a potential therapy for inherited neuropathy. *Am J Hum Genet* **81**, 438–453
- Kirschner D, Blaurock A: Organization, phylogenetic variations, and dynamic transitions of myelin. In: Martenson RE (Hrsg.): *Myelin: biology and chemistry*. CRC Press, Bethesda 1992, 3–78
- Kleitman N, Wood PM, Bunge RP: Tissue Culturing Methods for the Study of Myelination. In: Banker G, Goslin K (Hrsg.): *Culturing Nerve Cells*. 2nd edition; The MIT Press, Cambridge 1998, 545–594
- Kowiański P, Lietzau G, Czuba E, Waśkow M, Steliga A, Moryś J (2018): BDNF: A Key Factor with Multipotent Impact on Brain Signaling and Synaptic Plasticity. *Cell Mol Neurobiol* **38**, 579–593
- Krajewski KM, Lewis RA, Fuerst DR, Turansky C, Hinderer SR, Garbern J, Kamholz J, Shy ME (2000): Neurological dysfunction and axonal degeneration in Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Brain* **123**, 1516–1527
- Laaksonen K, Nevalainen T, Haasio K, Kasanen I, Nieminen P, Voipio H (2013): Food and water intake, growth, and adiposity of Sprague-Dawley rats with diet board for 24 months. *Lab Anim* **47**, 245–256
- LeBlanc AC, Windebank AJ, Poduslo JF (1992): P 0 gene expression in Schwann cells is modulated by an increase of cAMP which is dependent on the presence of axons. *Mol Brain Res* **12**, 31–38
- Leblanc SE, Srinivasan R, Ferri C, Mager GM, Gillian-Daniel AL, Wrabetz L, Svaren J (2005): Regulation of cholesterol/lipid biosynthetic genes by Egr2/Krox20 during peripheral nerve myelination. *J Neurochem* **93**, 737–748
- Ledoux J-M (2003): Features of the comparative pharmacokinetics of lithium; a potential application of its use in livestock farming. *Med Hypotheses* **61**, 278–281
- Lemke G, Lamar E, Patterson J (1988): Isolation and analysis of the gene encoding peripheral myelin protein zero. *Neuron* **1**, 73–83
- Lewis RA, McDermott MP, Herrmann DN, Hoke A, Clawson LL, Siskind C, Feely SME, Miller LJ, Barohn RJ, Smith P, et al. (2013): High-dosage ascorbic acid treatment in Charcot-Marie-Tooth disease type 1A: results of a randomized, double-masked, controlled trial. *JAMA Neurol* **70**, 981–987
- Leyhe T, Eschweiler GW, Stransky E, Gasser T, Annas P, Basun H, Laske C (2009): Increase of BDNF serum concentration in lithium treated patients with early Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* **16**, 649–656
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001): Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**, 402–408
- Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**, 265–275
- Luft JH (1961): Improvements in epoxy resin embedding methods. *J Cell Biol* **9**, 409–414

- Lupski JR, de Oca-Luna RM, Slaugenhaupt S, Pentao L, Guzzetta V, Trask BJ, Saucedo-Cardenas O, Barker DF, Killian JM, Garcia CA, et al. (1991): DNA duplication associated with Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Cell* **66**, 219–232
- Lupski JR, Reid JG, Gonzaga-Jauregui C, Rio Deiros D, Chen DCY, Nazareth L, Bainbridge M, Dinh H, Jing C, Wheeler DA, et al. (2010): Whole-genome sequencing in a patient with Charcot-Marie-Tooth neuropathy. *N Engl J Med* **362**, 1181–1191
- Macdonald A, Briggs K, Poppe M, Higgins A, Velayudhan L, Lovestone S (2008): A feasibility and tolerability study of lithium in Alzheimer's disease. *Int J Geriatr Psychiatry* **23**, 704–711
- Magyar JP, Martini R, Ruelicke T, Aguzzi A, Adlkofer K, Dembic Z, Zielasek J, Toyka KV, Suter U (1996): Impaired differentiation of Schwann cells in transgenic mice with increased PMP22 gene dosage. *J Neurosci* **16**, 5351–5360
- Makoukji J, Belle M, Meffre D, Stassart R, Grenier J, Shackleford G, Fledrich R, Fonte C, Branchu J, Goulard M, et al. (2012): Lithium enhances remyelination of peripheral nerves. *Proc Natl Acad Sci USA* **109**, 3973–3978
- Manfioletti G, Ruaro ME, Del Sal G, Philipson L, Schneider C (1990): A growth arrest-specific (gas) gene codes for a membrane protein. *Mol Cell Biol* **10**, 2924–2930
- McBride SM, Choi CH, Schoenfeld BP, Bell AJ, Liebelt DA, Ferreira D, Choi RJ, Hinchey P, Kollars M, Terlizzi AM, others (2010): Pharmacological and genetic reversal of age-dependent cognitive deficits attributable to decreased presenilin function. *J Neurosci* **30**, 9510–9522
- Meffre D, Massaad C, Grenier J (2015): Lithium chloride stimulates PLP and MBP expression in oligodendrocytes via Wnt/ $\beta$ -catenin and Akt/CREB pathways. *Neuroscience* **284**, 962–971
- Meyer zu Horste G, Prukop T, Liebetanz D, Mobius W, Nave K-A, Sereda MW (2007): Antiprogestosterone therapy uncouples axonal loss from demyelination in a transgenic rat model of CMT1A neuropathy. *Ann Neurol* **61**, 61–72
- Meyer zu Horste G, Miesbach TA, Muller JI, Fledrich R, Stassart RM, Kieseier BC, Coleman MP, Sereda MW (2011): The Wlds transgene reduces axon loss in a Charcot-Marie-Tooth disease 1A rat model and nicotinamide delays post-traumatic axonal degeneration. *Neurobiol Dis* **42**, 1–8
- Micallef J, Attarian S, Dubourg O, Gonnaud P-M, Hogrel J-Y, Stojkovic T, Bernard R, Jouve E, Pitel S, Vacherot F, et al. (2009): Effect of ascorbic acid in patients with Charcot-Marie-Tooth disease type 1A: a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Neurol* **8**, 1103–1110
- Michailov GV, Sereda MW, Brinkmann BG, Fischer TM, Haug B, Birchmeier C, Role L, Lai C, Schwab MH, Nave K-A (2004): Axonal neuregulin-1 regulates myelin sheath thickness. *Science* **304**, 700–703
- Mo M, Erdelyi I, Szigeti-Buck K, Benbow JH, Ehrlich BE (2012): Prevention of paclitaxel-induced peripheral neuropathy by lithium pretreatment. *FASEB J* **26**, 4696–4709

- Morgan L, Jessen KR, Mirsky R (1991): The effects of cAMP on differentiation of cultured Schwann cells: progression from an early phenotype (04+) to a myelin phenotype (P0+, GFAP-, N-CAM-, NGF-receptor-) depends on growth inhibition. *J Cell Biol* 112, 457–467
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986): Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 51, 263–273
- Nave K-A, Salzer JL (2006): Axonal regulation of myelination by neuregulin 1. *Curr Opin Neurobiol* 16, 492–500
- Newbern JM, Li X, Shoemaker SE, Zhou J, Zhong J, Wu Y, Bonder D, Hollenback S, Coppola G, Geschwind DH, others (2011): Specific functions for ERK/MAPK signaling during PNS development. *Neuron* 69, 91–105
- Niemann S, Sereda MW, Rossner M, Stewart H, Suter U, Meinck HM, Griffiths IR, Nave KA (1999): The „CMT rat“: peripheral neuropathy and dysmyelination caused by transgenic overexpression of PMP22. *Ann NY Acad Sci* 883, 254–261
- Niemann S, Sereda MW, Suter U, Griffiths IR, Nave KA (2000): Uncoupling of myelin assembly and schwann cell differentiation by transgenic overexpression of peripheral myelin protein 22. *J Neurosci* 20, 4120–4128
- Nobbio L, Sturla L, Fiorese F, Usai C, Basile G, Moreschi I, Benvenuto F, Zocchi E, De Flora A, Schenone A, Bruzzone S (2009): P2X7-mediated increased intracellular calcium causes functional derangement in Schwann cells from rats with CMT1A neuropathy. *J Biol Chem* 284, 23146–23158
- Noble W, Planel E, Zehr C, Olm V, Meyerson J, Suleman F, Gaynor K, Wang L, LaFrancois J, Feinstein B, others (2005): Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by lithium correlates with reduced tauopathy and degeneration in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 6990–6995
- Norrmén C, Suter U (2013): Akt/mTOR signalling in myelination. *Biochem Soc Trans* 41, 944–950
- Nouri M, Rasouli MR, Rahimian R, Asadi-Amoli F, Dehpour AR (2009): Lithium improves regeneration after sciatic nerve traumatic injury in rat. *J Reconstr Microsurg* 25, 151
- Oruch R, Elderbi MA, Khattab HA, Pryme IF, Lund A (2014): Lithium: a review of pharmacology, clinical uses, and toxicity. *Eur J Pharmacol* 740, 464–473
- Palau F, Löfgren A, De Jonghe P, Bort S, Nelis E, Sevilla T, Martin JJ, 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, 2031–2035
- Pardo R, Andreolotti AG, Ramos B, Picatoste F, Claro E (2003): Opposed effects of lithium on the MEK-ERK pathway in neural cells: inhibition in astrocytes and stimulation in neurons by GSK3 independent mechanisms. *J Neurochem* 87, 417–426
- Pareek S, Suter U, Snipes GJ, Welcher AA, Shooter EM, Murphy RA (1993): Detection and processing of peripheral myelin protein PMP22 in cultured Schwann cells. *J Biol Chem* 268, 10372–10379

- Pareyson D, Marchesi C (2009): Diagnosis, natural history, and management of Charcot-Marie-Tooth disease. *Lancet Neurol* **8**, 654–667
- Pareyson D, Scaiola V, Laurà M (2006): Clinical and electrophysiological aspects of Charcot-Marie-Tooth disease. *Neuromolecular Med* **8**, 3–22
- Pareyson D, Reilly MM, Schenone A, Fabrizi GM, Cavallaro T, Santoro L, Vita G, Quattrone A, Padua L, Gemignani F, et al. (2011): Ascorbic acid in Charcot-Marie-Tooth disease type 1A (CMT-TRIAAL and CMT-TRAUK): a double-blind randomised trial. *Lancet Neurol* **10**, 320–328
- Parmantier E, Cabon F, Braun C, D’Urso D, Müller HW, Zalc B (1995): Peripheral myelin protein-22 is expressed in rat and mouse brain and spinal cord motoneurons. *Eur J Neurosci* **7**, 1080–1088
- Pasquali L, Busceti CL, Fulceri F, Paparelli A, Fornai F (2010): Intracellular pathways underlying the effects of lithium. *Behav Pharmacol* **21**, 473–492
- Passage E, Norreel JC, Noack-Fraissignes P, Sanguedolce V, Pizant J, Thirion X, Robaglia-Schlupp A, Pellissier JF, Fontés M (2004): Ascorbic acid treatment corrects the phenotype of a mouse model of Charcot-Marie-Tooth disease. *Nat Med* **10**, 396–401
- Patel PI, Roa BB, Welcher AA, Schoener-Scott R, Trask BJ, Pentao L, Snipes GJ, Garcia CA, Francke U, Shooter EM, et al. (1992): The gene for the peripheral myelin protein PMP-22 is a candidate for Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Nat Genet* **1**, 159–165
- Patzkó A, Shy ME (2011): Update on Charcot-Marie-Tooth disease. *Curr Neurol Neurosci Rep* **11**, 78–88
- Phiel CJ, Klein PS (2001): Molecular targets of lithium action. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **41**, 789–813
- Pourmohammadi N, Alimoradi H, Mehr SE, Hassanzadeh G, Hadian MR, Sharifzadeh M, Bakhtiarian A, Dehpour AR (2012): Lithium attenuates peripheral neuropathy induced by paclitaxel in rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* **110**, 231–237
- Reichardt LF (2006): Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **361**, 1545–1564
- Reilly MM, Murphy SM, Laurá M (2011): Charcot-Marie-Tooth disease. *J Peripher Nerv Syst* **16**, 1–14
- Reynolds ES (1963): The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol* **17**, 208–212
- Richardson K, Jarett L, Finke E (1960): Embedding in epoxy resins for ultrathin sectioning in electron microscopy. *Stain Technol* **35**, 313–323
- Robert F, Guennoun R, Désarnaud F, Do-Thi A, Benmessahel Y, Baulieu EE, Schumacher M (2001): Synthesis of progesterone in Schwann cells: regulation by sensory neurons. *Eur J Neurosci* **13**, 916–924

- Rodriguez-Tébar A, Dechant G, Barde YA (1990): Binding of brain-derived neurotrophic factor to the nerve growth factor receptor. *Neuron* 4, 487–492
- Rowe MK, Chuang D-M (2004): Lithium neuroprotection: molecular mechanisms and clinical implications. *Expert Rev Mol Med* 6, 1–18
- Rowse AL, Naves R, Cashman KS, McGuire DJ, Mbana T, Raman C, De Sarno P (2012): Lithium controls central nervous system autoimmunity through modulation of IFN- $\gamma$  signaling. *PLoS One* 7, e52658
- Rye HS, Yue S, Wemmer DE, Quesada MA, Haugland RP, Mathies RA, Glazer AN (1992): Stable fluorescent complexes of double-stranded DNA with bis-intercalating asymmetric cyanine dyes: properties and applications. *Nucleic Acids Res* 20, 2803–2812
- Salzer JL (2003): Polarized domains of myelinated axons. *Neuron* 40, 297–318
- Salzer JL (2012): Axonal regulation of Schwann cell ensheathment and myelination. *J Peripher Nerv Syst* 17, 14–19
- Schafer DP, Rasband MN (2006): Glial regulation of the axonal membrane at nodes of Ranvier. *Curr Opin Neurobiol* 16, 508–514
- Schenone A, Nobbio L, Monti Bragadin M, Ursino G, Grandis M (2011): Inherited neuropathies. *Curr Treat Options Neurol* 13, 160–179
- Schneider C, King RM, Philipson L (1988): Genes specifically expressed at growth arrest of mammalian cells. *Cell* 54, 787–793
- Schumacher M, Guennoun R, Mercier G, Désarnaud F, Lacor P, Bénavides J, Ferzaz B, Robert F, Baulieu EE (2001): Progesterone synthesis and myelin formation in peripheral nerves. *Brain Res Brain Res Rev* 37, 343–359
- Sereda MW (1999): Altered protein synthesis in sciatic nerve by transgenic overexpression of PMP22 in the CMT rat. *Ann NY Acad Sci* 883, 530–532
- Sereda MW, Nave K-Armin (2006): Animal models of Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Neuromolecular Med* 8, 205–216
- Sereda MW, Griffiths I, Pühlhofer A, Stewart H, Rossner MJ, Zimmerman F, Magyar JP, Schneider A, Hund E, Meinck HM, et al. (1996): A transgenic rat model of Charcot-Marie-Tooth disease. *Neuron* 16, 1049–1060
- Sereda MW, 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, 1533–1537
- Simons M, Trotter J (2007): Wrapping it up: the cell biology of myelination. *Curr Opin Neurobiol* 17, 533–540
- Sinha D, Wang Z, Ruchalski KL, Levine JS, Krishnan S, Lieberthal W, Schwartz JH, Borkan SC (2005): Lithium activates the Wnt and phosphatidylinositol 3-kinase Akt signaling pathways to promote cell survival in the absence of soluble survival factors. *Am J Physiol Renal Physiol* 288, F703–F713

- Skre H (1974): Genetic and clinical aspects of Charcot-Marie-Tooth's disease. *Clin Genet* **6**, 98–118
- Slater H, Bruno D, Ren H, La P, Burgess T, Hills L, Nouri S, Schouten J, Choo KHA (2004): Improved testing for CMT1A and HNPP using multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) with rapid DNA preparations: comparison with the interphase FISH method. *Hum Mutat* **24**, 164–171
- Snipes GJ, Suter U, Welcher AA, Shooter EM (1992): Characterization of a novel peripheral nervous system myelin protein (PMP-22/SR13). *J Cell Biol* **117**, 225–238
- Sobue G, Shuman S, Pleasure D (1986): Schwann cell responses to cyclic AMP: proliferation, change in shape, and appearance of surface galactocerebroside. *Brain Res* **362**, 23–32
- Sobue G, Yamamoto M, Doyu M, Li M, Yasuda T, Mitsuma T (1998): Expression of mRNAs for neurotrophins (NGF, BDNF, and NT-3) and their receptors (p75NGFR, trk, trkB, and trkC) in human peripheral neuropathies. *Neurochem Res* **23**, 821–829
- Sociali G, Visigalli D, Prukop T, Cervellini I, Mannino E, Venturi C, Bruzzone S, Sereda MW, Schenone A (2016): Tolerability and efficacy study of P2X7 inhibition in experimental Charcot-Marie-Tooth type 1A (CMT1A) neuropathy. *Neurobiol Dis* **95**, 145–157
- Stoll G, Müller HW (1999): Nerve injury, axonal degeneration and neural regeneration: basic insights. *Brain Pathol* **9**, 313–325
- Su H, Yuan Q, Qin D, Yang X, Wong W-M, So K-F, Wu W (2014): Lithium enhances axonal regeneration in peripheral nerve by inhibiting glycogen synthase kinase 3 $\beta$  activation. *Biomed Res Int* **2014**, 1–7
- Sun YR, Herrmann N, Scott CJ, Black SE, Swartz RH, Hopyan J, Lanctôt KL (2019): Lithium carbonate in a poststroke population: exploratory analyses of neuroanatomical and cognitive outcomes. *J Clin Psychopharmacol* **39**, 67–71
- Suter U, Patel PI (1994): Genetic basis of inherited peripheral neuropathies. *Hum Mutat* **3**, 95–102
- Suter U, Scherer SS (2003): Disease mechanisms in inherited neuropathies. *Nat Rev Neurosci* **4**, 714–726
- Svaren J, Meijer D (2008): The molecular machinery of myelin gene transcription in Schwann cells. *Glia* **56**, 1541–1551
- Taveggia C, Zanazzi G, Petrylak A, Yano H, Rosenbluth J, Einheber S, Xu X, Esper RM, Loeb JA, Shrager P, others (2005): Neuregulin-1 type III determines the ensheathment fate of axons. *Neuron* **47**, 681–694
- Taveggia C, Feltri ML, Wrabetz L (2010): Signals to promote myelin formation and repair. *Nat Rev Neurol* **6**, 276–287
- Tawk M, Makoukji J, Belle M, Fonte C, Trousson A, Hawkins T, Li H, Ghandour S, Schumacher M, Massaad C (2011): Wnt/beta-catenin signaling is an essential and direct driver of myelin gene expression and myelinogenesis. *J Neurosci* **31**, 3729–3742

- Taylor V, Welcher AA, Program AE, Suter U (1995): Epithelial membrane protein-1, peripheral myelin protein 22, and lens membrane protein 20 define a novel gene family. *J Biol Chem* 270, 28824–28833
- Terenghi G (1999): Peripheral nerve regeneration and neurotrophic factors. *J Anat* 194, 1–14
- Tolwani RJ, Cosgaya JM, Varma S, Jacob R, Kuo LE, Shooter EM (2004): BDNF overexpression produces a long-term increase in myelin formation in the peripheral nervous system. *J Neurosci Res* 77, 662–669
- Topilko P, Schneider-Maunoury S, Levi G, Baron-Van Evercooren A, Chennoufi AB, Seitanidou T, Babinet C, Charnay P (1994): Krox-20 controls myelination in the peripheral nervous system. *Nature* 371, 796–799
- Trepel M: Grundlagen, Begriffe und Definitionen. In: Trepel M (Hrsg.): *Neuroanatomie, Struktur und Funktion*. 3. Auflage; Urban Fischer, München 2004, 1–20
- Van der Heyden M, Rook MB, Hermans M, Rijkse G, Boonstra J, Defize L, Destree O (1998): Identification of connexin43 as a functional target for Wnt signalling. *J Cell Sci* 111, 1741–1749
- Verhamme C, de Haan RJ, Vermeulen M, Baas F, de Visser M, van Schaik IN (2009): Oral high dose ascorbic acid treatment for one year in young CMT1A patients: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase II trial. *BMC Med* 7, 70–79
- Verheijen MHG, Camargo N, Verdier V, Nadra K, de Preux Charles A-S, Médard J-J, Luoma A, Crowther M, Inouye H, Shimano H, et al. (2009): SCAP is required for timely and proper myelin membrane synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 106, 21383–21388
- Viguera AC, Newport DJ, Ritchie J, Stowe Z, Whitfield T, Mogielnicki J, Baldessarini RJ, Zurick A, Cohen LS (2007): Lithium in breast milk and nursing infants: clinical implications. *Am J Psychiatry* 164, 342–345
- Wang J, Hmadcha A, Zakarian V, Song F, Loeb JA (2015): Rapid transient isoform-specific neuregulin1 transcription in motor neurons is regulated by neurotrophic factors and axon-target interactions. *Mol Cell Neurosci* 68, 73–81
- Warner LE, Mancias P, Butler IJ, McDonald CM, Keppen L, Koob KG, Lupski JR (1998): Mutations in the early growth response 2 (EGR2) gene are associated with hereditary myelinopathies. *Nat Genet* 18, 382–384
- Watila M, Balarabe S (2015): Molecular and clinical features of inherited neuropathies due to PMP22 duplication. *J Neurol Sci* 355, 18–24
- Weiss BG: Tierexperimentelle Behandlungsversuche der Charcot-Marie-Tooth-Erkrankung 1A. *Med.Diss. Göttingen* 2014
- Wu R, Fan J, Zhao J, Calabrese JR, Gao K (2014): The relationship between neurotrophins and bipolar disorder. *Expert Rev Neurother* 14, 51–65
- Yamashita T, Tucker KL, Barde YA (1999): Neurotrophin binding to the p75 receptor modulates Rho activity and axonal outgrowth. *Neuron* 24, 585–593

- Yasuda S, Liang M, Marinova Z, Yahyavi A, Chuang D (2009): The mood stabilizers lithium and valproate selectively activate the promoter IV of brain-derived neurotrophic factor in neurons. *Mol Psychiatry* 14, 51–59
- Yoshino JE, DeVries GH (1987): Effect of lithium on Schwann cell proliferation stimulated by axolemma- and myelin-enriched fractions. *J Neurochem* 48, 1270–1277
- Youdim MB, Arraf Z (2004): Prevention of MPTP (N-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine) dopaminergic neurotoxicity in mice by chronic lithium: involvements of Bcl-2 and Bax. *Neuropharmacology* 46, 1130–1140
- Yu F, Wang Z, Tchantchou F, Chiu C-T, Zhang Y, Chuang D-M (2012): Lithium ameliorates neurodegeneration, suppresses neuroinflammation, and improves behavioral performance in a mouse model of traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 29, 362–374
- Zhong J, Yang X, Yao W, Lee W (2006): Lithium protects ethanol-induced neuronal apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 350, 905–910
- Zoidl G, Blass-Kampmann S, D'Urso D, Schmalenbach C, Müller HW (1995): Retroviral-mediated gene transfer of the peripheral myelin protein PMP22 in Schwann cells: modulation of cell growth. *EMBO J* 14, 1122–1128



